TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Onchornycus mykiss*) BİYOJEN AMİNLERİN HPLC İLE SAPTANMASI

N. Hakan ŞENMAN

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ BÖLÜMÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. T. Haluk ÇELİK

2007 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 26.01.2007

Prof. Dr. İrfan EROL
Ankara Üniversitesi Veteriner Fak.
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Sadi AKGÜN
Ankara Üniv.Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. T. Haluk ÇELİK
Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Haydar ÖZDEMİR
Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Hasan AYÇİÇEK
Gülhane Askeri Tıp Akademisi

ÖNSÖZ

Günümüz toplumlarında mevcut gıda kaynaklarının yetersizliği yanı sıra tüketime sunulan ürünlerdeki hiyjenik kalitenin düşük olmasıyla ortaya çıkan infeksiyon ve intoksikasyonlar önemli yer tutmaktadır. Hayvansal protein kaynaklarının başında gelen balık ve balık ürünlerinin hem ucuz hemde taze olarak elde edilebilir olmasıyla tüketimi oldukça fazla olmaktadır. Ancak balıkların yakalanmasından pazarlanmasına kadar geçen periyotta uygun olmayan saklama koşulları ve kötü hiyjenik kalite, kolay bozulma eğiliminde olan balık dokularında yıkımlanmalara yol açarak insan sağlığını tehdit edici unsurların açığa çıkmasına yol açmaktadır. Kültürel ve bölgesel tüketim alışkanlıkları göz önünde bulundurulduğunda, balık ve balık ürünleriyle oluşan intoksikasyonlar çeşitlilik göstermektedir. Balık kaynaklı zehirlenmelerin başlıcası histamin zehirlenmesidir. Bu biyojen aminin yüksek miktarlarda alımıyla insanlardaki duyarlılık derecesine göre ölüme kadar varabilen olgular görülmektedir.

Halk sağlığı açısından önemli olan biyojen aminlerin tespiti ile ortaya çıkabilecek sorunların önlenebilmesi için birçok metod geliştirilmiş ve halen geliştirilmektedir. Balık ve balık ürünlerinde mevcut risk faktörlerinin azalması öncelikle bakteriyel kontaminasyonun en aza indirgenmesiyle olabilmektedir. Bu açıdan çiftlikten sofraya gıda güvenliği kapsamında toplumun bilinçlendirilmesi ve kontrol mekanizmalarının en iyi biçimde çalışır olması değerlendirilmektedir.

Tez çalışmamın seçilmesinde ve yürütülmesinde ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen başta bölüm başkanımız Prof. Dr. İrfan EROL ve danışman hocam Prof. Dr. T. Haluk ÇELİK olmak üzere tüm değerli öğretim üyelerine, laboratuvar çalışmaları esnasında yardımlarını esirgemeyen Vet. Hekim Erdem ÖRMECİ, Serhat KILIÇ ve U. Oğuz ERBAY'a, Uzm. Vet. Hekim Tayfun İDE ve Yrd. Doç. Dr. Abdullah OLGUN'a, BİTAUM çalışanlarına, tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, GATA araştırma geliştirme laboratuvar personeline, Anabilim Dalı personeline ve tezimin her aşamasında yardımını esirgemeyen sevgili eşim Ayşe Oya ŞENMAN'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Çizelgeler	vi
Şekiller	vii
1.GİRİŞ	**1**
1.1. Biyojen Aminlerin Oluşum Mekanizması	**3**
1.2. Balık ve Balık Ürünlerindeki Biyojen Aminler	**5**
1.2.1. Histamin	**5**
1.2.2. Kadaverin ve Putresin	**7**
1.2.3. Tiramin	**9**
1.2.4. Spermin ve Spermidin	**10**
1.2.5. Agmatin	**11**
1.3. Biyojen Amin Dekarboksilasyonuna Etki Eden Faktörler	**11**
1.4. Gıdalarda Biyojen Amin Oluşumunu Etkileyen Faktörler	**13**
1.4.1. pH'nın Etkisi	**14**
1.4.2. Sıcaklığın etkisi	**16**
1.4.3. NaCl (Tuz) Yoğunluğunun Etkisi	**16**
1.5. Biyojen amin üretiminin kontrol altına alınması	**16**
1.5.1. Depolama Koşulları	**17**
1.6. Gıdalarda biyojen aminlerin varlığı	**18**
1.7. Halk sağlığı açısından biyojen aminlerin önemi	**22**
1.7.1. Histamin İçin İzin Verilebilir Limitler	**25**
1.7.2. Kadaverin ve Putresin için İzin Verilen Limitler	**27**
1.7.3. Tiramin için izin verilen limitler	**27**
1.8. Biyojen aminlerin analizinde kullanılan yöntemler	**27**

2. GEREÇ VE YÖNTEM **29**

2.1. Gereç **29**
2.1.1. Örnek alabalıklar **29**
2.1.2. HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) Cihazı **29**
2.2. Yöntem **29**
2.2.1. Kullanılan kimyasal maddeler **29**
2.2.2. Standart amin solusyonunun hazırlanması **30**
2.2.3. Standart aminlerin kalibrasyon eğrisinin hazırlanması **30**
2.2.4. Biyojen aminlerin HPLC ile Dağılımı **30**
2.2.5. Biyojen aminlerin balık örneklerinden geri kazanımı **31**
2.2.6. Alabalık öneklerinin analizi **31**
2.2.7. İstatistiksel değerlendirme **32**

3. BULGULAR **33**

3.1. Standart aminlerin kromatografik profili **33**
3.2. Geri kazanım **34**
3.3. Biyojen aminlerin tespit seviyeleri **35**

4.TARTIŞMA **38**

5. SONUÇ VE ÖNERİLER **43**

ÖZET **44**
SUMMARY **45**
KAYNAKLAR **46**
ÖZGEÇMİŞ **57**

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	alfa
β	beta
±	artı eksi
°C	Santigrad derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
Anon	Anonim
BAI	Biyojen amin indeks
$C_5H_9N_3$	Histamin
CO_2	Karbon dioksit
DAO	Diamin oksidaz
g	Gram
g	Santifüj birimi
GDL	Gliko delto lakton
GHP	Good Hiygen Practice
GMP	Good Manufacturing practice
FDA	Food and Drug Administration
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
HCl	Hidroklorik asit
HNMT	Histamin-N-metil transferaz
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kg	Kilogram
kob/g	Koloni oluşturan birim/gram
M	Molar
MAO	Monoamin oksidaz
MAOI	Monoamin oksidaz inhibitör
mg	Milligram
ml	Millilitre
mm	Millimetre
N_2	Azot
NaCl	Sodyom klorür, tuz
NaOH	Sodyum hidroksit
$NH_2(CH_2)_4NH_2$	Putresin
$NH_2(CH_2)_5NH_2$	Kadaverin
nm	Nanometre
No.	Numara
pH	Potansiyel hidrojen
Ppm	Part of per million
TCA	Trikloro asetik asit
UV- Vis	Ultra violet - visible
vb.	ve benzeri

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Su ürünlerindeki histamin miktarı **6**

Çizelge 1. 2. Buzda ve buzsuz kutularda soğuk derecede (2±2) depolanan iç organları çıkarılmış ringa balığında biyojen amin içeriği **8**

Çizelge 1.3. Buzda depolanan iç organları çıkarılmış levrekte biyojen amin konsantrasyonu **9**

Çizelge 1. 4. Scombroid balık zehirlenmesine neden olan balık türleri **24**

Çizelge 1.5. Balıklardaki histamin miktarına göre etki dereceleri **26**

Çizelge 3.3. Üçüncü gün histamin seviyesinde azalma görülen örnekler **35**

Çizelge 3.4. Alabalık örneklerinde tespit edilen biyojen amin seviyeleri **36**

Çizelge 3.5. İstatistiksel sonuçlar. **37**

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Bazı biyojen aminlerin dekarboksilasyon mekanizması **3**

Şekil 1.2. Biyojen amin oluşan amino asitler **4**

Şekil 1.3. Ton balığı vücudunda histaminin yoğun olarak bulunduğu bölgeler **5**

Şekil. 3.1. Biyojen aminlerin kromatografik dağılımı **33**

Şekil. 3.2. Putresin, kadaverin ve histaminin (a, b ve c) kalibrasyon eğrileri **34**

1.GİRİŞ

Gıdalarda mikrobiyolojik değişimler sırasında proteinler önce ekzopeptidazlar vasıtasıyla yüksek molekül ağırlıklı peptitlere, daha sonrada endopeptidazlar aracılıyla serbest amino asitlere kadar indirgendikleri ve bu amino asitlerin önemli bir kısmının yıkımlanarak amin yapısındaki toksik yapılara dönüşebildikleri bildirilmiştir (Halasz ve ark., 1994; Lehane ve Olley , 2000)

Biyojen aminlerin, amino asitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyon ve transaminasyonu ile oluşan azotlu bileşikler oldukları gösterilmiştir (Gingerich ve ark., 1999). Dekarboksilaz enzimi için gerekli olan substratların serbest amino asitler olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle balığın bozulması veya ayrışması süresince, bakteriyel üreme, amino asit dekarboksilasyon faaliyeti ve proteoliz aktivitesinden dolayı amino asitler serbest kalmadığı ve biyojen amin oluşumunun şekillendiği belirlenmiştir (Santos, 1996). Gıdalarda oluşan en önemli biyojen aminler histamin, tiramin, putresin, kadaverin, β-feniletilamin, triptamin, spermidin ve spermin olup, bu aminler sırasıyla histidin, tirozin, ornitin, lizin, fenil alanin, triptofan ve arginin amino asitlerinden dekarboksilasyon sonucu oluşmaktadır (Paulsen ve ark., 1997). Spermin ve spermidin putresinden de meydana gelebildiği bildirilmiştir (Kalac ve ark., 1999).

Biyojen aminlerin, vücutta önemli birçok biyolojik rolleri mevcut olup protein, hormon ve nükleik asit sentezinin ilk basamağını oluştururlar (Maijala 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 (Santos, 1996).

Aminler, amonyaktaki 1., 2. veya 3. hidrojen atomun alkil veya aril grupların yerini almasıyla oluşan temel nitrojenli bileşiklerdir. Biyolojik aminlerin kimyasal yapısı alifatik (putresin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatik (tiramin, feniletilamin) ve heterosiklik (histamin, triptamin) olarak değişiklik gösterdiği

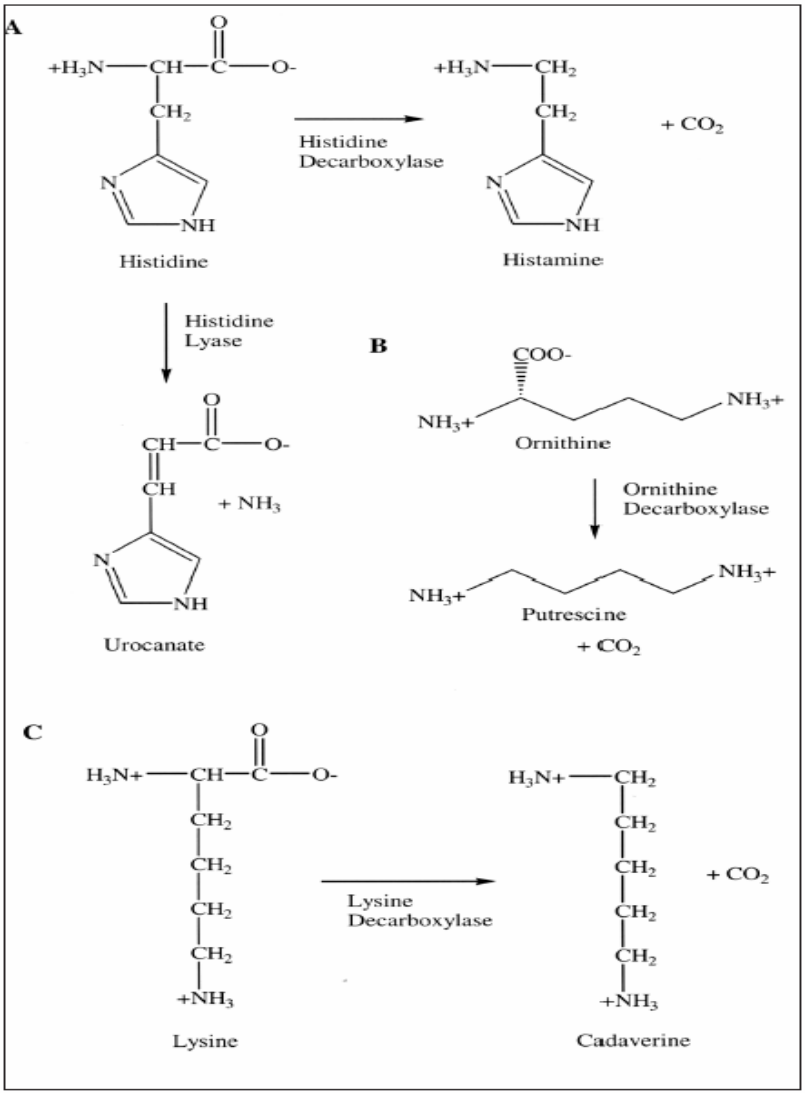
belirlenmiştir (Santos, 1996). Basit alifatik monoaminler en yaygın bulunan aminlerdir. Diamin grubuna giren putresin, poliamin grubuna giren spermidin ve spermin hayvan ve bitkilerde sürekli bulunmasına karşın, putresin ve spermidin çoğu bakteride az miktarda bulunmuştur (Smith, 1980). Bütün organizmalarda, bir veya iki amino propil grubun ayrılması ile putresinden daha sonra sırasıyla spermidin ve spermin oluştuğu belirlenmiştir. Amino asit dekarboksilasyonu, gıdalarda en sık rastlanan biyojen amin oluşum reaksiyonu olup, aromatik aminlerin gıdalarda toksisiteye yol açabilecekleri üzerinde durulmuştur. Bu aminlerin, amino asitlerin dekarboksilasyonu ile canlı organizmaların faaliyeti sonucu üretildiği zaman, biyojen olarak adlandırıldıkları bildirilmiştir (Shalaby, 1996).

Biyojen aminlerin düşük molekül ağırlıklı organik bazlar olduğu mikrobiyel, bitkisel ve hayvansal metabolizmalar tarafından sentezlenebildikleri belirlenmiştir (Brink ve ark., 1990). Balık ve balık ürünlerindeki biyojen amin oluşumunun direkt olarak balıktaki serbest amino asit içeriği ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bakteriyel dekarboksilaz enzimi ve uygun çevresel koşulların varlığında biyojen amin formasyonunun kolaylıkla şekillenebildiği belirlenmiştir (Özoğul, 2001). Amino asit dekarboksilaz enziminin, bazı *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Micrococcus* ve *Pseudomonas* türlerinde mevcut olduğu bildirilmiştir (Shalaby, 1996).

Biyojen aminlerin insan ve hayvanlarda hastalığa yol açan toksik maddeler olduğu ve balık, balık ürünleri, et ürünleri, yumurta, peynir, fermente sebzeler, meyveler, soya ürünleri, bira, şarap, fındık ve çikolata gibi birçok gıda ürününde bulunabildiği bildirilmiştir (Brink ve ark., 1990; Santos, 1996). Histamin, tiramin, agmatin, putresin, kadaverin, spermin ve spermidin gibi biyojen aminlerin tespiti sadece toksik etkilerinden dolayı önemli olmadığı, aynı zamanda gıdaların tazelik veya bozulma derecesinin bir indikatörü olarak da kullanılmakta olduğu anlatılmıştır (Halasz ve ark., 1994).

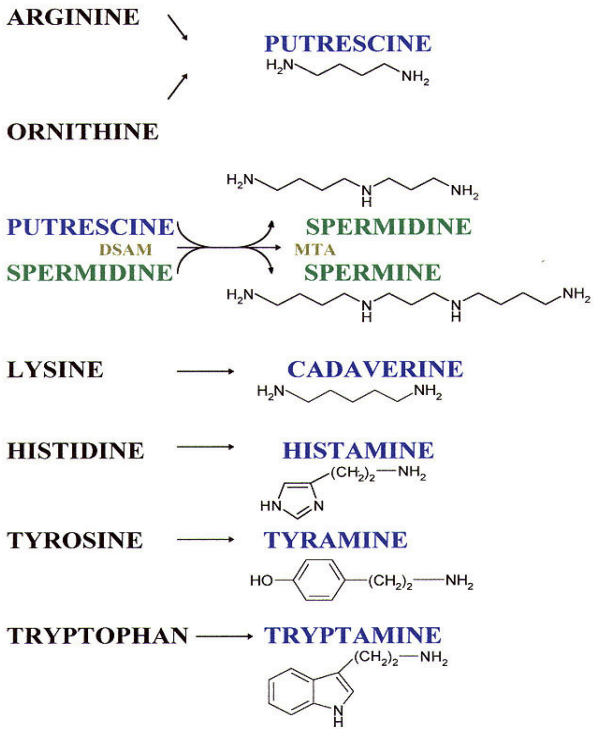
1.1. Biyojen Aminlerin Oluşum Mekanizması:

Protein içeren gıdaların, mikrobiyel veya biyokimyasal aktiviteyi oluşturacak ortamlarda bulunması sonucu genellikle biyojen amin üretilebildiği düşünülmektedir. Amin miktarı gıdanın doğasına ve mevcut mikroorganizmaya bağlı olarak büyük bir değişkenlik gösterdiği vurgulanmıştır (Brink ve ark., 1990).



