ERZURUM ÇEVRESİNDEN TOPLANAN PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BİYOJEN AMİN DEGREDE ETME ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Elifnur MERAL

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2023
(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

ERZURUM ÇEVRESİNDEN TOPLANAN PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BİYOJEN AMİN DEGREDE ETME ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Investigation of the Biogen Amines Degree Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Cheese Samples Collected From Erzurum and its Surroundings)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elifnur MERAL

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum

Haziran, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Elifnur MERAL tarafından hazırlanan "Erzurum Çevresinden Toplanan Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Biyojen Amin Degrede Etme Özelliklerinin Araştırılması" başlıklı çalışması 22/06/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Doç. Dr. Burak ALAYLAR *Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan BALTACI *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan "Erzurum Çevresinden Toplanan Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Biyojen Amin Degrede Etme Özelliklerinin Araştırılması" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	**Tezin Benzerlik Oranı (%)**	**Maksimum Oran (%)**
Giriş	6	**30**
Kuramsal Temeller	16	**30**
Materyal ve Yöntem	12	**35**
Bulgular ve Tartışma	8	**20**
Sonuç ve Öneriler	8	**20**
Tezin Geneli	11	**25**

Not: *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının* ***%5'den*** *büyük olmaması gerekir.*

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)
Elifnur MERAL
22.6.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
22.6.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır

***** Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma için, danışmanlığımı üstlenen çalışmamın yürütülmesinden tezin yazım sürecine dek her türlü yardımını, bilgi ve deneyimini esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e

Tezimin her aşamasında sürekli iletişimde bulunduğum laboratuvar çalışmalarım ve tez yazımında yardımlarını esirgemeyen, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan BALTACI ve Dr. Arş. Gör. Sümeyye AKBULUT'a

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Mehmet Akif ÖMEROĞLU ve Sayın Arş. Gör. Şeyda ALBAYRAK'a,

Benden samimiyetlerini, güzel sözlerini ve yardımlarını esirgemeyen, dostluklarını hep arayacağım çok değerli ekip arkadaşlarım Berrin ALGÜL'e Saadet Hilal ÖNDER'e Selda KILIÇ'a

Evlatları olmaktan gurur duyduğum, varlıkları ve dualarıyla beni desteklemekten bir an olsun vazgeçmeyen, hayattaki duruşları ile beni bugünlere kadar taşıyan babam İsmail MERAL'e, annem Fatma MERAL'e, abim Murat Samet MERAL'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Elifnur MERAL

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERZURUM ÇEVRESİNDEN TOPLANAN PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BİYOJEN AMİN DEGREDE ETME ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Elifnur MERAL

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: Tez çalışmasında, laktik asit bakteri (LAB) mikroflorası bakımından oldukça zengin içerikli bir kaynak olan peynir örneklerinden, LAB'nin izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen izolatların fenotipik özellikleri ortaya konuldu. Fenotipik olarak karakterize edilen bakteri izolatlarının; biyojen aminleri (BA) degrede edebilme potansiyelleri, gen seviyesinde biyokimyasal açıdan ve LC-MS analizi ile kantitatif olarak araştırıldı.

Yöntem: Tez çalışmasında, Erzurum ili ve ilçelerinden toplananan peynir örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi ve elde edilen izolatların LAB olup olmadığını belirlemek amacıyla, çeşitli fenotipik testler uygulandı. Potansiyel LAB olduğu tahmin edilen izolatların BA'ları degrede edebilme potansiyellerini araştırmak amacıyla, çeşitli genomik ve biyokimyasal metodlara başvuruldu. Bu amaçla öncelikle BA'ların oluşumunu sağlayan dekarboksilaz enzimine ait profili belirlemek amacıyla API 20E Sistem kullanılarak, biyokimyasal analiz yapıldı. API 20E Sisteme göre dekarboksilaz enzimi açısından negatif profile sahip olan izolatlar seçildi. Sonrasında belirlenen bu izolatların, BA'ları degrede etme özelliğine sahip olan multikopper oksidaz (MCO) enzimi açısından profilleri, hem genomik olarak hem de LC-MS analizi ile kantitatif olarak belirlendi. İlgili tüm enzim profilleri açısından istenilen tabloya sahip olan izolat, son aşamada moleküler olarak tür bazında tanılandı.

Bulgular: Tez çalışması kapsamında; fenotipik karakterizasyon işlemleri sonucunda 12 adet izolatın LAB olabileceği kanısına varıldı. Öncelikle 12 adet izolatın, API 20E Sistem aracılığıyla dekarboksilaz enzim aktivitesi biyokimyasal olarak belirlendi. Analiz sonucunda; yalnızca 4 adet izolatın dekarboksilaz negatif özellik taşıdığı görüldü. 4 adet izolatın daha sonra MCO enzim aktiviteleri, bu enzime ait spesifik primerler aracılığıyla gen seviyesinde araştırıldı. 4 adet izolat içerisinden yalnızca EM4 kodlu izolatın bu enzime ait gene sahip olduğu belirlendi. Tüm analizler açısından istenilen verilere sahip olan EM4 kodlu izolatın, bir sonraki aşamada; MCO enzim optimizasyonu yapıldı. Son aşamada; kadaverin, histamin, putresin ve tiramin aminlerinin olduğu ortama eklenen EM4 kodlu izolatın, bu ortamda aminleri parçalama yeteneği, LC-MS analizi ile kantitatif olarak belirlendi ve elde edilen grafikler yorumlanarak; en yüksek parçalanma yüzdesinin %83 oranında histamine, en düşük parçalanma yüzdesinin ise %26 oranında tiramine ait olduğu sonucuna varıldı. Son olarak; moleküler seviyede tanılanan EM4 kodlu izolatın, %99 oranında *Levilactobacillus brevis*'e benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Sonuçlar: Elde edilen verilerden yola çıkılarak; tüm parametreler açısından pozitif sonuç elde edilen EM4 kodlu *Levilactobacillus brevis*'in BA'ları parçalama noktasında oldukça önemli bir izolat olduğu görüldü. Bu izolatın hem gen, hem biyokimyasal seviyede hem de LC-MS analizlerine göre kantitatif olarak belirlenen yüzde hesaplarına bakıldığında, özellikle gıdalarda oluşan ve insan sağlığını tehdit eden BA gruplarını degrede ediyor olması, bu izolatı hem teknolojik olarak hem de gıda güvenliği açısından oldukça önemli bir noktaya taşımıştır. İzolatın; GRAS (Generally Recognized as Safe) mikroorganizma olarak kullanılabilmesi teknolojik özellikler açısından gıdalara eklenebilmesine BA'ları degrede etmesinden dolayı gıdaları iyileştirebilme potansiyeline sahip olabilmesinin kanıtlanması için, uygulama noktasında daha ileri boyutlu çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: biyojen amin, dekarboksilaz, multikopper oksidaz, laktik asit bakterisi

Haziran 2023, 65 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

INVESTIGATION OF THE BIOGEN AMINES DEGREE PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM CHEESE SAMPLES COLLECTED FROM ERZURUM AND ITS SURROUNDINGS

Elifnur MERAL

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: In the thesis study, LAB was isolated from cheese samples, which is a rich source of lactic acid bacteria (LAB) microflora. The phenotypic characteristics of the obtained isolates were determined. Phenotypically characterized bacterial isolates; Their potential to degrade biogenic amines (BA) was investigated biochemically at the gene level and quantitatively by LC-MS analysis.