Şekil 1.1. Bazı biyojen aminlerin dekarboksilasyon mekanizması (Brink ve ark., 1990).

Biyojen aminler genellikle serbest amino asitlerin mikrobiyel enzimlerle dekarboksilasyonu sonucu oluşmaktadır. Amino asit dekarboksilasyonu alfa-karboksil grubun uzaklaşmasıyla meydana gelir (Shalaby, 1996). Balık kasında en sık bulunan aminler histamin, kadaverin ve putresindir (Rawles ve Flick,1996). Histidin, lizin ve ornitin amino asitleri bakteriyel faaliyetlerle sırasıyla histamin, kadaverin ve putresine dönüşebilmektedir. Tiramin, triptamin ve ß-feniletilamin gibi biyojen aminlerde yine bakteriyel dekarboksilasyon yoluyla sırasıyla tirozin, triptofan ve fenilalanin amino asitlerinden oluşmaktadır. Arjinin amino asidi agmatine kolayca dönüşebilmekte veya bakteriyel aktivitenin bir sonucu olarak ornitine indirgenebilmektedir. Ornitin ise dekarboksilasyon yoluyla putresine dönüşmektedir (Krizek ve Kalac, 1998).



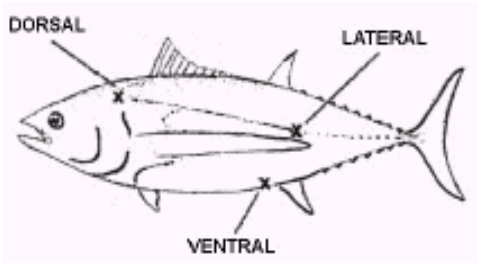
Şekil 1.2. Biyojen amin oluşan amino asitler (Krizek ve Kalac, 1998)

1.2. Balık ve Balık Ürünlerindeki Biyojen Aminler

1.2.1 Histamin:

Histamin, kimyasal olarak 2-(4-imidazol) etilamin olup, $C_5H_9N_3$ formulüyle gösterilmiştir. Histidinin amino asitinin L-histidin dekarboksilaz enzimi ile katalizlenen dekarboksilasyon reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Histaminin, hidrofilik ve vazoaktif karakterde olduğu bildirilmiştir (Anon, 2006).

Depolama sırasında balık kasındaki serbest amino asitleri dekarboksile eden bazı bakteriler bulunduğu gösterilmiştir. Özellikle *Scombridae* (uskumru ve ton gibi) ve *Scomberesocideae* familyalarına ait scombroid balıklar, histamin balık zehirlenmesiyle ilişkili en yaygın türler olarak belirlenmiştir (Veciana-Nouges ve ark., 1996; Ababouch ve ark., 1991). Fakat bu zehirlenmeye, kaslarında yüksek düzeyde serbest amino asit bulunduran scombroid olmayan balık türlerinin de (ringa, sardalye, hamsi) neden olabildikleri bulunmuştur (Özoğul, 2001). Ijomah ve ark. (1992), histidin seviyesinin 1g/kg'dan (ringa balığında) 15g/kg'a (ton balığında) kadar değişiklik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yoshida ve Nakamura (1982), taze uskumruda histamin bulunmadığını rapor etmiştir. Okuzumi ve ark. (1990), 30°C' de depolanan kıyılmış uskumru etinde yüksek düzeyde histamin (210-1336 mg /100g) tespit etmişlerdir.



Şekil 1.3. Ton balığı vücudunda histaminin yoğun olarak bulunduğu bölgeler (Craven ve ark., 1995).

Düşük sıcaklıkta depolanan balıklarda biyojen amin oluşumunun azaldığı bildirilmiştir. Wendakoon ve ark. (1990), uskumrunun buzda depolanması süresince hiçbir amin üretiminin olmadığını, 20°C'lik depolamada ise histamin, putresin, kadaverin ve tiraminin büyük miktarlarda üretildiğini kaydetmişlerdir. 4°C' de normal hava koşullarında, vakum pakette ve modifiye atmosfer paketlerde (%60 CO_2 ve %40 N_2) 15 gün depolanan sardalye örneklerinde histamin sırasıyla, 20 mg/100g, 13 mg /100g ve 10 mg /100g değerlerine ulaştığı belirlenmiştir (Özoğul ve ark., 2004b).

Çizelge 1.1. Su ürünlerindeki histamin miktarı (Türker ve ark., 1996).

Su ürünleri		Ortalama Histamin Miktarı (mg/100g)
Derin dondurulmuş deniz balıkları	Dil Balığı	< 0.1
	Uskumru	< 0.1
	Pisi balığı	2.00
Taze deniz balıkları	Levrek	3.35
Derin dondurulmuş tatlı su balıkları	Alabalık	0.10
	Sudak	1.86
Taze tatlı su balıkları	Alabalık	< 0.1
	Sazan	0.78
	Sudak	7.50
Tütsülenmiş balıklar	Dil balığı	9.10
	Uskumru	10.9
Konserve	Ton balığı	47.6
	Hamsi	65.0
	Sardalya	73.1

Ritchie ve Mackie (1980), 3 farklı sıcaklıkta (1°C buzda, 10°C ve 25°C' de) depolanan uskumru ve ringadaki diamin ve poliamin üretimini araştırmıştır. 7 gün depolama sonunda, ringadaki histamin konsantrasyonunun uskumrudaki histamin konsantrasyonundan daha fazla olduğunu bulmuşlardır. 25°C de depolanan ringadaki histamin seviyesi 72 saat sonra 100 mg /100g'ı aşmıştır. Fakat bozulmuş uskumrudaki

histamin konsantrasyonu 100 mg /100g'dan daha düşük olmuştur. Buzda ve buzsuz ortamda iç organları çıkarılmış bir şekilde soğukta muhafaza edilen ringa balığı üzerine yapılan başka bir çalışmada, histamin içeriği depolama süresince artış göstererek 16 günlük depolama sonunda sırasıyla 27.14 mg /100g ve 39.64 mg/ 100g'a ulaşmıştır (Özoğul ve ark., 2002b). -18°C ve -25' de 3 ay dondurularak depolanan beyaz ton balığında (albacore) histamin içeriği sırasıyla 1.17 ppm'e (başlangıç seviyenin %25.4'ü) ve 1.62 ppm'e (başlangıç seviyenin % 34.5'i) düşmüştür (Ben-Gigirey ve ark., 1998a). Mackie ve ark. (1997), buzda ve 10°C'lik serin koşullarda depolanan ringa balığı ve uskumrudaki biyojen amin formasyonunu araştırmışlardır. Depolama sonunda (13 gün) uskumru ve ringadaki histamin miktarının Avrupa Birliği'nin kabul ettiği histamin seviyesi olan 10mg/100g dan daha düşük olduğunu bulmuşlardır. İç organları çıkartılmış balıklarda histamin oranının düşük olduğu tespit edilmiştir. Histamin seviyesi işlenmemiş taze ton balığında ortalama 0.32 µg /g olurken, konserve ton balığında bu değer en yüksek 40.5 µg /g olarak belirlenmiştir (Veciana-Nogues ve ark., 1997a).

1.2.2. Kadaverin ve Putresin:

Kadaverinin hayvansal dokuların putrefaksiyonu esnasında protein hidrolizi ile oluşan, lizin amino asitinin dekarboksilasyonu sonucu oluşan toksik ve kötü kokulu bir diamin olduğu ($NH_2(CH_2)_5NH_2$) bildirilmiştir. Ayrıca 1,5-pentandiamin ve pentametilendiamin olarakta adlandırılmıştır. Putresin ise, ornitin amino asitinin dekarboksilasyonu sonucu oluşan, $NH_2(CH_2)_4NH_2$ yapısında ve 1,4-diaminobütan veya bütandiamin olarak da bilindiği belirtilmiştir (Anon, 2006).

Kadaverin ve putresin gibi biyojen aminler gıdalarda ve özellikle balık ve balık ürünlerinde çok önemli olmaktadır. Balıkta bakteriyel bozulma başlar başlamaz putresin ve kadaverin üretimi sürekli olarak artar. Bu nedenle balık kalitesi için potansiyel bir indikatör olarak değerlendirildikleri vurgulanmıştır (Fernandez-Salguero ve Mackie, 1987). Bu aminlerin histamin toksisitesini arttırdığı bildirilmiştir (Taylor, 1986). Fernandez-Salguero ve Mackie (1987) mide ve bağırsağı çıkartılan 12 gün buzda depolanan ringadaki putresin ve kadaverin konsantrasyonunu sırasıyla 1.49

mg/100g ve 14.77 mg/100g bulmuşlardır. Putresin, 18°C ve -25°C'de dondurularak depolanan beyaz ton balığında 9 aylık depolama sonucu en yüksek artış gösteren biyojen amin olmuştur. Bu seviye -18°C' de 59.04 ppm'e, -25°C' de ise 68.26 ppm'e ulaşmıştır. Kadaverin konsantrasyonu, bu her iki depolama koşulları altında 3 ppm'in altında olmuştur (Ben-Gigirey ve ark., 1998b). 2±2°C' de kutularda buzsuz depolanan ringa balığının putresin ve kadaverin seviyesi depolama periyodu süresince artmıştır. 16 günlük depolamada kaslardaki putresin ve kadaverin seviyesi sırasıyla 7.42 mg ve 32.93 mg 100/g olmuştur (Özoğul ve ark, 2002b).

Çizelge 1. 2. Buzda ve buzsuz kutularda soğuk derecede (2±2) depolanan iç organları çıkarılmış ringa balığında biyojen amin içeriği (mg /100g kas) (Özoğul ve ark., 2002b).

	Buzlu ortam				Buzsuz ortam			
Depolama süresi (gün)	**Hist**	**Put**	**Kad**	**Agm**	**Hist**	**Put**	**Kad**	**Agm**
0	0.00	0.00	0.85	0.00	0.14	0.00	0.93	0.006
2	0.35	0.003	1.68	0.18	1.24	0.35	3.94	0.27
4	1.58	0.16	2.73	0.82	3.94	0.84	6.35	0.59
6	3.63	0.76	3.94	1.04	8.09	1.52	9.69	1.92
8	8.95	1.58	5.95	2.28	14.48	3.15	13.28	3.93
10	12.15	2.04	9.65	2.89	21.18	4.62	17.83	5.86
12	19.47	2.85	13.14	3.25	27.41	5.86	23.64	4.83
14	23.58	3.42	17.85	3.89	34.52	7.03	27.02	5.92
16	27.14	3.97	23.72	4.19	39.64	7.42	32.93	5.21

Hist: Histamin, Put: Putresin, Kad: Kadaverin, Agm: Agmatin

Klausen ve Lund (1986), 2°C ve 10°C' de vakum pakette depolanmış ringanın ve uskumrunun biyojen amin üretimini araştırmış olup uskumruda yüksek bir kadaverin içeriği bulmuştur. Bu sonuçlar uskumrunun scombrotoksin zehirlenmesine niçin dahil edildiğini ringa balığının ise niçin dahil edilmediğini açıkladığı bildirilmiştir. Bu araştırıcılar aynı zamanda tüketilmez hale gelmeden önce ringadaki putresin seviyesinin düşük olduğunu ve 10 ppm'i aşmadığını, uskumruda ise bu seviyenin 40 ppm'e ulaştığını bulmuşlardır.

Yapılan başka bir çalışmada, 5°C' de depolanan kıyılmış uskumru etinin bozulma evresinde yüksek oranda putresin (2.3-54 mg /100g) ve kadaverin (11-15 mg /100g) tespit edilmiştir. 30°C' de depolanan örneklerde ise daha yüksek bir kadaverin seviyesi (74-612 mg /100g) gözlenmiştir (Okuzumi ve ark., 1990). Paleologos ve ark. (2004) buzlu bir ortamda polietilen filme sarılmış olarak depolanan levrekte, depolama süresince putresinin en fazla üretilen amin olduğunu ve bu aminin 13. günde yaklaşık 10.69 mg /kg seviyesine çıktığını rapor etmişlerdir.

Çizelge 1.3. Buzda depolanan iç organları çıkarılmış levrekte biyojen amin konsantrasyonu (mg /kg) (Paleologos ve ark., 2004)

Gün	Putresin	Kadaverin	Tiramin	Triptamin
1	0.99	-	-	-
3	3.03	-	-	-
5	3.15	-	-	-
7	3.23	-	-	-
9	4.25	0.42	0.15	0.86
11	6.54	0.55	0.31	1.04
13	10.69	0.93	2.12	1.30
16	12.64	1.19	5.20	1.80

1.2.3. Tiramin:

Tiramin tirozin amino asitin parçalanmasıyla oluşan bir monoamin olup, 4-hidroksi-fenetilamin, para-tiramin veya p-tiramin olarak isimlendirilmiştir (Anon, 2006). Balık bozulması süresince oluşan tiramin seviyesi hakkında çok az veri bulunmaktadır. Fakat yüksek içerikli tiramin bazı toksikolojik problemlere yol açtığı için oldukça önemli olmaktadır. Veciana-Nogues ve ark. (1997b), farklı sıcaklık derecelerinde depolanan ton balığı örneklerinin tiramin seviyesinde büyük bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Tiramin içeriği 0°C' de 12 gün depolanan örneklerde yaklaşık 5.7 µg /g, 8°C' de 5 gün depolanan örneklerde 9.1 µg /g ve 20°C' de 1.5 gün depolanan örneklerde ise 8.4.µg /g olmuştur. Yapılan başka bir çalışmada, tiramin seviyesi taze ton balığında en yüksek 10.65 µg /g, konserve ton balığında ise en yüksek 3 µg /g olarak tespit edilmiştir (Veciana-Nogues ve ark., 1997a).

1.2.4. Spermin ve Spermidin:

Spermidin ve spermin gıdalarda doğal olarak oluşan biyojen aminler olup bunların formasyonu bakteriyel bozulmayla ilişkili olmamaktadır (Veciana-Nogues ve ark., 1997b). Spermidin ve spermin balıkta önemsiz bir bileşik olduğu ve depolama süresince az miktarda oluştuğu belirlenmiştir (Ritchie ve Mackie, 1980). Taze ve konserve ton balığında yapılan bir çalışmada spermidin içeriğinin sperminden daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada aynı zamanda ortalama spermidin ve spermin seviyelerinin konserve ton balığı örneklerine (en yüksek değer sırasıyla 9.95 µg /g ve 35.2 µg /g) nazaran taze balıkta (en yüksek değer sırasıyla 11.7 µg /g ve 37.0 µg /g) istatistiksel olarak daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Veciana-Nogues ve ark., 1997a). Mackie ve ark. (1997), spermin ve spermidin konsantrasyonunun taze kasta 1mg/100g'dan daha düşük olduğunu, fakat bu değerin balık türlerine, kaslardaki serbest amino asit miktarına ve bakterilerin bulunma durumuna bağlı olarak değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Vakum pakette depolama periyodu boyunca spermidin ringa balığında 2-4 ppm, uskumruda ise 4-5 ppm gibi sabit seviyelerde bulunmuştur. Brink ve ark. (1990), balıkların spermidin ve sperminden daha fazla putresine sahip olduğunu belirtmiştir. Ben-Gigirey ve ark. (1998a) dondurulmuş beyaz ton balığı üzerine yaptıkları bir çalışmada, spermin içeriğinin depolama süresince arttığını, 9 aylık depolama sonucunda bu konsantrasyonun -18°C' de 9.5 ppm'e, -25°C' de ise 10.27 ppm'e ulaştığını tespit etmişlerdir. Spermidin içeriği ise 9 aylık depolama sonunda 93.71 ppm (-18°C' de) ve 81.89 ppm (-25°C' de) olarak belirlenmiştir.

Ringa balığının tüm depolama koşulları altında (2±2°C' de buzda, buzsuz ortamda ve modifiye atmosfer pakette), kaslarındaki spermidin ve spermin içeriğinin 1 mg 100/g'dan düşük olduğu gözlenmiştir (Özoğul ve ark., 2002a).

1.2.5. Agmatin:

Agmatin balık ve balık ürünlerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Smith, 1980). 0, 3, 5 ve 15°C'lerde depolanan mürekkep balığı kaslarındaki agmatin, depolamanın ilk evrelerinde düşük seviyelerde gözlenmiştir. Fakat agmatin konsantrasyonu depolama süresiyle ilişkili olarak artmıştır. Bu değer bozulma evresinin başlangıcında 30mg/ 100g'a, bozulma evresinin ilerlemesiyle 40 mg/100g'a ulaşmıştır (Yamanaka ve ark., 1987). Taze uskumru örneklerinde agmatin konsantrasyonu konserve edilmiş örneklere kıyasla daha yüksek olmuştur. Agmatin üretimi balığın ilk bozulma aşamasında artmış fakat sonrasında azalmıştır (Veciana-Nogues ve ark., 1997a).

Malle ve Valle (1996), balık bozulmasının tespitinde kullanılmak üzere biyojen aminlerle oluşturdukları bir kalite indeksine 'Biogenic Amines Index (BAI)' adını vermişler ve bir formül ortaya koymuşlardır:

$$BAI = \frac{\text{Histamin + Kadaverin + Putresin}}{\text{Spermidin + Spermin}}$$

Bu formülden yola çıkarak;

- BAI < 1 ise Birinci kalite balık veya et,
- 1 < BAI < 10 arasında ise balık veya et değişim aşamasında,
- BAI > 10 olursa balık veya et bozulma aşamasında olduğu kabul edilmiştir.

1.3. Biyojen Amin Dekarboksilasyonuna Etki Eden Faktörler

Aminler, gıdaların enzimatik aktivitesi veya bakterilerin dekarboksilaz aktivitesi ile üretildiğinden dolayı, gıdalardaki amin içeriğini kontrol etmek için dekarboksilaz aktiviteyi engellemek ve bakteriyel gelişiminin önlenmesi gerekliliği vurgulanmıştır (Santos, 1996). Biyojen amin oluşumunda; gıdanın mikrobiyolojik kalitesi ve kontaminasyon düzeyi ile gıdaya ısı işlemi uygulanıp uygulanmaması; ortamda bulunan dekarboksilaz pozitif mikroorganizma miktarı, dekarboksilatif enzimler için gerekli olan kofaktörlerin varlığı, serbest amino asit miktarı ile ortamın pH değeri gibi

faktörlerin dışında depolama şartlarının yetersiz ve elverişsiz olması ve depolama sıcaklığının önemli bir etkiye sahip oldukları bildrilmiştir (Masson ve ark., 1997). Mikrobiyel flora mevsimsel olarak çeşitlilik gösterdiği için amin seviyesi balığın avlandığı andaki bakteri sayısına ve balığın mide içeriğine bağlı olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Shalaby, 1996). Oksijen miktarının da aynı zamanda amin biyosentezinde önemli bir etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır. *Enterobacter cloacae*'da anaerobik ortamda aerobik ortamına göre putresin üretimi yaklaşık yarı seviyelere inmiş, *Klebsiella pneumoniae* çok düşük oranda kadaverin sentezleyebilmiştir (Halasz ve ark., 1994).

Balığın depolanması süresince oluşan histaminin konserveleme işlemi boyunca kısmen kaybolduğu belirlenmiştir (Shalaby, 1996). Amino asit dekarboksilaz aktivitesinin optimum pH'ın 4 ile 5.5 arasında olduğu asidik ortamlarda çok güçlü olduğu belirtilmiştir (Teodorovic ve ark., 1994). Santos ve ark. (1986), uskumruda düşük pH değerlerinde yüksek bir tiramin seviyesi bulmuştur. Depolama sıcaklığı da gıdalardaki biyojen amin içeriğini etkileyebilmektedir. Klausen ve Lund (1986), amin içeriğinin sıcaklığa bağlı olduğunu, uskumru ve ringa balığında 10°C' deki biyojen amin içeriğinin 2°C' ye göre 2 ile 20 kat daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Wendakoon ve ark. (1990), uskumrunun buzda depolanması sırasında hiçbir amin üretiminin olmadığını rapor etmiştir. Bununla birlikte, 20°C' de histamin, putresin, kadaverin ve tiramin büyük miktarlarda üretilmiştir. Ancak, Santos ve ark. (1986), depolama sıcaklığının hamside tiramin içeriğini etkilemediğini bulmuştur. 5°C' de depolanan uskumru etinde histamin üretimi tuz konsantrasyonu ne olursa olsun tuzlama ile inhibe edilmiş ve hemen hemen hiç üretilemediği bulunmuştur (Santos, 1996). %12 NaCl içeren sardalye ürünlerinin yüksek sıcaklıkta (30°C) depolanması süresince; histamin, putresin ve kadaverin hızlı bir şekilde üretilmiştir (Yatsunami ve Echigo, 1993). 30°C' de uskumru etine eklenen karanfil yağı ve sodyum klorür, *Enterobacter aerogenes*'in gelişimini ve amin üretimini inaktive ettiği bildirilmiştir (Wendakoon ve Sakaguchi, 1992).

1.4. Gıdalarda Biyojen Amin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Gıdalarda biyojen aminlerin üretiminde, amino asitleri dekarboksile edebilme yeteneğine sahip bakteriler tarafından üretilen dekarboksilaz enzimi ile amino asitlerde bulunan α-karboksil grubu ayrılarak ilgili aminin üretilebildiği bildirilmiştir. Otolitik veya bakteriyel olarak oluşabilen proteoliz olayı, proteinlerden serbest amino asitlerin meydana gelmesine neden olduğundan, dekarboksilazyon reaksiyonları için substrat gereksiminin sağlanmış olduğu belirlenmiştir. (Hernandez-Herrero ve ark., 1999).

Biyojen amin üretebilen bakterilerin en önemlilerinin, *Enterobacteriacea* familyasına ait türler, *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.* ve *Photobacterium spp*., laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus spp, Streptococcus spp., Pediococcus spp.* ve *Carnobacterium spp*. olduğu bildirilmiştir (Brink ve ark., 1990; Santos, 1996; Shalaby, 1996).

Scombroid zehirlenmesine yol açan balıklarda histamin oluşturan ve ilk izole edilen bakterilerin ; *Morganella morganii, Klebsiella pneumoniae* ve *Hafnia alvei* olduğu ve aynı zamanda *Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Clostridium perfringens, Enterobacter aerogenes* ve *Vibrio alginolyties'* inde histamin ürettiği bulunmuştur (Arnold ve ark,1980; Frank ve ark., 1985).

Middlebrooks ve ark. (1988), bozulmuş balıktan dekarboksilaz aktiviteli *Acitenobacter Iwoffi, Pseudomonas putrefaciens, Aeromonas hydrophila* gibi üç bakteri türü izole etmesinin yanı sıra, Lopez-Sabater ve ark. (1994b), *Plesiomonas shigelloides* gibi yeni bir histamin üreticisi tespit etmiştir. Yatsunumi ve Echigo (1993), fermente balıkta histamin üreten bakteri olarak *Staphylococcus, Vibrio*, ve *Pseudomonas* soylarını teşhis etmişlerdir.

Histamin ile diğer aminleri üretmede yetenekli olan bakterilerin genellikle benzer türlerden oldukları bildirilmiştir (Rodriguez-Jerez ve ark., 1994). Tuza toleranslı bakteri sayısının yaklaşık 10'dan 10^4 kob/g'a kadar değişiklik gösterdiği %12 NaCl içeren sardalye ürünlerinin 30°C' de depolanması süresince histamin,

putresin ve kadaverin oluştuğu saptanmıştır (Yatsunami ve Echigo, 1993). Aynı zamanda *Photobacterium*'un da histamin, agmatin ve kadaverin üretimine neden olduğu belirlenmiştir (Okuzumi ve ark., 1990; Rawles ve Flick, 1996).

Tuzlanmış yarı konserve edilmiş hamsiden izole edilen ve 37ºC'de 24 saatlik inkübasyondan sonra *Morganella morganii*, *Bacillus* spp'in iki üyesi ve *Staphylococcus xylosus*'un sırasıyla 2123, 11 ve 110 ppm histamin ürettiği belirlenmiştir (Rodriguez-Jerez ve ark., 1994).

Et ve et ürünlerinden, *Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, Proteus morganii* ve *Edwardsiella spp*. gibi biyojen amin üreten koliformlar, Pediokoklar, Streptekoklar ve Mikrokok türleri yanında, *Lactobacillus brevis, L. divergens* ve *L. hilgardii* gibi amin üreten obligat heterofermentatif laktik asit bakterileri ile fakültatif heterofermentatif *L. carnis* ve homofermentatif *L. curvatus* izole edildiği bildirilmiştir (Maijala ,1994; Maijala ve ark., 1993).

Gıdalarda biyojen aminlerin oluşumunda, amin üreten mikroorganizmaların dekarboksilaz aktivitesini etkileyen bazı faktörlerin sırasıyla pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu ve starter kültürlerin varlığı olduğu bildirilmiştir (Maijala, 1994; Shalaby, 1996; Teodorovic ve ark., 1994).

1.4.1. pH'nın Etkisi:

pH'nın, dekarboksilaz aktivitesini ve dolayısıyla biyojen amin oluşumunu etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğu bildirilmiştir. Biyojen amin oluşumunun, asidik ortamlarda bakteri için koruyucu bir mekanizma olduğu anlatılmıştır (Masson ve ark.,1997; Teodorovic ve ark., 1994). Asidik ortamlarda amino asit dekarboksilaz aktivitesinin daha güçlü şekillendiği belirlenmiş ve amin oluşumunda pH 4.0-5.5 arasındaki koşulların optimum olduğu bulunmuştur (Santos, 1996).

Lactobacillus bulgaricus'un amino asit ilave edilerek kuvvetlendirilmiş MRS broth'da pH 5.0'da daha fazla histamin, tiramin ve triptamin ürettiği tespit edilmiştir

(Maijala, 1994). Glukoz gibi fermente olabilen karbonhidratların varlığının, bakterilerin gelişmini ve amino asit dekarboksilaz aktivitesini arttırdığı bununda, şekerlerin parçalanması ile laktik asit oluşumundan dolayı, pH düşüşü ile sağlandığı vurgulanmıştır. Glukoz konsantrasyonunun %0.5–2 olduğu ortamlar, optimal koşul olarak kabul edilirken (Masson ve ark., 1997), %3'ü aştığı durumlarda enzim oluşumunun inhibe olduğu bildirilmiştir (Santos, 1996). Beutling (1994), *Enterococcus faecalis*'in L-tirozin ve glukoz ilave edilmiş broth'ta pH 5.0-8.0 arasında yüksek miktarlarda tiramin ürettiğini bildirmiştir. Hızlı bir tirozin dekarboksilasyonu için optimum pH 7.0 olarak belirlenmiştir.

Maijala ve ark. (1993), tarafından yapılan bir çalışmada, kıyma örneklerine GDL (Gliko delto lakton) ilave edilerek sağlanan pH azalmasının biyojen aminler üzerine etkisi araştırılmıştır. GDL ilavesi ile kontrol grubuna göre, hızlı bir pH düşüşü yanında toplam bakteri, koliform, fekal streptekok sayıları ile histamin ve putresin seviyelerinde de önemli bir azalma sağlandığı bildirilmiştir.

1.4.2.Sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın, bakterilerin biyojen amin üretimini büyük ölçüde etkilediği ve amin oluşumu için optimal sıcaklık değerlerinin, bakteri türlerine göre değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Masson ve ark., 1997).

Biyojen amin miktarlarının, depolama süresi ve sıcaklığı ile pozitif korelasyon içinde olduğu bildirilmiştir (Santos, 1996). Ababouch ve ark. (1991), üç Proteus türü tarafından histamin oluşumunu araştırdıkları çalışmalarında, bu türlerin pH 5.0'te pH 7.0'ye göre ve 25°C' de, 4°C veya 35°C' ye göre daha aktif olduğunu belirlemişlerdir.

1.4.3. NaCl Yoğunluğunun Etkisi

Biyojen amin oluşumunda, ortamın tuz konsantrasyonu önemli bir faktördür. Ababouch ve ark. (1991), üç ayrı Proteus türü ile yaptıkları çalışmalarında, %8 NaCl ilavesinin etkili bir şekilde histidin dekarboksilaz aktivitesini azalttığını belirtmişlerdir. Diğer taraftan, kuvvetli bir histamin oluşturma aktivitesine sahip olarak tanımlanan *Staphylococcus capitis*'in %10'luk NaCl bulunan ortamlarda yaklaşık 400 mg/ml histamin üretebildiği rapor edilmiştir (Hernandez-Herrero ve ark., 1999). *Carnobacterium divergens*'in tiramin üretiminin araştırıldığı bir çalışmada da %10'luk NaCl'ün tiramin oluşumunu inhibe ettiği, potasyum nitrat varlığının ise tiramin oluşumunu etkilemediği belirtilmiştir (Masson veark., 1997). Teodorovic ve ark. (1994), %3.5 tuz veya %0.02 oranında sodyum nitrit katılan guruplar ile, kontrol grubu olarak ilave yapılmamış brotlarda oluşan histamin değerlerinin oldukça benzer olduğunu bulmuşlardır.

1.5. Biyojen amin üretiminin kontrol altına alınması

Balık ve et ürünleri gibi çiğ maddelerin düşük kontaminasyon seviyesine sahip olmalarının ve üretim yerlerindeki hijyenin üst seviyede olmasının sağlanmasıyla yüksek histamin seviyesinden korunmuş olunacağı vurgulanmıştır. Gıdalardaki enzimatik aktiviteyi, dekarboksilaz aktiviteyi ve bakteriyel çoğalmayı önleyerek, biyojen amin üretiminin kontrol altına alınacağı belirtilmiştir. Histaminin yağda kararlı halde bulunması ve bazı dekarboksilaz enzimlerinin pastörizasyonla bile inaktive edilememeleri sonucu, önceden oluşmuş amin seviyelerinin işlem sırasında azaltılamayacağı ve hatta depolama sırasında artabileceği gösterilmiştir (Santos, 1996; Özoğul, 2001).

1.5.1. Depolama Koşulları

Histamin üretimini etkileyen en önemli faktörün ortamın sıcaklığı olduğu ve 10°C ile 20°C arasında önemli derecede histamin birikiminin olabileceği bildirilmiştir. Balık yakalandıktan veya tutulduktan sonra Histamin birikimini önlemenin en basit yolunun, balığın çok kısa bir sürede soğutulması (chilling) ve tüketim noktasına kadar düşük sıcaklıklarda depolanmasıyla olabileceği ve hijyenik bir şekilde işlenmesi ile histamin üretiminin büyük ölçüde azaltılabileceği belirlenmiştir. (Özoğul ve ark., 2004a).

Edmunds ve Eitenmiller (1975), 4°C' de düşük bir histamin seviyesinin üretildiğini ve psikrofilik mikroorganizmaların serbest histidini kolayca dekarboksile etmediğini bildirmiştir. Histamin üretimi 5°C' de büyük ölçüde sınırlanmıştır. Wei ve ark. (1990), ton balığı örneklerinde histamin üretiminin kontrolü için düşük depolama sıcaklığının vakum paketlerden daha önemli olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun sebebinin ise vakum paketlenmiş örneklerin 2°C ve 10°C gibi iki sıcaklık derecesinde genellikle daha yüksek bir histamin seviyesine sahip olmalarından kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Ton balığı infüzyon suyunda histamin üretimi 19°C ve 30°C' deki üretime kıyasla 7°C' de daha düşük olmuştur. Arnold ve ark. (1980), *H. alvei'*nin 19°C' de aerobik, mikro aerofilik veya anaerobik şartlar altında üç gün sonra histamin üretebildiğini rapor etmiştir. Bununla birlikte, özellikle psikrofilik özelliği az olan *Photobacterium* spp. kontaminasyonundan sonra, hafif tuzlanmış ringa balığı filetolarının vakum pakette soğuk derecede tutulması ile yüksek seviyede histamin üretildiği gözlenmiştir. Behling ve Taylor (1982), 7°C' de 72 saat inkübe edilen ton balığı infüzyon solüsyonunda *K. Pneumoniae*'in önemli miktarlarda histamin ürettiğini rapor etmişlerdir. Klausen ve Huss (1987), *M. Morganii*'nin düşük (0- 5°C) ve yüksek sıcaklıklarda (10-25°C) rahatlıkla histamin üretebildiğini bildirmişlerdir.

1.6. Gıdalarda biyojen aminlerin varlığı

Biyojen aminlere, mikrobiyel ve biyokimyasal aktivite için uygun koşulların olduğu durumlarda, serbest amino asit veya protein içeren hemen hemen bütün gıdalarda rastlanabileceği belirtilmiştir (Brink ve ark., 1990; Santos, 1996). Özellikle balık ve balık ürünleri, et ve et ürünleri, peynir gibi çeşitli gıdalarda, bira, şarap, lahana turşusu gibi fermente ürünlerde, önemli miktarda oluştukları bildirilmiştir (Shalaby, 1996).

Balık ve balık ürünlerinin, histamin zehirlenmesinden sorumlu tutulan başlıca gıdalar olduğu değerlendirilmiştir. Bu konu ile ilgili yapılmış bir çok çalışma mevcut olup, bu ürünler üzerinde biyojen amin içerikleri bakımından hassasiyetle durulması gerekliliği vurgulanmıştır (Çolak ve Aksu, 2002). Feier ve Goetsch (1993), hamsi ve tatlı su levreği örneklerinde bazı biyojen aminleri araştırdıkları çalışmalarında, inceledikleri hamsi örneklerinde ortalama putresin, kadaverin, histamin ve tiramin oranlarını sırasıyla 18, 107, 650 ve 111 mg/kg ; tatlı su levreği örneklerinde ise ortalama putresin ve kadaverin oranlarını 83 ve 119 mg/kg seviyelerinde tespit etmişlerdir.

Oda sıcaklığında ve buzda muhafaza edilen sardalyalarda oluşan biyojen aminler üzerine yapılan bir çalışmada da, oda sıcaklığında 24 saat sonra histamin, kadaverin ve putresin miktarları sırasıyla 2350, 1050 ve 300 ppm iken, buzdaki örneklerde histamin ve kadaverin miktarlarının benzer seviyelere 8 gün sonra ulaştığı, putresin oluşumunun ise önemsiz olduğu belirlenmiştir (Rawles ve Flick, 1996).