Method: In the thesis study, bacterial isolation was performed from cheese samples collected from Erzurum province and its districts, and various phenotypic tests were applied to determine whether the obtained isolates were LAB. Various genomic and biochemical methods were used to investigate the potential of isolates presumed to be potential LAB to degrade BAs. For this purpose, biochemical analysis was performed using API 20E System in order to determine the profile of the decarboxylase enzyme, which provides the formation of BAs. According to the API 20E System, isolates with a negative profile for decarboxylase enzyme were selected. The profiles of these isolates in terms of the multicopper oxidase (MCO) enzyme, which has the ability to degrade BAs, were determined both genomically and quantitatively by LC-MS analysis. The isolate, which had the desired picture in terms of all relevant enzyme profiles, was molecularly identified on the basis of species in the final stage. **Findings:** Within the scope of the thesis; As a result of phenotypic characterization processes, it was concluded that 12 isolates could be LAB. First of all, decarboxylase enzyme activity of 12 isolates was determined biochemically by API 20E System. As a result of the analysis; only 4 isolates were found to be decarboxylase negative. The MCO enzyme activities of 4 isolates were then investigated at the gene level by means of specific primers of this enzyme. It was determined that only the EM4 coded isolate among 4 isolates had the gene for this enzyme. In the next step, the EM4 coded isolate, which has the desired data in terms of all analyzes; MCO enzyme optimization was performed. In the last stage; The ability of the EM4 coded isolate added to the medium containing cadaverine, histamine, putrescine and tyramine amines to degrade amines in this medium was determined quantitatively by LC-MS analysis and by interpreting the graphs obtained; It was concluded that the highest degradation percentage belonged to histamine at the rate of 83%, and the lowest percentage of degradation belonged to tyramine at the rate of 26%. Finally; It was determined that the EM4 coded isolate, which was identified at the molecular level, was 99% similar to *Levilactobacillus brevis*.

Results: Based on the data obtained; It was seen that EM4 coded *Levilactobacillus brevis*, which had positive results in terms of all parameters, was a very important isolate at the point of decomposition of BAs. Considering the percentage calculations of this isolate, determined both at the gene and biochemical level and quantitatively according to LC-MS analysis, the fact that it degrades BA groups that occur in foods and threaten human health, makes this isolate a very important point both technologically and in terms of food safety. has carried. Isolate; Further studies are needed at the point of application in order to prove that GRAS (Generally Recognized as Safe) can be used as a microorganism, can be added to foods in terms of technological properties, and has the potential to improve foods because it degrades BAs.

Keywords: Biogenic amines, multicopper oxidase, decarboxylase, lactic acid bacteria

June 2023, 65 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xi
GİRİŞ 1
KURAMSAL TEMELLER 4
Biyojen Aminler ve Genel Özellikleri 4
Biyojen Aminlerin Oluşum Mekanizmaları 5
Gıdalardaki Mikrobiyal Kaynaklı Biyojenik Aminler 7
Süt ve Süt Ürünleri 7
Et Ürünleri 8
Deniz Ürünleri 8
Fermente Sebze ve Soya Ürünleri 9
Fermente İçecekler 9
Özel Gıdalar 9
Biyojen Aminlerin Sağlık Üzerine Etkileri 9
Gıdalarda Biyojenik Amin Azaltma Stratejileri 11
Katkı Maddeleri 11
Hidrostatik Basınç 11
Işınlama 11
Pastörizasyon 12
Sıcaklık 12
Başlangıç Kültürü 12
Amin Oksidazlar (AO) 13
Bakır İçeren Amin Oksidazlar (CuAO) 13
Flavin İçeren Monoamin Oksidazlar (MAO) 13

Çoklu Bakır Oksidazlar (MCO) 14
Gıdalarda Biyojen Amin Miktarlarının Tespit Edilmesi 14
MATERYAL VE METOD 17
Materyal 17
Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar 17
Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler 18
Çalışmada Kullanılan Çözeltiler 19
Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması 19
Metot 20
Örnek Toplanması 20
Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu 20
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik Karakterizasyonu 20
Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi 21
Gram Boyama 21
Endospor Boyama Deneyi 21
Hareketlilik testi 22
Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 22
Katalaz testi 22
Oksidaz testi 22
İzolatların Biyojen Amin İçeriklerinin Belirlenmesi 22
Dekarboksilaz Aktivitesi 22
MCO (Multikopper oksidaz) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi 23
Seçilen İzolatlatın Moleküler Yöntemlerle Tanısının Yapılması 23
Genomik DNA İzolasyonu 23
İzolasyon Aşamaları 24
16S rRNA PCR İşlemi 25
16S rRNA PCR Elektroforez İşlemi 25
Kompetent Hücrelerin Hazırlanma İşlemi 25
Ligasyon İşlemi 26
Transformasyon İşlemi 26
Koloni Seçimi ve Sıvı Kültür İşlemleri 26
Koloni PCR İşlemi 26
Plazmit İzolasyonu, Kontrolü ve Konsantrasyonların Ölçme İşlemi 27
Seçilen İzolatın Multicopper Oksidaz MCO Geninin Spesifik PCR ile Belirlenmesi 27
MCO Enzim Optimizasyonu 28