Veciana-Nogues ve ark. (1996), yarı konserve hamsilerde üretim ve depolamada oluşan değişiklikler üzerine yaptıkları bir çalışmada, salamurada ve yağda paketlenen hamsilerde oda sıcaklığında depolamada, yüksek histamin ve triptamin oluşumu gözlemlenmiş, dondurarak muhafazanın ise biyojen amin oluşumunu önlediği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada da sardalya, uskumru ve ton balığı konservelerinde histamin seviyelerinin genellikle 2000 ppm'den daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Lopez-Sabater ve ark., 1994a).

Pişirilmiş veya çiğ kasaplık hayvan etlerinde de çeşitli biyojen aminlerin varlığı üzerine bazı araştırmalar yapılmıştır. Smith ve ark. (1993), yaptıkları bir çalışmada 120 gün 1°C'de depolanan vakum paketlenmiş sığır etlerinde biyojen amin oluşumu araştırılmış, depolamanın 20. gününden itibaren önemli seviyelerin tespit edildiği bildirilmiştir. Bauer ve ark. (1994), tarafından ise sığır ve domuz etlerinin +4°C'de depolanması süresince tiramin, kadaverin ve putresin miktarlarında artış kaydedilerek; bu biyojen aminlerin miktarının depolamanın 35. gününde 150 mg/kg'ı geçmediği, bozulma gözlemlendikten sonra ise biyojen amin konsantrasyonun 1000 mg/kg'ın üzerine çıktığı belirtilmiştir.

Fermente sucuklarla ilgili yapılan bir çok çalışmada bu ürünlerde biyojen aminlerin önemli miktarlarda bulunabildiği rapor edilmiştir (Hernandez ve ark., 1997; Tschabrun ve ark., 1990). Sucuklarda oluşan en önemli biyojen aminler, putresin, histamin, kadaverin, tiramin, triptamin, β-feniletilamin, spermidin ve spermin olduğu bildirilmiştir (Paulsen ve ark., 1997). Sucuklarda tespit edilen biyojen amin seviyelerinin farklılık göstermesinin temel sebeblerinin konsantrasyon değişikliklerinin, olgunlaşma süresindeki farklılıkların, fermantasyondan sorumlu doğal mikrofloranın dekarboksilaz aktivitesindeki farklılıkların, bazı biyojen amin metabolizması ve biosentezindeki değişikliklerin ve kullanılan etin kalitesindeki büyük farklılıklar gibi faktörlerden ileri geldiği belirtilmiştir (Shalaby, 1995; Shalaby, 1996).

Avusturya'da satışa sunulan fermente sucuklarda yapılan bir çalışmada, benzer sonuçlar rapor edilmiş olup, histamin seviyelerinde görülen farklılığın, üreticiden üreticiye değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Paulsen ve ark., 1997). Finlandiya'da üretilen sucuklarda bulunan biyojen aminlerin araştırıldığı bir çalışmada, tiraminin en sık rastlanılan amin olduğu belirtilerek, 82-110 mg/kg seviyelerinde tespit edildiği bildirilmiştir. Diğer aminlerden histaminin, 1-200 mg/kg, β-feniletilaminin 1-48 mg/kg ve triptaminin 10-91 mg/kg düzeylerinde bulunduğu rapor edilmiştir (Eerola ve ark., 1998).

Hernandez-Jover ve ark. (1997b), tarafından İspanya'daki et ve et ürünlerinin biyojen amin içerikleri üzerine yapılan bir çalışmada, incelenen tüm örneklerde spermin ve spermidin bulunduğu belirtilerek; spermin miktarının 6.4-62.1 mg/kg, spermidinin ise 0.7-13.8 mg/kg arasında değiştiği bildirilmiştir. Örneklerde bulunan tiramin, histamin, putresin ve kadaverin seviyelerinin çok büyük farklılıklar gösterdiği ve özellikle fermente örneklerde bulunduğu belirtilmiştir. Biyojen amin miktarlarının, fermente örneklerde 300 mg/kg'ın üzerine çıkarken, genellikle ısı işlemi görmüş et ürünlerinde düşük seviyelerde (10 mg/kg) bulunduğu rapor edilmiştir. Mısır'da üretilen sucuklar ile yapılan bir araştırmada ise, histamin, putresin ve kadaverin miktarları ortalama olarak sırasıyla; 5.2, 38.6 ve 19.2 mg/kg ; tiramin, triptamin, β-feniletilamin miktarları ortalama olarak sırasıyla 19.2, 12.7 ve 33.2 mg/kg; spermin ve spermidin miktarları ise ortalama 1.7 ve 2.3 mg/kg olarak tespit edilmiştir (Shalaby 1993).

Peynirlerin, biyojen amin miktarları bakımından önem taşıyan gıdalar arasında yer aldığı belirtilmiş ve peynirlerde oluşan en önemli biyojen aminlerin; tiramin, histamin, putresin, kadaverin, triptamin ve β-feniletilamin olduğu bildirilmiştir. Bu aminlerin miktarının, olgunlaşma süresince artmakta olduğu vurgulanmıştır (Ordonez ve ark., 1997; Shalaby, 1996). Vale ve Gloria (1998) ise Brezilya'da üretilen peynirlerde yaptıkları incelemelerde örneklerin tümünde spermin bulunduğunu tespit etmişler; kadaverin, tiramin, histamin ve putresin miktarlarının sırasıyla 111, 21.25, 19.65 ve 17.37 mg/100 g olduğunu bildirmişlerdir. Spermin, agmatin, β-feniletilamin, serotonin, spermidin ve triptamin ise 4.1 mg/100g'dan daha düşük olarak saptanmıştır.

Bira ve şarap gibi fermente içkiler, çeşitli biyojen aminleri önemli miktarlarda içerebildikleri bildirilmiştir. Buiatti ve ark. (1995), inceledikleri alkollü ve alkolsüz bira örneklerinde histamin, tiramin, triptamin, β-feniletilamin, putresin, kadaverin, spermin ve spermidinin varlığını araştırmışlar, histaminin ve sperminin saptanamadığı çalışmada, diğer altı amin miktarının 0.1 ppm ile 17.2 ppm arasında değişiklik gösterdiği belirlemişlerdir. Tiramin ve putresinin en yüksek düzeylerde tespit edildiği çalışmada, alkollü ve alkolsüz bira örnekleri arasında biyojen amin miktarları yönünden önemli bir fark bulunamamıştır. Şaraplarda yapılan bir çalışmada, beyaz,

kırmızı ve pembe şaraplarda histamin, tiramin, putresin ve kadaverin miktarları araştırılarak, bu aminlerin en fazla kırmızı şarap örneklerinde sırasıyla, 4.67, 3.38, 7.8, ve 0.54 mg/l düzeyinde olduğu rapor edilmiştir. Kırmızı şarapların, beyaz şaraplara göre daha yüksek biyojen amin düzeyine sahip olduğu bildirilmektedir (Denli ve Anlı, 1998).

Lahana turşusu ile yapılan çeşitli çalışmalarda, histamin düzeyinin 24.4-100 mg/kg arasında, putresin miktarının ise 150 mg/kg'ın üzerinde bulunabildiği rapor edilmiştir (Hornero-Mendez ve Garrido-Fernandez, 1997). Kalac ve ark. (1999), inceledikleri fermente sebzelerde ortalama tiramin, putresin ve kadaverin miktarlarının sırasıyla 174, 146 ve 50 mg/kg olduğunu, histaminin ise 7.8 mg/kg olarak tespit edildiğini bildirmişler; triptamin, spermidin ve özellikle spermin miktarlarının oldukça düşük bulunduğunu belirtmişlerdir. Hornero-Mendez ve Garrido-Fernandez (1997) ise çeşitli fermente sebzelerin salamuralarında, yüksek konsantrasyonda putresin başta olmak üzere, farklı düzeylerde biyojen amin tespit etmişlerdir.

Mandalina, portakal, limon, ahududu, çilek, üzüm ve greyfurttan elde edilen meyve suları veya nektarlarının, değişik konsantrasyon ve yapıda biyojen amin içerebildikleri belirlenmiş ve bunların başında ise putresinin gelmekte olduğu vurgulanmıştır (Santos, 1996; Shalaby, 1996). Ayrıca, kakao tanelerinde ve kakaodan yapılan çikolata, çikolata ürünleri ve şekerlemelerde doğal olarak β-feniletilamin bulunabileceği bildirilmiştir. Alglerden (su yosunları) yapılan karamela veya şekerlemelerde ise histamin ve kadaverine rastlanmıştır (Santos, 1996).

1.7. Halk sağlığı açısından biyojen aminlerin önemi

İnsan ve hayvanların biyolojik fonksiyonlarında önemli role sahip olan biyojen aminlerin, gıdalarla fazla miktarda alındıklarında toksik etkiler gösterebildikleri belirlenmiştir (Santos, 1996; Shalaby, 1996). Genel olarak biyojen aminlerin neden olduğu en sık görülen toksik etkiler; baş ağrıları, hipotansiyon veya hipertansiyon ve çeşitli alerjik reaksiyonlardır. Daha ciddi durumlarda ise intracerebral hemoraji ve ölüm olaylarının da meydana gelebildiği bildirilmiştir (Buatti ve ark., 1995).

Biyojen aminlerin neden olduğu zehirlenmelerden en sık görüleni histamin ve tiramin zehirlenmesidir (Jooesten ve Nunez, 1996). Histamin biyolojik olarak aktif bir amin olup, insan vücudu içerisinde birçok tepkimelere yol açabildiği gözlemlenmiştir. Histaminin kalp-damar sistemi ve çeşitli salgı bezlerindeki hücre membran reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterdiği, böbrek üstü bezlerindeki etkisinin bir sonucu olarak kalbi etkileyip, uterus, bağırsak ve solunum bölgelerindeki düz kasları, duyu ve motor sistemini harekete geçirdiği ve gastrik asit salgısını kontrol altına aldığı bildirilmiştir (Joosten, 1988). Bu nedenle histamin zehirlenmesinin genellikle çok geniş bir semptom çeşitliliğiyle sahip olduğu vurgulanmıştır.

En yaygın görülen semptomların ishal, mide bulantısı, kusma, deride kızarıklık ve ödem, kaşıntı, çınlama ve baş ağrısı olduğu belirtilmiştir. Histamin balık zehirlenmesi ile ilgili semptomların toksik miktarların emiliminden birkaç dakika veya birkaç saat sonra görülmeye başlandığı belirlenmiştir. Tipik olarak intoksikasyonun birkaç saat sürdüğü ve bununla birlikte bu sürenin birkaç güne kadar da uzayabileceği bildirilmiştir (Özoğul, 2001; Taylor, 1986).

Gıdalardaki küçük miktardaki histaminin canlı metabolizmasındaki enzimatik aktivite ile kolayca tolere edilebileceği gözlemlenmiştir. Sindirim yoluyla alınan ve/veya bağırsak bakterileri tarafından oluşturulan histamini metabolize etmek için bağırsaklarda oldukça etkili bir detoksifikasyon sisteminin mevcut olduğu belirlenmiştir. Detoksifikasyon sisteminde diamin oksidaz, monoamin oksidaz, N-metil transferaz gibi enzimlerin bulunduğu ve bu enzimlerin histamini toksik olmayan ürünlere dönüştürmekte kullanıldığı tespit edilmiştir. Ancak, yüksek

miktarlarda biyojen amin alımının, detoksifikasyon metabolizmasının çeşitli farmakolojik ajanlar (sıtma tedavisinde kullanılan ilaçlar, antidepresif etkili ilaçlar vb.) ile inhibe edilmesinin, genetik olarak detoksifikasyon enzimlerinin eksikliğinin, gastrointestinal rahatsızlıkların ve alkol bağımlılığının detoksifikasyon sisteminin çalışmamasına ve çeşitli derecelerde gıda zehirlenmelerinin ortaya çıkmasına yol açabildiği vurgulanmıştır. Özellikle duyarlı bireylere tedavi amacıyla monoamin oksidaz inhibitörlerinin verilmesi veya çok yüksek düzeyde histamin içeren gıdaların tüketilmesi ile bu detoksifikasyon sisteminin inaktive olduğu ve çeşitli derecelerde intoksikasyon ve allerjik reaksiyonların ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Shalaby, 1996; Hornero-Mendez ve Garrido, 1997; Kalac ve ark., 1999; Roig- Sauges ve ark., 1997; Hernandez ve ark., 1997b).

Bozulmuş veya fermente olmuş ürünlerdeki yüksek histamin varlığının, detoksifikasyon sistemi tarafından tolere edilemediği gösterilmiştir (Brink ve ark., 1990). Ayrıca, gıdalarda biyojen aminlerin bir arada bulunuşunun da toksik etkilerin ortaya çıkmasında önemli olduğu belirlenmiştir (Hornero-Mendez ve Garrido, 1997). Tiramin MAO, triptamin DAO, β-feniletilamin, DAO ve HNMT enzimlerini inhibe ettikleri ortaya konmuştur (Ornodez ve ark, 1997). Spermin ve spermidin ise gastrointestinal duvardan histamin geçişini arttırdığı tespit edilmiştir. Bir öğünde, 40 mg'ın üzerinde biyojen amin alınmasının, potansiyel toksik etkide olduğu değerlendirilmiştir (Shalaby, 1996). Gıdalarda, 1000 mg/kg oranında amin bulunmasının ise sağlık açısından tehlike oluşturduğu bildirilmiştir (Santos, 1996).

Histamin, balık, peynir, et ürünleri gibi gıdalarda tespit edilmiş en toksik amin (Brink ve ark., 1990) olup; etkisini, kardiovasküler sistem ve çeşitli salgı bezlerinin selüler membranlarında bulunan reseptörlere bağlanmak suretiyle gösterdiği belirlenmiştir (Shalaby, 1996). Histamin zehirlenmesinin, Amerika Birleşik Devletleri'nde deniz ürünlerinin tüketimi ile oluşan intoksikasyonların ilk üçü arasında bulunduğu bildirilmiştir (Ben-Gigirey ve ark., 1998b).

Çizelge 1. 4. Scombroid balık zehirlenmesine neden olan balık türleri (Wu ve ark., 1997).

Familya	Cins ve Türler
Scombridae	*Thunnus thunnus*
	Euthynnus pelamis
	Auxis thazard
	Sarda sarda
	Scomber scombus
	Scomber japonicum
Xiphiidae	*Xiphias gladius*
Pomatomidae	*Pomatomus saltator*
Coryphaenidae	*Coryphaena hippurus*
Clupeidae	*Sardina pilchardus*
	Sardinella aurita
Engraulidae	*Engraulis encrasicolus*

Tiramin, triptamin ve ß-feniletilaminin, vasoaktif etkilere sahip olduları ve özellikle gıdalardaki tiramin toksikolojik etkisinin çok önemli olduğu vurgulanmıştır. Tiraminin (pressör amin) kendi başına toksisitesinin az olmasına rağmen özellikle monoamin oksidaz inhibitör (MAOI) ilaçlar ile reaksiyona girerek alerjik etkilere neden olabildiği bulunmuştur (Marine-Font, 1978). Tiraminin, temel olarak sempatik sinir sistemini etkileyerek, periferal vazokonstrüksiyon ile kan basıncını ve kan şekerini arttırdığı, göz bebeğini ise büyüttüğü belirtilmiştir. Monoamin oksidaz enziminin oksidatif olarak kandan alınan aminleri deamine ederek insanlarda kana ulaşmadan önce amin miktarının tolere edilebilir düzeylere düşmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (Joosten, 1988).

Birçok peynirde tiraminin yüksek oranlarda bulunması sonucu tüketimine bağlı olarak "peynir reaksiyonu" olarak bilinen şiddetli bir baş ağrısına ve beyin kanaması veya kalp-damar problemlerine neden olabildiği bildirilmiştir (Smith, 1980). Peynirin, monoamin oksidaz inhibitör (MAOI) ilaçlarla tedavi gören hastalarda hipertansif rahatsızlıklara neden olan başlıca gıda olduğunu bildirilmiştir (Shalaby, 1996; Taylor, 1986).

Putresin, kadaverin gibi diaminler ise nitritlerle reaksiyona girme yatkınlıkları ve potansiyel karsinojen nitrozaminler oluşturma riskleri nedeniyle, mutajenik öncül

maddeler olarak değerlendirilmiştir (Bover-Cid ve ark., 2000; Hernandez-Jover ve ark., 1997b; Ornodez ve ark., 1997). Bu aminlerin, ısıyla nitrozopirolidin ve nitrozopiperidin meydana getirerek, pirolidin ve piperidine dönüştüğü belirlenmiştir. Bu yüzden pişirme işleminin (kızartma), serbest nitrozamin bulunan çiğ ürünlerde, bu maddelerin oluşumununu arttırabildiği vurgulanmıştır (Shalaby, 1996).