MCO Enziminin Optimal Fermantasyon Süresinin Belirlenmesi 28
MCO Enziminin Optimal pH Değerinin Belirlenmesi 28
MCO Enziminin Optimal Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi 28
MCO Enziminin Aktivitesi Arttıran Ağır Metalin Belirlenmesi 29
İzolatlatın Biyojen Amin Parçalama Miktarlarının (LC-MS) ile Belirlenmesi 29
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 31
Bakteri İzolasyonu 31
Örneklerin Toplanması 31
Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu 31
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik Karakterizasyonunun Belirlenmesi 31
Dekarboksilaz Aktivitesi Sonuçları 32
Multikopper oksidaz (MCO) Enzim Aktivitesi Sonuçları 34
İzolatın Moleküler İdentifikasyonu 35
İzolatın 16S rRNA gen bölgelerinin çoğaltılması 35
16S rRNA gen bölgesinin klonlanması 35
16S rRNA sekans analizi 36
İzolatın MCO Geninin Spesifik PCR ile Belirlenmesi 37
MCO Enzim Optimizasyonu 38
MCO enziminin optimum fermantasyon süresinin belirlenmesi 38
MCO enziminin optimal pH değerinin belirlenmesi 39
MCO enziminin optimal sıcaklık değerinin belirlenmesi 40
MCO enziminin aktivitesi arttıran ağır metalin belirlenmesi 41
İzolatlatın biyojen amin parçalama miktarlarının LC-MS metodu ile belirlenmesi 42
SONUÇ VE ÖNERİLER 45
KAYNAKÇA 46
ÖZGEÇMİŞ 52

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Biyojen Aminlerin Kimyasal Özelliklere Göre Sınıflandırılması 4
Tablo 2. Çeşitli Fermente Gıdalarda Tespit Edilen Biyojen Aminler ve Konsantrasyonları 5
Tablo 3. Prekürsör Amino Asitler ve Biyojen Amin Çeşitleri 6
Tablo 4. Otoriteler Tarafından Gıda Ürünlerindeki Biyojen Aminler İçin Belirlenen Yasal Limitler ve Toksik Seviyeler 15
Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları 17
Tablo 6. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Üretici Firmaları 18
Tablo 7. İzolatların Fenotipik Karakterizasyon Sonuçları 31
Tablo 8. API 20E Okuma Tablosu 33
Tablo 9. İzolatın 16S rRNA Dizi Analiz Sonucu 36
Tablo 10. Kontrol ve Test grubuna ait biyojen amin konsantrasyonları 43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları 6
Şekil 2. Örnek: Seçilen izolatın eklendiği besiyeri; Kontrol: Seçilen izolatın eklenmediği besiyeri 30
Şekil 3. EM4, EM2, EM6, EM8 İzolatlarının API 20E Test Kiti Sonuçları 34
Sekil 3. İzolata ait 16S rRNA PCR bant görüntüsü 35
Şekil 4. Mavi beyaz tarama 36
Şekil 5. İzolatların koloni PCR bant profilleri 36
Şekil 6. MCO enzim geni görüntüsü 38
Şekil 7. MCO enziminin inkübasyon süresi grafiği 39
Şekil 8. MCO enziminin pH grafiği 40
Şekil 9. MCO enziminin sıcaklık grafiği 41
Şekil 10. MCO enziminin ağır metal grafiği 42
Şekil 11. Kontrol ve Test gruplarında biyojen aminlere ait LC-MS kromotogramları ve kütle spektrumları a) kadeverin, b) histamin, c) putresin, d) tiramin 43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C **:** Santigrat Derece

BA **:** Biyojen Amin

CAD **:** Kadaverin

DAO **:** Diamin Oksidaz

HIS **:** Histamin

HNMT **:** Histamin N-metiltransferaz

HPLC **:** Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

LAB **:** Laktik Asit Bakterisi

MAO **:** Monoamin Oksidaz

PUT **:** Putresin

SPD **:** Spermidin

SPM **:** Spermin

TRP **:** Triptamin

TYR **:** Tiramin

GİRİŞ

Beslenme; insanın yaşamını devam ettirebilmesi, gelişimini tamamlayabilmesi için protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve mineral gibi besinlerin günlük gereksinimlere göre belirli miktarlarda alınması olarak tanımlanmaktadır. Bu besinler bitki ve hayvansal gıda kaynaklarından elde edilmektedir.

Hayvansal gıdalardan biri olan süt ve süt ürünleri, insan beslenmesinde geniş bir yer tutmaktadır. Sütün gıda olarak tüketimi uzun zamandan beri var olmakla birlikte teknolojinin gelişmesi ve artan tüketici talebi ile çeşitli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Günümüzde birçok ülkede süt ürünleri, farklı beslenme alışkanlıkları ve muhafaza yöntemlerine bağlı olarak geleneksel veya modern teknolojik süreçler ile fermente edilerek çeşitli ürünler oluşturulmaktadır. Ülkemiz, birçok fermente ürüne ev sahipliği yapmaktadır. Bu tip proteince zengin fermente ürünlerde, biyojen amin (BA) adı verilen moleküller meydana gelmektedir (Akyol *et al*. 2015). BA'lar; balık ürünleri, et ürünleri, süt ürünleri ve yumurta gibi proteince zengin gıdalar ve fermente ürünlerde bol miktarda bulunmaktadır. BA'lar vücutta birçok fonksiyonun gerçekleştirilmesinde rol oynamaktadır. Buna ek olarak gıdalarda kalite indikatörü olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple BA'ların gıdalardaki miktarı, insan sağlığı açısından önem arz etmektedir.

BA'ların adlandırılmaları yapılarındaki Azot (N) sayıları ve kimyasal özellikleri baz alınarak yapılmaktadır. Gıdalarda oluşan önemli biyojen aminler sırasıyla; histamin (HIS), putresin (PUT), kadeverin (CAD), triamin (TRY), β-fenietilamin (PHE), spermidin (SPD) ve triptamindir (TRP) (Düz & Fidan, 2016).

Söz konusu amino asidin amin kısmı, bu amino aside ait karboksil grubunun dekarboksilaz enzim aktivitesi ile parçalanması sonucunda meydana gelir. Bu enzim, hayvansal ve bitkisel dokularda doğal olarak bulunmakta veya mikrobiyal aktivite ile üretilmektedir. Mikrobiyal dekarboksilasyonun, laktik asit bakterileriden (LAB), özellikle *Lactococcus, Lactobacillus* ve *Enterococcus* suşları ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Alper & Temiz, 2001).

Günlük olarak alınan BA'lar normal koşullarda vücudumuzdaki monoaminooksidaz (MAO) ve diaminooksidazlar (DAO) tarafından metabolize edilmektedirler. Ancak bireylerdeki bu enzimlerin olmaması durumunda, BA'lar detoksifiye edilememekte, vücutta birikimi meydana gelmekte ve zehirlenmelere yol açmaktadır. Amin zehirlenmelerinin tipik semptomları baş dönmesi ve mide bulantısıdır (Yerlikaya *et al*. 2002).