En bilinen karsinojenik nitrozaminleri oluşturan diğer aminlerin ise agmatin ve poliaminlerden spermin ve spermidin olduğu bildirilmiştir. Bunların, en çok balık, et ve sebze ürünlerinde oluştukları belirlenmiştir. Gıdada bir kez amin oluşumu meydana geldikten sonra inaktivasyonunun oldukça güç olduğu (Santos, 1996) ve yüksek sıcaklık uygulamaları ile mevcut biyojen amin miktarında önemli bir azalmanın meydana gelmediği bulunmuştur (Shalaby, 1996).

1.7.1. Histamin İçin İzin Verilebilir Limitler:

Gıda ve gıda ürünlerinde histamin ve diğer biyojen aminlerin varlığıyla ilişkili kalite kriterlerinin teknolojik ve toksikolojik açıdan çok önemli olduğu vurgulanmıştır. Biyojen aminlerin toksikolojik seviyesini belirlemek, bireysel karakteristiklerden ve diğer aminlerin varlığından dolayı oldukça zor olduğu belirtilmiştir. Amin-oksidaz inhibe edici ilaçların, alkol ve mide-bağırsak hastalıkları gibi diğer risk faktörlerinin histamin ve diğer aminlerin eşik noktasını belirlemede önemli olduğu bildirilmiştir (Shalaby, 1996). Bartholomew ve ark. (1987) İngiltere'de 1976'dan 1986'a kadar balık kaynaklı histamin zehirlenmesiyle ilgili 250 şüpheli vakanın olduğu bir araştırmaya dayanarak histamin için bir limit doz belirlemişlerdir. Her 100 g balık için bu limit sınırlar, 5mg'dan düşük ise balığın tüketimi güvenli, 5-20 mg arasında ise balık muhtemelen toksik, 20-100 mg arasında ise balık büyük olasılıkla toksik, 100mg'dan daha fazla ise balığın toksik ve tüketiminin tehlikeli olduğu şeklinde belirlenmiştir.

Ünlütürk ve Ünlütürk, (1981) 70 kg'lık bir insanda histaminin üst sınırı 5-6 g iken; 8-40 mg hafif zehirlenme, 70-1000 mg orta, 1500-4000 mg ağır zehirlenmeyi işaret ettiği belirtmişlerdir. Ancak histamin miktarına karşı vücut direncinin bireylere göre değişiklilik gösterdiği bildirilmiştir (Clifford ve ark., 1991).

Çizelge 1.5. Balıklardaki histamin miktarına göre etki dereceleri (Ünlütürk ve Ünlütürk, 1981).

Histamin miktarı (mg/100g)	Etki derecesi
5	Normal
05.Eki	Orta şiddette
10-100	Toksik
> 100	Çok toksik

Avrupa Birliği direktif No. 91/493'e göre benimsenmiş histamin miktarları aşağıdaki gibidir (Anon, 1991).

1-) Alınan 9 örnekten 7'sindeki histamin miktarı; 10 mg/100g'dan fazla olmamalıdır.

2-) Alınan 9 örnekten diğer 2'sinin histamin miktarı; 10-20mg/100g'dan fazla olmamalıdır.

3-) Analiz edilen tüm Balık örneklerindeki histamin miktarı; 20 mg/ 100g'dan fazla olmamalı şeklindedir.

Son olarak FDA (Food Drug Administration) ton balığı Mahi-mahi ve benzer türlerdeki balıklardaki toksisite seviyesinin 50 mg/100g, defekt oluşum limitinin ise 5 mg/100g olduğunu rapor edilmiştir (Anon, 1998). Türkiye'de ise Gıda Kodeksi' nde, Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ'e göre histamin miktarının balıklarda (uskumru, sardalya vb.) 100 mg/kg'ı, şaraplarda 10 mg/kg'ı aşmaması gerektiği belirtilmiştir (Anon, 2002).

1.7.2. Kadaverin ve Putresin için İzin Verilen Limitler:

Balık ve balık ürünlerinde oluşan kadaverin ve putresin gibi biyojen aminlerin toksik dozu tam olarak bilinmemekle birlikte, bir öğünde alınan en az 40 mg biyojen aminin potansiyel olarak toksik olduğunun düşünüldüğü belirtilmiştir. (Shalaby, 1996). Kalite kontrol maksadıyla, konserve ton balığındaki putreaktif amin seviyesinin 0.4 ile 0.5 µg /g olduğu belirlenmiştir (Sims ve ark., 1992). Spanjer ve Weber (1991), balık ve balık ürünlerinde histamin, putresin ve kadaverin toplamının 300 mg/kg ile sınırlandırılması gerektiğini önermiştir.

1.7.3. Tiramin için izin verilen limitler:

Tiraminin toksik dozu hakkında fazla bir bilgi mevcut olmamasına rağmen tiramin için eşik değer 100-800 mg/100 g olarak rapor edilmiştir (Brink ve ark.,1990).

1.8. Biyojen aminlerin analizinde kullanılan yöntemler

Gıdalarda biyojen amin miktarlarının ölçülmesinde birçok teknikten yararlanıldığı bildirilmiştir. Özellikle High pressure liquid chromatography'nin (HPLC) analitik ayırım teknikleri ile en yaygın kullanılan cihaz olduğu belirtilmiştir.Yaygın kullanımlarının başlıca sebebleri arasında duyarlılığının yüksek olması, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması ve uçucu olmayan veya ışık ve sıcaklıkla kolaylıkla bozulabilen bileşiklerin (amino asitler, proteinler, nükleik asitler v.b.) ayrılmasına uygun olması şeklinde açıklanmıştır (Hwang ve ark., 1997; Veciana-Nouges ve ark., 1995).

HPLC dışında biyojen amin tespitinde kullanılan yöntemler arasında, (GC) gas chromatography (Du ve ark., 2002), thin-layer chromatography (Naguib ve ark.,1995), liquid chromatography (LC) (Veciana-Nouges ve ark., 1995), Micellar electrokinetic chromatography (Rodriguez ve ark., 1996), oxygen-sensor based assay (Ohashi ve ark., 1994), copper chelation assay (Bateman ve ark., 1994), enzyme-based screening assay (Ben- Gigirey ve ark., 1998b), dipstick test (Hall ve ark., 1995), Capillar

electrophoretic analysis (Mopper ve Sciacchitano, 1994) ve ELISA'nın (Serrar ve ark., 1995) yer aldığı bildirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, Gökkuşağı alabalıklarında (*Onchornycus mykiss*) histamin, putresin ve kadaverin biyojen aminlerinin saptanmasıdır. Bu maksatla canlı alabalık satan işletmelerden alınan balıklar 0. gün ve 3. günlerde HPLC ile analize tabi tutulmuşlardır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örnek alabalıklar

Taze alabalıklar, canlı olarak toplam 100 adet olacak şekilde canlı balık satan işletmelerden haftada 20 adet olacak şekilde 5 parti şeklinde alınmıştır. İlk gün ve 3. günde olmak üzere ayrı ayrı her parti, alındıkları gün ve +4ºC' de 3 gün süreyle depolandıktan sonra analize tabi tutulmuştur.

2.1.2. HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) Cihazı

Bu çalışmada analizler için, askeri bir hastanenin araştırma geliştirme laboratuarlarında bulunan, tip ve özellikleri çift pompalı, kolon fırınlı, mono enjektörlü ve 254 nm'ye ayarlanmış ultraviole dedektör (UV- Vis) sistemine sahip, Agilent 1100 marka sıvı kromatografi cihazı (Agilent, Santa Clara, ABD) kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

Bu çalışma, alabalık örneklerindeki histamin, putresin ve kadaverin miktarlarının belirlenmesinde Yen ve Hsieh, (1991) ve Hwang ve ark. (1997)' nın geliştirdikleri analiz yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır.

2.2.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Histamin dihidroklorür (H7250), Putresin dihidroklorür (P7505) ve Kadaverin dihidroklorür (C8561) 5'er gram'lık şişelerde Sigma (St. Louis, ABD) firmasından; LiChrosolv Metanol (1.06007.2500), TCA asit (1.00807.0250), Dietil eter (1.00926.5000), Benzol klorür (8.01004.1000), NaOH (1.06498.0500), HCl (1.00317.2500) ve NaCl (1.06404.1000) Merck (Darmstat, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

2.2.2.Standart amin solusyonunun hazırlanması

Standart solusyon, her amin için final konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde 50 ml'lik 0.1 *M* HCl içinde 91.5 mg putresin dihidroklorür, 85.7 mg kadaverin dihidroklorür ve 82.6 mg histamin dihidroklorür çözdürülerek hazırlanmıştır.

2.2.3. Standart aminlerin kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Hazırlanmış olan standart amin solusyonu 0,1mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml ve 1.0 mg/ml şekilde sulandırılmıştır. Her bir sulandırmadan 10 ml'lik santrifüj tüplerine 2 ml alınarak üzerine 1 ml 2 *M* NaOH ve 10 µl benzol klorür ilave edilerek 30 ºC'de 40 dakika benzolasyona (türevlendirme) tabi tutulmuştur. Benzolasyon 2 ml doymuş tuzlu su ilavesi ile durdurulduktan sonra 3 ml diEtil eter ile 3500 devirde 20 dakika santifüjde tutularak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerde görülen üst organik tabaka başka tüplere aktarılarak karanlık ortamda 5 ile 10 dakika arası eterin buharlaşarak bir residü bırakması sağlanmıştır. Bu residüye 1 ml metanol katılarak çözdürülmesi sağlanıp, 20 µl'lik kısımları HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Çıkan sonuçlara göre Microsoft excel programından yararlanılarak her standart amin için ayrı ayrı kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır.

2.2.4. Biyojen aminlerin HPLC ile Dağılımı

Aminlerin dağılımı, Agilent 1100 sıvı kromatograf (Agilent, Clara, ABD) olan tip ve özellikleri çift pompalı, kolon fırınlı, mono enjektörlü ve 254 nm'ye ayarlanmış ultra viole dedektör (UV- Vis) sistemine sahip bir HPLC (High Performance Liquid Chromatography) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Dağılım için kullanılan kolon, Diaspher 110 C18 olup, 250 x 4mm boyutlarında ve 5µm çapındadır (Biochemmack, Moskova, Rusya). Enjektör, 50µl'lik olup yine Agilent markadır. Dağılımın tespitinde gradient program kullanılmamış olup % 60 metanol ve % 40 su karışımının, 0.8 ml/dk'lık akış hızı ile kolondan geçmesi sağlanmıştır. Mobil

(hareketli) faz metanoldür. Bu şekilde yapılan her enjeksiyon 254 nm'de bazal çizgi tekrar kararlı hale gelinceye kadar sürmüş ve 34. dakikada sonlandırılmıştır.

2.2.5. Biyojen aminlerin balık örneklerinden geri kazanımı

Alabalık numuneleri pulları ve derisi ayrıldıktan sonra 5g'lık kas dokusu balığın bütününü temsil edecek şekilde ense, sırt ve kuyruk bölümlerinden alınarak parçalanıp 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Her standart aminden 10 mg ve 20 ml % 6'lık trikloroasetik asit (TCA) ilave edildi ve bıçaklı homojenizatör ile homojenize edildi. Daha sonra +4ºC' de 10 dakika süreyle 8000 *g'* de santrifüj işlemine tabi tutuldu. Homojenat, Whatman No.2 süzgeç kağıdından süzülerek filtrat (süzüntü) 50 ml'ye tamamlandı. Bu solusyondan alınan 2 ml'lik bölümler 1 ml 2 *M* NaOH ve 10 µl benzol klorür ilave edilerek 30 ºC'de 40 dakika benzolasyona tabi tutuldu. Benzolasyon 2 ml doymuş tuzlu su ilavesi ile durdurulduktan sonra 3 ml diEtil eter ile 3500 devirde 20 dakika santifüjde tutularak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası tüplerde görülen üst organik tabaka başka tüplere aktarılarak karanlık ortamda 5 ile 10 dakika arası eterin buharlaşarak bir residü bırakması sağlandı. Bu residü 1 ml metanol ile çözdürülüp, 20 µl'lik kısımları HPLC cihazına enjekte edildi ve biyojen aminlerin balık örneklerinde geri kazanımına bakıldı. Bu işlemler aynı balıklar üç gün +4ºC' de bekletildikten sonra balıkların sağlam olan diğer yüzlerinden alınan kas dokusuyla tekrarlandı.

2.2.6. Alabalık örneklerinin analizi

Bu çalışmada toplam 100 numune canlı olarak havuzlardan alındığı gün ve +4ºC'de üç gün muhafaza edilerek, süre sonunda analiz edilmişlerdir.

Her alabalıktan alınan 5 gr'lık kas dokusu parçalanıp, 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. 20 ml % 6'lık TCA içinde bıçaklı homojenizatör ile kas dokuları iyice homojenize edildi. Tüpler +4ºC'de 10 dakika süreyle 8000 *g'* de santrifüj işlemine tabi tutuldu. Elde edilen homojenat, süzülerek filtrat (süzüntü) 50 ml'ye tamamlandı. Bu solusyondan alınan 2 ml'lik bölümler sırasıyla benzolasyon ve ekstraksiyon işlemlerine

tabi tutularak hazırlanan 1ml'lik solüsyonlardan 20 µl'lik enjeksiyonlar yapılarak sonuçlar elde edildi.

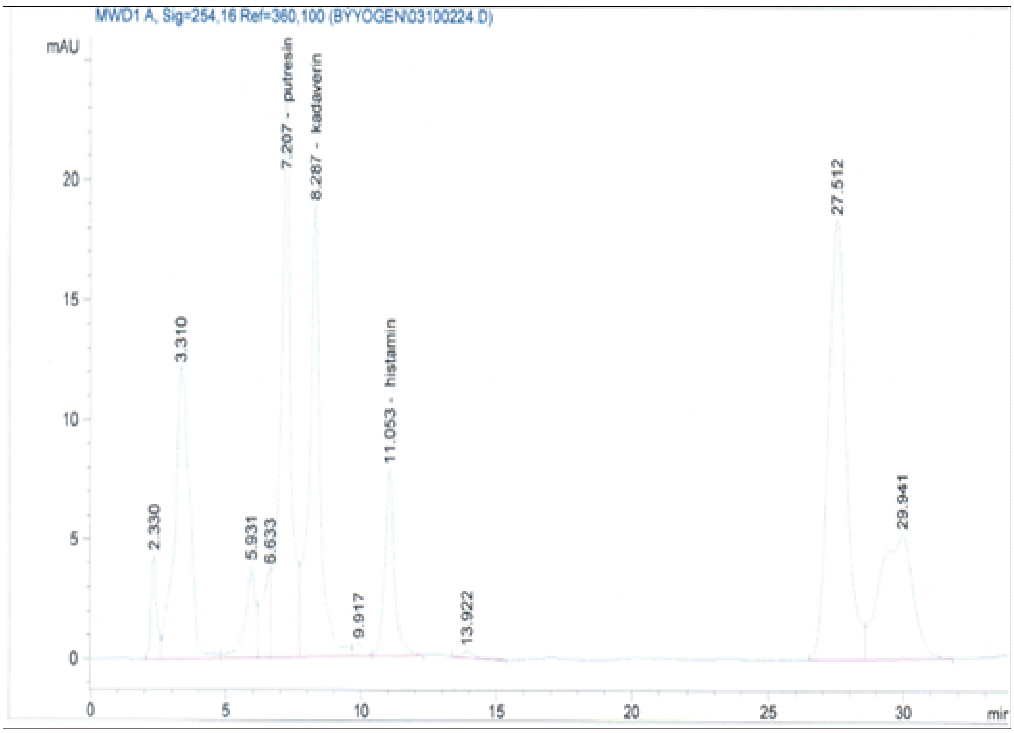
2.2.7. İstatistiksel değerlendirme

İstatiksel olarak eşleşmiş gruplarda t-testi yöntemi kullanılmıştır (Sümbüllüoğlu ve Sümbüllüoğlu, 1997). Hesaplama ise SPSS 10.0 / software paket bilgisayar programı ile yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Standart aminlerin kromatografik profili

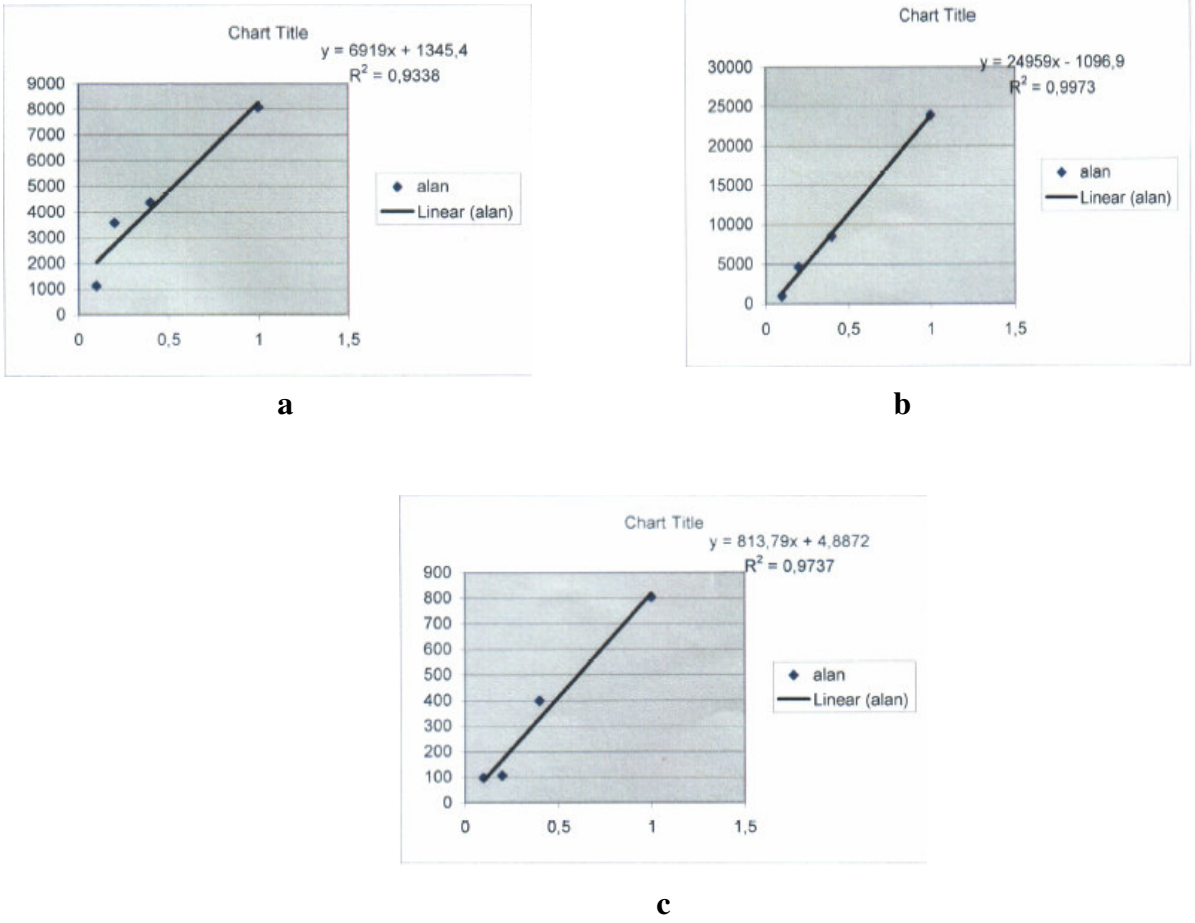
Her bir amin için hazırlanan standart amin solusyonu kullanılarak yapılan enjeksiyonlar sonucu her standartın retensiyon süreleri saptanarak tekrar edilebilirlik kontrol edilmiş ve daha sonra miks standart amin solusyonu kullanılarak kromatografik profil ortaya konulmuştur.



Şekil. 3.1. Biyojen aminlerin kromatografik dağılımı

Her üç amininde toplam 14 dakika içinde pik verdiği ve iyi şekilde dağılım gösterdikleri belirlenmiştir. Kullanılan HPLC cihazının mono enjektörlü ve kolonun 250 mm uzunluğunda olması her bir enjeksyonun 34 ile 40 dakika arasında sonlanmasına neden olmuştur. Bir günde en az 10 enjeksiyon yapılmıştır.

Her bir amin için standart kalibrasyon eğrisi 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml ve 1.0 mg/ml konsantrasyonları kullanılarak hazırlanmıştır. Microsoft excel programından yararlanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrileri ve elde edilen korelasyon katsayıları (r^2) şekil 3.2.'de verilmiştir. Bu sonuçlar ışığında dedektör cevabıyla amin konsantrasyonu arasında linear bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.



a **b**

c

Şekil. 3.2. Putresin, kadaverin ve histaminin (a, b ve c) kalibrasyon eğrileri

3.2. Geri kazanım

Geri kazanım; Histamin için %100 ± 5, Putresin için %80 ± 5 ve Kadaverin için %75 ± 5 olarak tespit edilmiş ve böylelikle kullanılan ekstraksiyon metodunun etkili olduğu belirlendi.

3.3. Biyojen aminlerin tespit seviyeleri

Alabalık örneklerinde yapılan analizler sonucunda ilk gün ve üçüncü günlerde histamin belirlenmiş, putresin ve kadaverin ise ya çok az yada hiç tespit edilememiştir. Yapılan denemeler sonucunda 3 gün süreyle +4 ºC'de bekletilen balıkların % 67'sinde histamin düzeyinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Örneklerin % 33'ünde ise azalma tespit edilmiştir Azalmanın histamin derivatlarının zamanla stabilitelerini kaybetmemelerinden kaynaklanabileceğinden ileri gelebileceği değerlendirilmektedir (Çizelge 3.3. ve Çizelge 3.4.)

Çizelge 3.3. Üçüncü gün histamin seviyesinde azalma görülen örnekler (mg/100g)

	İlk Gün			Üçüncü Gün		
Örnek No	**Histamin**	**Kadaverin**	**Putresin**	**Histamin**	**Kadaverin**	**Putresin**
2	0,511	yok	yok	0,401	yok	yok
5	0,151	yok	yok	0,0681	yok	yok
8	0,403	yok	yok	0,116	yok	yok
10	1,22	yok	yok	0,131	yok	yok
12	0,637	yok	yok	0,211	yok	yok
13	0,563	yok	yok	0,439	yok	yok
14	0,29	yok	yok	0,0836	yok	yok
15	0,0873	yok	yok	0,0426	yok	yok
16	0,461	yok	yok	0,179	yok	yok
17	0,523	yok	yok	0,0463	yok	yok
18	0,314	yok	yok	0,0314	yok	yok
19	0,449	yok	yok	0,1309	yok	yok
20	1,04	yok	yok	0,0597	yok	yok
21	0,354	yok	yok	0,0979	yok	yok
22	0,467	yok	yok	0,0889	yok	yok
23	0,146	yok	yok	0,0509	yok	yok
24	2,46	yok	yok	0,1407	yok	yok
25	0,104	yok	yok	0,0613	yok	yok
26	0,416	yok	yok	0,168	yok	yok
27	0,216	yok	yok	0,163	yok	yok
28	2,89	yok	yok	0,0831	yok	yok
29	0,607	yok	yok	0,227	yok	yok
30	0,203	yok	yok	0,167	yok	yok
40	0,256	yok	yok	0,207	yok	yok
41	0,654	yok	yok	0,228	yok	yok
42	1,34	yok	yok	0,188	yok	yok
43	0,393	yok	yok	0,238	yok	yok
44	0,819	yok	yok	0,081	yok	yok
45	0,196	yok	yok	0,15	yok	yok
46	0,527	yok	yok	0,249	yok	yok
47	0,756	yok	yok	0,11	yok	yok
48	0,896	yok	yok	0,196	yok	yok
50	1,77	yok	yok	0,496	yok	yok

Çizelge 3.4. Alabalık örneklerinde tespit edilen biyojen amin seviyeleri (mg/100g)

	İlk Gün			Üçüncü Gün		
Örnek No	**Histamin**	**Kadaverin**	**Putresin**	**Histamin**	**Kadaverin**	**Putresin**
1	0,287	yok	yok	0,17	yok	yok
3	0,167	yok	yok	0,925	yok	yok
4	0,0897	yok	yok	0,64	yok	yok
6	0,0777	yok	yok	0,289	yok	yok
7	0,41	yok	yok	0,63	yok	yok
9	0,44	yok	yok	0,454	yok	yok
11	0,0849	yok	yok	0,146	yok	yok
32	0,131	yok	yok	0,537	yok	yok
33	0,0957	yok	yok	0,903	yok	yok
34	0,157	yok	yok	1,36	yok	yok
35	0,178	yok	yok	0,368	yok	yok
36	0,139	yok	yok	0,361	yok	yok
37	0,0674	yok	yok	0,56	yok	yok
38	0,0817	yok	yok	0,375	yok	yok
39	0,163	yok	yok	2,06	yok	yok
49	0,151	yok	yok	0,234	yok	yok
51	0,208	yok	yok	0,268	yok	yok
52	0,244	yok	yok	1,85	yok	yok
53	0,306	yok	yok	0,547	yok	yok
54	0,0955	yok	yok	0,173	yok	yok
55	0,0748	yok	yok	0,15	yok	yok
56	0,155	yok	yok	1,31	0,0289	yok
57	0,149	yok	yok	0,258	yok	yok
58	0,00177	yok	yok	0,404	yok	yok
59	0,109	yok	yok	0,62	yok	yok
60	0,14	yok	yok	0,861	yok	yok
61	0,1404	yok	yok	0,265	yok	yok
62	0,0683	yok	yok	0,502	yok	yok
63	0,428	yok	yok	1,47	yok	yok
64	0,214	yok	yok	0,32	yok	yok
65	0,374	yok	yok	0,534	yok	yok
66	0,1403	yok	yok	0,824	yok	yok
67	0,166	yok	yok	0,366	yok	yok
68	0,6104	yok	yok	0,348	yok	yok
69	0,427	yok	yok	0,499	yok	yok
70	0,629	yok	yok	0,619	yok	yok
71	0,12	yok	yok	0,225	yok	yok
72	0,217	yok	yok	1,57	yok	yok
73	yok	yok	yok	1,34	yok	yok
74	0,176	yok	yok	2,22	yok	yok
75	0,162	yok	yok	0,916	0,0291	yok
76	0,049	yok	yok	0,883	yok	yok
77	0,0579	yok	yok	15,76	yok	yok
78	0,109	yok	yok	0,582	0,028	yok
79	0,18	yok	yok	0,582	yok	yok
80	0,172	yok	yok	0,245	0,0283	yok
81	4,4	yok	yok	5,85	yok	yok
82	3,26	yok	yok	3,06	0,028	yok
83	0,237	yok	yok	82,46	0,0419	0,000518
84	0,51	yok	yok	5,05	0,0317	yok
86	3,43	yok	yok	3,54	0,0304	yok
87	3,03	yok	yok	3,11	0,0279	yok
88	0,559	yok	yok	3,52	yok	yok
89	2,21	yok	yok	3,14	0,0389	yok
90	2,95	yok	yok	4,49	0,028	yok
91	0,635	yok	yok	4,61	yok	yok
92	0,721	yok	yok	5,11	0,0466	yok
93	1,51	yok	yok	10,98	0,0383	yok
94	1,51	yok	yok	2,1	0,0319	yok
95	2,13	yok	yok	1,64	0,039	yok
96	1,75	yok	yok	3,89	0,0341	yok
97	0,686	yok	yok	2,52	0,0288	yok
98	0,713	yok	yok	5,09	0,0287	yok
99	1,24	yok	yok	5,26	0,0511	yok
100	1,7	yok	yok	7,4	0,0296	yok

Alınan 100 numunenin ortalama olarak ilk gündeki histamin miktarı 0,669 ± 0,089 mg/100g, üçüncü gün ise 2,395 ± 0,250 mg/100g olarak hesaplanmıştır. Üç gün süreyle depolanan alabalıklarda kadaverin, yanlızca 20 örnekte ortalama 0,0335 mg/100g düzeyinde tespit edilmiştir. Putresine ise 3. günde sadece bir örnekte 0,000518 mg/100g düzeyinde rastlanılmıştır. Balıklardaki olası bakteriyel kontaminasyon oranı, otolitik aktivite ve bekleme periyoduna bağlı olarak histamin miktarlarında kısmen bir artış olabileceği şeklinde değerlendirme yapılmıştır.

İstatiksel olarak yapılan değerlendirmede, histamin için ilk gün ile üçüncü gün arasındaki mevcut farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$), ancak putresin ve kadaverin için istatiksel değerlendirme yapılmamıştır. İstatiksel değerler çizelge. 3.5.'deki gibidir.

Çizelge 3. 5. İstatistiksel sonuçlar

GÜN	ÖRNEK SAYISI	ORTALAMA ± STANDART HATA	P
0	100	0,669 ± 0,089	**
3	100	2,395 ± 0,25	**

** $p < 0,01$

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Ankara'da canlı alabalık satan işletmelerden alınan 100 örnekte ortalama olarak ilk gündeki histamin miktarı 0,669 ± 0,089 mg/100g, +4ºC'de üç gün muhafaza edilen örneklerde ise 2,395 ± 0,250 mg/100g olarak bulunmuştur. Kadaverin, yanlızca 20 örnekte 3. gün yapılan analizler sonucu ortalama 0,0335 mg/100g düzeyinde tespit edilmiştir. Putresin ise 3. günde sadece bir örnekte 0,000518 mg/100g düzeyinde rastlanılmıştır. Tespit edilen histamin miktarlarının Avrupa Birliği, FDA ve Türk gıda kodeksi yönetmeliğindeki histamin için geçerli olan yasal sınırların çok altında kaldığı görülmüştür.

Biyojen amin oluşumunda; gıdanın mikrobiyolojik kalitesi ve kontaminasyon düzeyi ile gıdaya ısı işlemi uygulanıp uygulanmaması; ortamda bulunan dekarboksilaz pozitif mikroorganizma miktarı, dekarboksilatif enzimler için gerekli olan kofaktörlerin varlığı, serbest amino asit miktarı ile ortamın pH değeri gibi faktörlerin dışında depolama şartlarının yetersiz ve elverişsiz olması ile depolama sıcaklığının önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Masson ve ark., 1997).

Veciana-Nogues ve ark. (1995), yaptıkları çalışmada balık örneklerinin donmuş muhafazada 2. ve 4. günden itibaren biyojen amin içerdiğini, tüm balıklarda putresini, 2. ve 4.günlerde ortalama 0.55-0.60 mg/kg düzeyinde, kadaverini, 2. gün ortalama 4.5 mg/kg, 4. gün ise 2.9 mg/kg, histaminin ise hiç tespit edilemediğini bildirmişlerdir. İki farklı skombroid ve skombroid olmayan balık türünde biyojen amin oluşumunu inceledikleri çalışmada, 2 ve 10 ºC'lerde vakumlu paket içinde saklandıklarında benzer oranlarda histamin içerdikleri tespit edilmiş, ancak kadaverin oranının, skombroid balık türünde oldukça yüksek oranda oluştuğu ve bu aminin histaminin toksisitesini arttırdığı bildirilmiştir.

Aynı zamanda, skombroid balıkta serbest histidin ve lizin oranlarının skombroid olmayan balıktakine nazaran 4-5 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu sebeple skombroid olmayan balıklarda, histaminin toksik seviyesinin 500 ppm civarında olduğu, oysa skombroid türlerde histminin çok daha az değerlerde toksik etkiye sahip

olduğu belirtilmiştir (Klausen ve Lund, 1986). Bir başka çalışmada +4 ºC'de predominat aminlerin kadaverin ve histamin olduğu ve kısa sürede oluşmaya başladıkları belirlenmiştir. Bu sıcaklıklarda amin oluşumunun ana sebebinin özellikle psikrofil karakterdeki dekarboksilaz aktivitesine sahip bakteriler olduğu üzerinde durulmuştur (Kerr ve ark., 2002). Özoğul ve ark. (2006b), Avrupa yılan balığı (*Anguilla anguilla*) ile yaptıkları çalışmada buzsuz ortamda saklanmış balıklarda 6. ve 7. gün ve yine buzlu ortamda saklanmış olanlarda ise 13. ve 14. günlerden itibaren histamin seviyesinin FDA'nın bildirdiği yasal limit olan 5mg/100g'ı geçtiğini ancak Avrupa Birliği tarafından önerilen 20 mg/100g sınırını aşmadığını tespit etmişlerdir. Putresin ve kadaverin miktarlarının ise saklama periyodunca hızlı bir artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Benzer şekilde biyojen amin oluşumun +4ºC ile +6ºC'lerde saklamada +18 ºC ile 22 ºC'lerde saklamaya oranla daha uzun ve yavaş şekillendiğini, buzdolabında saklamanın amino asit dekarboksilaz aktivitesine sahip mikroorganizmaların gelişimini engelleyemediğini bildirmiştir (Veciana-Nouges ve ark., 1990).

Gökoğlu ve Yerlikaya (2004), farklı sezonlarda yakalanıp buzdolabında saklanmış sardalya balıklarında histamin içeriğinin araştırıldığı çalışmada, başlangıç histamin içeriğinin yaz aylarında yakalanan balıklarda (14.23 mg/kg) kış aylarında yakalananlara (8.40 mg/kg) oranla daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Yine aynı şekilde yaz sardalyasında saklama periyodunun sonunda histamin oranının 60 mg/kg'a ulaştığını tespit etmişler ve kış sardalyasında bu artışın oldukça yavaş ve az olduğunu bildirmişlerdir. Bu farklılığın yaz aylarında hava ısının yüksek oluşu, yakalama esnasındaki koşullar ve mezofilik karakterdeki bakterilerin psikrofil olanlara nazaran sıcak ortamlarda biyojen amin oluşumunundan sorumlu olmaları olarak açıklanmıştır.

Rodriguez ve ark. (1999), gökkuşağı alabalıklarında bozulmanın başlamasıyla birlikte öncelikle histidin amino asitinin diğerlerine nazaran hızlı bir şekilde arttığını belirledikleri halde hiçbir örnekte histamin tespit edemediklerini ve bunun sebebinin de kuzeybatı İspanya'daki tatlı su kaynaklarının bakteriyel florasının histidin dekarboksilaz aktivitesine sahip olmamasından kaynaklandığını ve biyojen amin

seviyelerindeki farklılıkların, balıkların tutulma zamanı, mide içerikleri ve mevsimsel mikroflora ile ilişkili olduğunun düşünüldüğünü bildirmişlerdir.

Du ve ark. (2002), ton balığı filetolarında histamin oluşumunu kontrol altına almanın en iyi yolunun yakalanmayı müteakip balıkların hemen 0 ºC ve altı sıcaklıklarda saklanması olduğunu vurgulamışlar ve biyojen amin oluşumunda saklama koşullarıyla amino asit dekarboksilaz aktivitesine sahip bakteri sayısı arasında doğrudan bir ilişki olduğunu açıklamışlardır. Yine taze ve konserve ton balıklarında saklama koşullarının histamin oluşumu üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, +4 ºC'de predominat aminlerin kadaverin ve histamin olduğu ve kısa sürede oluşmaya başladıkları belirlenmiş ve özellikle dekarboksilaz aktivitesine sahip psikrofilik bakterilerin bu sıcaklıklarda amin oluşumu sağladığı üzerinde durulmuştur (Kerr ve ark., 2002).

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, Veciana-Nogues ve ark. (1995), Kerr ve ark. (2002), Klausen ve Lund, (1986) ve Veciana-Nouges ve ark. (1990) çalışmalarıyla benzerlik göstermekte olup, alabalıklarla yapılan analizlerde saklama sıcaklığı ve periyodunun biyojen amin oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir.

Bunlardan farklı olarak, Özoğul ve ark. (2006a), Gökkuşağı alabalıklarının 17 günlük süreyle buzlu ortamda saklanması ile histamin oluşumunun gözlenmediği, putresin ve kadaverinin ise çok düşük oranlarda oluştuğunu belirlemişlerdir. Bu veriler değerlendirildiğinde saklama periyodu ve amino asit içeriğinin, dekarboksilaz aktivitesine sahip bakterilerle kontaminasyon olmadığı sürece biyojen amin oluşumundaki etkisinin sınırlı kaldığı vurgulanmıştır.

Biyojen amin oluşumunun tespitinde kullanılan cihaz ve ekstraksiyon yöntemleri arasındaki farklılıkların, elde edilen bulguları ve tespit süreleri ve miktarlarını etkilediği bildirilmiştir (Hwang ve ark. 1997; Du ve ark., 2001; Hall ve ark., 1995; Serrar ve ark., 1995). Muscarella ve ark. (2005), deniz ürünlerindeki histamini ölçmek için HPLC, CE ve ELISA tekniklerini karşılaştırmışlardır. Her üç teknik içinde tespit limitlerinin denk olduğunu, ancak tekrarlanabilirliğin HPLC ve CE için çok daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir. HPLC ve CE ile tespit edilen

histamin içeriğinin önemli bir farklılık göstermediğini (HPLC=20.3 mg/kg ve CE=19.2 mg/kg), buna karşılık ELISA ile 42.6 mg/kg'lık bir sonuç elde edildiği bildirilmiştir. ELISA ile elde edilen bu yüksek konsantrasyonun örnekteki mevcut diğer biyojen aminler ile uygulanan ekstraksiyon yönteminin çapraz reaksiyonlar göstermesi sonucu fazla bulunduğu üzerinde durulmuştur.

Hwang ve ark. (2003), balık ve balık ürünlerinde gaz kromatografik (GC) metod kullanarak histamin varlığını araştırdıkları çalışmada, taze balıkların histamin içermediğini ancak donmuş balık örneklerinde 100µg/g üzerinde histamin tespit ettiklerinin bildirmişlerdir. Elde edilen sonuçların kısa sürede alınması ve hata riskinin en aza indirgenmiş olmasıyla daha güvenilir bir metod olduğunu savunmuşlardır. Otosampler'a sahip HPLC ile yapılan başka bir çalışmada, mono enjektörlü cihazlara oranla analiz süresinin azaldığı ve çok sayıda numunenin kısa bir zamanda incelenenebildiği belirtilmiştir (Hui ve Taylor, 1983)

Tamim ve ark. (2002), tavuk karkaslarında HPLC ile biyojen amin varlığını araştırdıkları çalışmada, ekstraksiyonda kullandıkları perklorik asitin histamin için geri kazanımının düşük (%74.6) olduğunu bildirmişler Lange ve ark. (2002), balık numunelerinin 7 gün süreyle +4ºC'de saklandığını ve %5'lik TCA (Trikloro asetik asit) ile ekstraksiyonunun en iyi pik çözünürlülüğüne sahip sonuçlar ortaya koyduğunu vurgulamışlardır. Benzer bir çalışmada %6'lık TCA kullanılarak biyojen aminlerin balıktan geri kazanımının daha iyi olduğunu bildirmişlerdir (Hwang ve ark., 1997).

Çalışmada histamin için % 100'lük bir geri kazanım elde edilmesi ile balık ekstraksiyonunda % 6'lık TCA kullanılmasının başarılı olduğu belirlenmiştir. HPLC cihazının hassasiyeti ve güvenirliliği yüksek olması yanı sıra kullanılan cihazın mono enjektörlü oluşu ile tespit süresinin artmış olmasının Hwang ve ark. (1997) ve Hui ve Taylor (1983) çalışmalarıyla örtüştüğü belirlenmiştir.

İncelenen 100 numunenin 33'ünde 3. günde histamin seviyesinde meydana gelen azalmanın Tamim ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada olduğu gibi histamin derivatlarının zamanla stabilitelerini kaybetmelerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Balık ve balık ürünleri, yapısal olarak biyojen amin oluşumunda ve özellikle histamin zehirlenmesinden sorumlu tutulan başlıca gıdalar olarak değerlendirilmektedir. Bu konu ile ilgili yapılmış bir çok çalışma mevcut olup, bu ürünlere biyojen amin içerikleri bakımından dikkat edilmesi gerekmektedir.

Çalışmada kullanılan alabalıklarda biyojen amin düzeyleri açısından bir risk saptanmamış olmakla beraber, özellikle muhafaza koşullarına bağlı olarak biyojen amin düzeylerinde artış olabilmektedir.

Düşük depolama sıcaklığı balık ve balık ürünlerinde bakteriyel gelişmeyi ve enzimatik aktiviteyi kontrol etmede kullanılmaktadır. Ancak avlanan balığın taşınmasından tüketim noktasına gelinceye kadar (çiftlikten sofraya gıda güvenliği) yapılan hijyenik uygulamalar, iyi kaliteyi ve uzun raf ömrünü sağlamada önemli olmaktadır.

Balık etindeki bakteriyel kontaminasyon bozulmada ana sebeplerdendir. Balıklar, gıda zehirlenmesine ve hatta ölüme bile yol açabilen patojenik bakterilerle kontamine olabilmektedir. Bu yüzden bakteri üremesini geciktirmek veya azaltmak için balıklar temiz yerlerde ve soğuk derecelerde saklanmalıdır. Yüksek seviyede histidin içeren balıkların tüketimiyle ilişkili zehirlenmeleri önlemek için iyi hijyen uygulaması ve balığın uygun şartlarda tutulması gerekmektedir. Dolayısıyla, gıda güvenliği kapsamında balık etinde oluşabilecek tehlikelerin önlenmesi açısından gıda güvenliği ile ilgili sistemlerin (HACCP, GMP, GHP) şekillendirilmesi ve uygulanmasının büyük önem taşıdığı göz önüne alınmalıdır.

ÖZET

Gökkuşağı alabalıklarında *(Onchornycus mykiss*) biyojen aminlerin HPLC ile saptanması

Bu çalışmada, Ankara'da canlı alabalık satan işletmelerden alınan örneklerden oluşan toplam 100 balık gereç olarak kullanılmıştır. Histamin, putresin ve kadaverin tespiti muhafazanın, İlk gün ve üçüncü günlerinde, Yen ve Hsieh (1991) ve Hwang ve ark. (1997) geliştirdikleri analiz yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır.

Toplam 100 alabalık örneğinin tamamında histamin tespit edilmiş putresin ve kadaverine bazı örneklerde ve çok düşük miktarlarda rastlanılmıştır Yapılan denemeler sonucunda 3 gün süreyle +4ºC'de bekletilen balıklarda histamin düzeyinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. 100 numunenin ortalama olarak sıfırıncı gündeki histamin miktarı 0,669 ± 0,089 mg/100g, üçüncü gün ise 2,395 ± 0,250 mg/100g olarak hesaplanmıştır. Alabalık örneklerinin % 67'sinde histamin oluşumunda artış görülürken, % 33'ünde ise azalma tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, yakalanan balığın tüketim noktasına gelinceye kadar yapılan hijyenik uygulamaların, iyi kaliteyi ve uzun raf ömrünü sağlamada önemli olduğu değerlendirilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Gökkuşağı alabalığı, HPLC, Histamin, Putresin ve Kadaverin.

SUMMARY

The determination of biogenic amines in Rainbow trout (*Onchornycus mykiss*) by HPLC

In this study, A total of 100 fish samples were used as materials, obtained from fresh rainbow trout sellers in Ankara. Determination of histamine, putrescine and cadaverine were done, in 1th and 3rd days of storage, using Yen and Hsieh (1991), and Hwang et al.(1997) analysis method which was modified.

Histamin was dedected in all of the samples as a total of 100; putrescine and cadaverine was determined as low levels in some samples.Histamine levels were increased in fish samples, stored at +4ºC for 3 days. The avarage amount of histamine in 1th and 3rd days of 100 samples were calculated as 0,669 ± 0,089 mg/100g and 2,395 ± 0,250 mg/100g, respectively. While the histamine production in % 67 of Rainbow trout samples was increased, % 33 of the samples showed decreasing levels of histamine.

As a conclusion, hygienic precautions applied from fishing to consume stage were important for good quality and long shelf life of products.

Key Words: Rainbow trout, HPLC, Histamine, Putrescine, and Cadaverine

KAYNAKLAR

ABABOUCH, L.; AFILAL, M. E.; RHAFIRI, S.; BUSTA, F. F. (1991). Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina Pilchardus*) stored in ice and ambient temperature (25°C). *Food Microbiol.* **8:** 127-136.

ANON, (1991). Avrupa Birliği direktif no. 91/493.

ANON, (1998). FDA and EPA Guidance levels. Appendix 5. **In:** Fish and fishery products hazard and controls guide. 2nd ed., **sf.** 245-248. Department of health and human services, public health service, Food and drug administration, center for food safety and applied nutrition, office of sea food, Washington, DC.

ANON, (2002). Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ Yetki Kanunu Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği , ek-3 yabancı madde ve bileşikler. Yayımlandığı R.Gazete 23.09.2002-24885 **Tebliğ No:** 2002/63

ANON, (2006). Histamine, Cadaverine and Putrescine. Erişim: **http// tr.wikipedia org**. (erişim tarihi: 25. 11. 2006)

ANTOINE, F. R.; WEI, C. I.; LITTELL, R.C.; MARSHALL, M. R. (1999). HPLC method for analysis of free amino acids in using *o*-Phthaldehyde precolumn derivatization. *J.Agric.Food Chem.* **47:** 5100-5107.

ARNOLD, S. H.; PRICE, R. J.; BROWN, W. D. (1980). Histamine formation by bacteria isolated from skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, Bul. Japanese. *Soc. Sci. Fish*. **46 (8):** 991-995.

BARTHOLOMEW, B.A.; BERRY, P.; RODHOUSE, J.; GILBERT, R.. (1987). Scombrotoxic fish poisoning in Britain: Features of over 250 suspected incidents from 1976 to 1986. *Epidemiol. Infect.* **99:** 775-782.

BATEMAN, R. C. JR.; ELDRIGE, D. B.; WADE, S.,; MCCOY-MESSER, J.; JESTER, E. L. E.; MOWDY, E. D. (1994). Copper chelation assay for histamine in tuna. *J. Food Sci.* **59:** 517–518.

BAUER, F.; SEUS, I.; PAULSEN, P.; VALI, S. (1994). The formation of biogenic amines in meat and meat products. 40th International Congress of Meat Science and Technology. Netherlands.

BEHLING, A. R.; TAYLOR, S. L. (1982). Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. *J. Food Sci*. **47:** 1311-1314, 1317.

BEN-GIGIREY, B.; CRAVEN, C.; AN, H. (1998a). Histamine formation in albacore muscle analyzed by AOAC and enzymatic methods. *J. Food Sci.* **63:** 210–214

BEN-GIGIREY, B.; VIEITES BABTISTA DE SOUSA, J. M.; VILLA, T. G.; BARROS-VELAZQOUEZ, J. (1998b). Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *J. Food Prot.* **61(5):** 608-615.

BEUTLING, D. (1994). Untersuchungen zu Einflußfaktoren für die Tyraminbildung durch *Enterococcus faecalis. Arch. Lebensmittelhyg*. **45:** 128-131.

BOVER-CID S.; HUGAS, M.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. (2000). Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid decarboxylase starter culture for fermentation of fuet sausages. *J. Food Protect*. **63(2):** 237-243.

BRINK, B.; DAMMK, C.; JOOSTEN, H. M. L. J.; HUIS IN'T VEID, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J.Food Microbiol*. **11:** 73-84.

BUATTI, S.; BOSCHELLE, O.; MOZZON, M.; BATTISTUTTA, F. (1995). Determination of biogenic amines in alcoholic and non-alcoholic beers by HPLC. *Food Chem*. **52:** 199-202.

CLIFFORD, M.N.; WALKER, R.; IJOMAH, P.; WRIGHT, J.; MURRAY, C.K.; HARDY, R. (1991). Is there a role for amines other than histamines in the aetiology of scombrotoxicosis? *Food Additives and Contaminants* **8:** 641-65

CRAVEN, C.; HILDERBRAND, K.; KALBE, E.; SYLVIA, G.; DAESCHEL, M.; GLORIA B.; AN., H. (1995). Understanding and Controlling Histamine Formation in Troll-Caught Albacaore Tuna: A Review of Preliminary Finding from the 1994 Season Oregon sea Grant ORESU-T95-00.

ÇOLAK, H.; AKSU, H. (2002). Gıdalarda Biyojen Aminlerin Varlığı ve Amin Oluşumunu Etkileyen Faktörler. *YYÜ. Vet. Fak. Derg*. **13(1-2):** 35-40

DENLI, Y.; ANLI, R. E. (1998). Şarap ve birada biyojen aminlerin önemi ve oluşumu. *Gıda* **23(5)** :323-327.

DU, W. X.; HUANG, T. S.; KIM, J.; MARSHELL, M. R.; WEI, C. I. (2001). Chemical, microbiological, and AromaScan evaluation ofmahi-mahi fillets under various storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* **49:** 527–534

DU, W. X.; LIN, C. M.; PHU, A. T.; CORNELLI, J. A.; MARSHALL, M. R.; WEI, C.I. (2002). Development of biogenic amines in Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*):Effect of storage and correlation with decarboxylase- positive bacterial flora. *J. Food Sci*. **64(1):** 292-301.

EDMUNDS, W. J.; EITENMILLER, R. R. (1975). Effects of storage time and temperature on histamine content and histidine decarboxylase activity of aquatic species. *J. Food Sci*. **40**: 516-519.

EEROLA, H. S.; ROIG-SAGUES, A. X.; HIRVI, T. K. (1998). Biogenic amines in Finnish dry sausages. *J.Food Safety.* **18(2)** :127-138.

FEIER, U.; GOETSCH, P. H. (1993). Inter-laboratory studies on precision characteristics of analitical methods. Determination of biogenic amines in fish and fishproducts- HPLC method. *Arch. Lebensmittel hyg*. **44:** 134-135.

FERNANDEZ-SALGUERO, J.; MACKIE, I. M. (1987). Technical note: Preliminary survey of the content of histamine and other higher amines in some samples of spanish canned fish. *Int. J. Food Sci. Technol. 22:* 409-412.

FRANK, H. A.; BARANOWSKI, J. D.; CHONGSIRIWATANA, M., BRUST, P. A.; PREMARATUE, R. J. (1985). Idendification and decarboxylase activities of bacteria isolated from decomposed mahi mahi after incubation at 0 and 32 ºC. *Int. J. Food Microbiol*. **2:** 331-340.

GINGERICH, T. M.; LORCA, T.; FLICK, G. J., PIERSON, M. D., MC NAIR, H. M. (1999). Biogenic amine survey and organoleptic changes in fresh, stored and temperature-abused bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *J. Food Protect.* **62 (9):** 1033-1037.

GÖKOĞLU, N.; YERLİKAYA, P. (2004). Comparıson of histamine content of sardine *(Sardina pilchardus)* caught in different season during refrigerated storage. 34th WEFTA meeting, 12-15 september 2004, Lübeck-Germany

HALASZ, A.; BARATH, A. L.; SARKADI, S.; HOLZAPFEL, W. (1994). Biogenic amines and their production by mikroorganism in food. *Trend. Food Sci. and Technol*. **5:** 42-49.

HALL, M.; ELDRIGE, D. B.; SAUNDERS, R. D.; FAIRCLOUGH, D. L.; BATEMAN, R. C. (1995). A rapid dipstick test for histamine in tuna. *Food Biotechnol*. **9:** 39–57.

HERNANDEZ-HERRERO, M. M.; ROIG-SAGUES, A. X.; RODRIGUEZ-JEREZ, J. J.; MORA-VENTURA, M. T. (1999). Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicholus*). *J.Food Protect*. **62 (5):** 509-514.

HERNANDEZ-JOVER, T.; IZQUERDO-PULIDO, M.; VECIANA-NOGUES, T; MARINE-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. (1997a). Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage production. *J.Food Protect*. **60 (7):** 825-830.

HERNANDEZ-JOVER, T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VECIANA-NOGUES, M. T.; MARINE-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. (1997b). Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *J.Agric. Food Chem*. **45 (6):** 2098-2102.

HORNERO-MENDEZ, D.; GARRIDO-FERNANDEZ, A. (1997). Rapid HPLC analysis of biogenic amines in fermented vegetable brines. *J.Food Protect*. **60 (4):** 414-419.

HUI, J. Y., TAYLOR, S. L. (1983). High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods. *J.Assoc.Off. Anal. Chem*. **66(4):** 853-857.

HWANG, B. S., WANG, J. T., CHOONG, Y. M. (2003). A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish product. *Food Chem.* **Basım aşamasında**.

HWANG, D. F., CHANG, S. H., SHIUA, C. Y., CHAI, T. J. (1997). High-performance liquid choromatografic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisining. *J. Chromatogr.* B. **693:** 23-30.

IJOMAH, P.; CLIFFORD, M. N.; WALKER, R.; WRIGHT, J.; HARDLY, R.; MURRAY, C. K. (1992). Further volunteer studies on scombrotoxicosis. **17:**194-199. In pelagic fish: The source and its Explaitation, **Editörler***:*.J.R. Burt, R. Hardly and K.J.Whittle, Fishing News Books Oxford. **In:** ÖZOĞUL, F.; KÜLEY, E.; ÖZOĞUL, Y. (2004). Balık ve Balık Ürünlerinde Oluşan Biyojenik Aminler. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi* **21(3-4):** 375– 381

JOOSTEN, H. M. L. J. (1988). The biogenic amine contents of dutch cheese and their toxicological significance. *Neth. Milk Dairy* **41**: 25-42.

JOOSTEN, H. M. L. J.; NUNEZ, M. (1996). Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *App. Environ. Microbiol*. **62 (4):** 1178-1181.

KALAC, P.; SPICKA, J.; KRIZEK, M.; STEDIEDLOVA, S.; PELIKANOVA, T. (1999). Concentrations of seven biogenic amines in sauerkraut. *Food Chem*. **67:** 275-280.

KERR, M.; LAWICKI, P.; AGUIRRE, S.; RAYNER, C. (2002). Effect of storage conditions on histamine formation in fresh and canned tuna. Public health division. Victorian government department of human services. **Baskı:** 1

KLAUSEN, N. K.; HUSS, H. H. (1987). Growth and histamine production by *Morganella morganii* under various temperature conditions. *Int. J. Food Microbiol*. **5 (2):** 147-156.

KLAUSEN, N. K.; LUND, E. (1986). Formation of biogenic amines in herring and mackerel. *Zeitsch. Leb. Unter. Forsch.* **182:** 459-463.

KRIZEK, M.; KALAC, P. (1998). Biogenic amines in foods and their role in nutrition. *Czech J.Food Sci*. **16(4):** 151-159.

LANGE, J.; THOMAS, K.; WITTMANN, C. (2002). Comparison of a capillary electrophoresis method with high performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *J. Chromatogr. B*. **779:** 229-239.

LEHANE, L.; OLLEY, J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. *Int J. Food Microbiol*. **58:** 1–37.

LOPEZ-SABATER, E. I.; RODRIGUEZ-JEREZ, J. J.; ROIG-SAGUES, A. X.; MORA-VENTURA, M. A. (1994b). Bacteriological quality of Tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: Effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *J.Food Protect*. **57 (4):** 318-323.

LOPEZ-SABATER, E. I.; RODRIGUEZ-JEREZ, J. L.; HERNANDEZ-HERRERO, M.; MORA-VENTURA, M. T. (1994a). Evulation of histamine decarboxylase activity of bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) by an enzymic method. *Letter App. Microbiol*. **19**: 70-75.

MACKIE, I. M.; PIRIE, L.; RITCHIE, A. H.; YAMANAKA, H. (1997). The formation of non-volatile amines in ralation to concentration of free basic amino acid during postmortem storage of the muscle of scallop (*Pecten maximus*), herring (*Clupea harengus*) and mackerel (*Scomber scombrus*) *Food Chem*. **60(3):** 291-295.

MAIJALA, R. (1994). Histamine and tryramine production by a lactobacillus strain subjected to external pH decrease. *J.Food Protect*. **57 (3):** 259-262.

MAIJALA, R.; EEROLA, S. H.; AHO, M. A.; HIRN, J. A. (1993). The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *J.Food Protect*. **56 (2):** 125-129.

MALLE, P.; VALLE, M. (1996). Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC.* **79:** 43-49.

MARINE-FONT, A. (1978). Alimentos y medicamentos: Interaccions (3a parte). Circ. Farm. **258:** 43-45. **In:** ÖZOĞUL, F.; KÜLEY, E; ÖZOĞUL, Y. (2004) Balık ve Balık Ürünlerinde Oluşan Biyojenik Aminler. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi.* **21(3-4):** 375–381

MASSON, F.; LEBERT, A.; TALON, R.; MONTEL, M. C. (1997). Effects of physico-chemical factors influencing tyramine production by *Carnobacterium divergens*. *J.App. Microbiol*. **83:** 36-42.

MIDDLEBROOKS, B. L.; TOOM, P. M.; DONGLAS, W. L.; HARRISON, R. E.; MCDOWELL, S. (1988). Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *J. Food Sci*. **53 (4):** 1024-1029.

MOPPER, B.; SCIACCHITANO, C. J. (1994). Capillary zone electrophoretic determination of histamine in fish. *J. AOAC Int.* **77:** 881–884.

MUSCARELLA, M.; IAMMARINO, M.; CENTONZE, D.; PALERMO, C. (2005). Measurement of histamine in seafood by HPLC, CE, and ELISA: Comparison of three techniques. *Vet. Res.Commun.* **29(2):** 343-346.

NAGUIB, K.; AYESH, A. M.; SHALABY, A. R. (1995). Studies on the determination of biogenic amines in foods. 1. Development of a TLCmethod for the determination of eight biogenic amines in fish. *J. Agric. Food Chem.* **43:** 134–139.

OHASHI, M.; NOMURA, F.; SUZUKI, M.; OTSUKA, M.; ADACHI, O.; ARAKAWA, N. (1994). Oxygen-senso based simple assay of histamine in fish using purified amine oxidase. *J. Food Sci.* **59:** 519–522

OKUZUMI, M.; FUKUMOTO, I.; FUJII, T. (1990). Changes in bacterial flora and polyamines contents during the storage of horse mackerel meat. *Bullet. Japanese Soc. Sci. Fish*. **56 (8):** 1307-1312.

ORDONEZ, A.I.; IBANEZ, F. C.; TORRE, P.; BARCINA, Y. (1997). Formation of biogenic amines in Idiazabal Ewe's-Milk cheese: Effect of ripening, pasteurization and starter. *J.Food Protect.* **60 (11):** 1371-1375.

ÖZOĞUL, F. (2001). The effect packaging systems on quality and safety of herring. PhD dissertation. Lincoln, U.K: University of Lincoln.

ÖZOĞUL, F.; KÜLEY, E; ÖZOĞUL, Y. (2004a) Balık ve Balık Ürünlerinde Oluşan Biyojenik Aminler. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi.* **21(3-4):** 375– 381

ÖZOĞUL, F.; POLAT, A.; ÖZOĞUL, Y. (2004b). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chem*. **85:** 49-57.

ÖZOĞUL, F.; TAYLOR K. D. A.; QUANTICK, P.; ÖZOĞUL, Y. (2002b). Changes in biogenic amines in herring stored under modified atmosphere and vacuum pack. *J. Food Sci*. **67:**2497-2501.

ÖZOĞUL, F.; TAYLOR, K. D. A.; QUANTICK, P.; ÖZOĞUL, Y. (2002a). Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *Int. J. Food Sci. Technol*. **37 (5):** 515-528

ÖZOĞUL, Y.; AHMAD, J.I.; HOLE, M.; ÖZOĞUL, F.; DEGUARA, S. (2006a). The effect of partial replacement of fish meal by vegetable protein sources in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) onthe post mortem spoilage of fillets.*Food Chem.* **96:** 549-561.

ÖZOĞUL, Y.; ÖZOĞUL, F.; GÖKBULUT, C. (2006b). Quality assesment of wild European eel (*Anguilla anguilla*) stored in ice. *Food Chem.* **95:** 458-465.

PALEOLOGOS, E. K.; I. SAVVAIDIS, N.; KONTOMINAS, M. G. (2004). Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiol.* **21:**549–557.

PAULSEN, P.; BAUER, F.; VALI, S. (1997). Biogenic amines in fermented sausage. 1.Methods for the determination of biogenic amines. *Fleischwirtsch*. **77 (5):** 450-452 .

RAWLES, D. D.; FLICK, G. J. (1996). Biogenic amines in fish and shellfish. *Adv. Food Nut.. Res.* **39:** 329-365.

RITCHIE, A. H.; MACKIE, I.M. (1980). The formation of diamines and polyamines during the storage of mackerel (*Scomber scombrus*). **Sf:** 489-494.In:Connell JJ, editor Advances in fish science and technology. Farnham, UK: Fishing News (Books) Ltd.

RODRIGUEZ, I.; LEE, H. K.; LI, S. F. Y. (1996). Seperation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatgr. A* **745:** 255-262.

RODRIGUEZ-JEREZ, J. J.; MORA-VENTURA, M. T.; LOPEZ-SABATER, E. I.; HERNANDEZ-HERRERO, M. (1994). Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in spanish salted semi-preserved anchovies. *J. Food Protect*. **57(5):** 784-787, 791.

RODRIGUEZ, C. J.; BESTEIRO, I.; PASCUAL, C. (1999). Biochemical changes in fresh water rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) duing chilled storage. *J. Sci. Food Agric.* **79:** 1473-1480

ROIG-SAGUES, A. X.; HERNANDEZ-HERRERO, M.; RODRIQUEZ-JEREZ, J. J.; LOPEZ-SABATER, E. I.; MORA-VENTURA, M. T. (1997). Histidine decarboxylase activity of Enterobacter cloacae 515/19 during the production of ripened sausages and its influence on the formation of cadeverine. *J.Food Protect*. **60 (4):** 430-432.

SANTOS, C.; MARINE A.; RIVAS, J. C. (1986). Changes tyramine during storage and spoilage of anchovies. *J. Food Sci*. **51:** 512-513, 515.

SANTOS, S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int.J.Food Microbiol*. **29:** 213-231.

SERRAR, D.; BREBANY, R.; BRUNEAU, S.; DENOYEL, G. A. (1995). The development of a monoclonal antibody-based ELISA for the determination of histamine in food: application to fishery products and comparison with the HPLCassay. *Food Chem*. **54**: 85–91.

SHALABY, A.R. (1993). Survey on biogenic amines in Egyptian foods : sausage. J.*Sci. Food Agric*. **62 (3):** 291-293.

SHALABY, A.R. (1995). Multidetection, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chem*. **52:** 367-372.

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

SIMS, G. G.; FARN, G.; YORK, R. K. (1992). Quality indices for canned skipjack tuna: Correlation of sensory attributes with chemical indices. *J. Food Sci*. **57(5):** 1112-1115.

SMITH, J. S.; KENNEDY, P. B.; KASMER, C. L.; MOORE, M. M. (1993). Biogenic amine formation in fresh vacuum packaged beef during storage at 1°C for 120 days. *J.Food Protect*., **56:** 497-500.

SMITH, T. A. (1980). Amines in food. *Food Chem*. **6:** 169-200.

SPANJER, M. C.; WEBER, B. A. S. (1991). Towards a regulatory limit for biogenic amines in fish, cheese, and sauerkraut. *De Ware (n)-Chem.* **21:** 139-167.

SÜMBÜLLÜOĞLU, K.; SÜMBÜLLÜOĞLU, V. (1997). Biyoistatistik. Hatipoğlu yayın evi 7. baskı Ankara

TAMIM, M. N.; BENNETT, W. L.; SHELLEM, A.T.; DOERR, J. A. (2002). High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in poultry carcasses. *J. Agric. Food Chem.* **50:** 5012-5015.

TAYLOR, S. L. (1986). Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects: *Rev. Toxicol.* **17 (2):** 91-128.

TEODOROVIC, V.; BUNCIC, S.; SMILJANIC, D. (1994). A study of factors influencing histamine production in meat. *Fleischwirtsch*. **74 (2):** 170-172.

TSCHABRUN, R.; SICK, K.; BAUER, F.; KRANNER, P. (1990). Bildung von Histamine in Schnittfesten Rohwürsten. *Fleischwirtsch*. **70 (4):** 448-452.

TÜRKER, S.; ÇAKLI, Ş.; TAŞKAYA, L. (1996). Su Ürünlerinde Histamin Zehirlenmesi. *Gıda Teknolojisi Dergisi* **10:**

ÜNLÜTÜRK, A.; ÜNLÜTÜRK, Y. (1981). Gıdalarda Histamin Oluşumu ve Histamin Zehirlenmesi. *Gıda Dergisi* **1-2:**7-8 .

VALE, S.; GLORIA, M. B. A. (1998). Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chem*. **63 (3)**: 343-348.

VECIANA-NOGUES, M. T.; ALBALA-HURTADO, S.; MARINE-FONT, A.; VIDAL-CORAU, M. C. (1996). Changes in biogenic amines during the manufacture and storage of semi-preserved anchovies. *J.Food Protect*. **59 (11):** 1218-1222

VECIANA-NOGUES, M. T.; HERNANDEZ, J.T.; MARINE-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. (1995). Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products. *J.AOAC Int.***78 (4):** 1045-1050.

VECIANA-NOGUES, M. T.; MARINE-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. (1997a). Biogenic amines in fresh and canned tuna. Effects of canning on biogenic amine contents. *J. Agric. Food Chem.* **45**:4324-4328.

VECIANA-NOGUES, M. T.; MARINE-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. (1997b). Biogenic amines as hygenic quality indicators of tunas. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptik changes. *J. Agric. Food Chem*. **45:**2036-2041.

VECIANA-NOGUES, M. T.; VIDAL-CAROU M. C.; MARINE-FONT, A. (1990). Histamine and tyramine during storage and spoilage of Anchovie, *Engraulis Encrasicholus*: Relationships with other fish spoilage indicators. *J. Food Sci.* **55(4):** 1192-1194

WEI, C. I., CHEN, C. M.; KOBURGER, J. A.; OTWELL, W. S.; MARSHALL, M. R. (1990). Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. *J. Food Sci*. **47:** 1386-1387.

WENDAKOON, C. N.; MURATA, M.; SAKAGUCHI, M. (1990).Comparison of non-volatile amine formation between the dark and white muscle of mackerel during storage. *Nippon Suis. Gakk.* **56(5):** 809-818.

WENDAKOON, C. N.; SAKAGUCHI, M. (1992). Effect of spices on growth of and biogenic amine formation by bacteria in fish muscle. **Sf:** 305-313.In Quality Assurance in the Fish Industry.

WU, MING-LING M.D.; YANG, CHENG-CHANG M.D.; YANG, GUANG-YANG M. D.; GER, J. M. D.; DENG, JOU-FANG M. D. (1997). Scombroid Fish Poisoning: An Overlooked Marine Food Poisoning. *Veterinary and Human Toxicology.* **39 (4):** 236-241.

YAMANAKA, H.; SHIMAKURA, K.; SHIOMI, K.; KIKUCHI, T.; LIDA, H.; NAKAMARA, K. (1987). Concentrations of polyamines in fresh water fishes. *Nip. Suisan Gak*. **53:** 2041-2044.

YATSUNAMI, K.; ECHIGO, T. (1993). Studies on halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria. III. Changes in the number of halotolerant histamine-forming bacteria and contents of non-volatile amines in sardine meat with addition of NaCl. *Bul. Japanese Soc. Sci. Fish*. **59(1):** 123-127.

YEN, G. C.; HSIEH, C. L. (1991). Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fisf by HPLC. *J. Food Sci.* **56 (1):** 158-160.

YOSHIDA, A.; NAKAMURA, A. (1982). Quantitation of histamine in fish and fish products by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Jap.* **23 (4):** 339-343.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı : Nusret Hakan

Soyadı : ŞENMAN

Doğum Yeri ve Tarihi : İzmir- 1976

Uyruğu : T.C.

Medeni Durumu : Evli

İletişim Adresi ve Telefonu : Tepe blk. 17334 ada 145. sok. Bk. 2/2 D:8 3. Etap Eryaman Etimesgut ANKARA. **Tel:** 0 312 282 84 02

Eğitimi

İlkokul : Barbaros, 12 Eylül ve Kültür Kurumu İlkokulları

Ortaokul : Erzurum Anadolu lisesi

Lise : Çankaya M.P. Anadolu Lisesi

Üniversite : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Yabancı Dil : İngilizce

Ünvanları

Kamu alanında Veteriner Hekim

Bilimsel Etkinlikleri

Seminerler : Et ve temas yüzeylerinde bakteriyel tutunma,

Metisiline dirençli *S. aureus'* ların halk sağlığı açısından önemi