Gıdalarda BA'ların meydana gelmesi için uygun şartların oluşması, serbest bir aminoasitin ortamdaki varlığı ve dekarboksilaz pozitif mikroorganizmaların bulunması gibi koşulların oluşması gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında; BA'ları parçalamadaki temel prensipler; serbest amino asit varlığını inhibe etmekle beraber, optimal şartların oluşumunu engellemektir. Bu stratejiler besinin lezzet ve kalitesini düşürdüğü için pek tercih edilmemektedir. Günümüzde yapılan çalışmalar sonucunda aminleri parçalayıcı enzime (ADE) sahip mikroorganizmaları kullanmanın daha akılcı bir yaklaşım olarak gözüktüğü bilinmektedir (Li *et al*. 2020).

Fermente gıdalarda (peynir, sosis, şarap) çok sayıda amin parçalayıcı mikroorganizma bulunmaktadır ve bu mikroorganizmalar gıdalardaki BA içeriğini kontrol etmek için uygulanmıştır. Ayrıca araştırmacılar, mikrobiyal amin parçalayıcı aktivitenin, amin oksidaz enzimi (AO) ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu nedenle, türün birden çok BA'yı bozma yeteneği, mikroorganizmada bulunan birden çok AO'nun varlığından kaynaklanıyor olabileceği öne sürülmüstür. Ancak multicopper oksidaz (MCO) keşfedilir keşfedilmez bu sonuç tamamen çürütülmüş, MCO'nun birden fazla BA'yı bozabileceği tespit edilmiş ve sonuçlar birçok araştırmacı tarafından doğrulanmıştır (Wang *et al*. 2022).

Gıdalardaki BA'ların içeriğini belirlemek için bir dizi analitik ve moleküler yöntem geliştirilmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) ve ince tabaka kromatografisi (TLC) gibi analitik yöntemler kullanılarak BA'ların miktarı belirlenebilmektedir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve eşzamanlı PCR (Real Time PCR) BA üreten suşlardaki gen bölgelerini saptamak için kullanılan moleküler yöntemlerdir (Göncü, 2017)

Yukarıda bahsedilen tüm bu bilgilerden yola çıkarak hedeflenen tez çalışması kapsamında, öncelikle BA'ları degrede edebilen LAB'ni tespit edebilmek amacıyla, LAB yoğunluğunun fazla olduğu düşünülen peynir kaynak olarak tercih edilmiş ve bu kaynaktan bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bakterilerin bu çalışmaya hizmet edecek olan LAB olup olmadığını test etmek amacıyla, fenotipik ve genotipik tanı yöntemleri kullanılmıştır. Bu aşamadan sonra, BA'ları degrede edebilme noktasında kilit role sahip çeşitli enzimlerin (MCO, dekarboksilaz) üretim profillerinin ortaya konulabilmesi için, BioMerieux firması ait çeşitli API test kitlerine başvurulmuştur. API test kitleri ile özellikle bizi, BA'ları degrede eden LAB'ne götürecek olan kaynaklar belirlenmiş ve bu kaynakların bu amaçtaki rolü ortaya konulmuştur. Sonrasında özellikle dekarboksilaz ve MCO enzim aktivitesi açısından değerlendirilen izolatların, belirtilen enzimlerin optimizasyonu açısından değerlendirilmesi öngörülmüş ve enzim optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Enzim üretim

potansiyeli kanıtlanmış, enzim optimizasyon çalışması tamamlanmış olan izolatın daha sonra BA'ları degrede edebilme potansiyellerini belirlemek amacıyla BA içeren ortamdaki davranışları LC-MS ile ölçülmüştür.

KURAMSAL TEMELLER

Biyojen Aminler ve Genel Özellikleri

Biyojen aminler (BA), çeşitli metabolik aktivitelerle ortaya çıkabilen azotlu bileşiklerdir. Tipik olarak düşük molekül ağırlığına sahip olan BA'lar dekarboksilasyon olayı ile, amino asidin karboksil grubunun uzaklaştırılmasıyla oluşur. (Mohedano *et al*. 2015; Ordóñez *et al.* 2017). Dekarboksilaz enzimi, dekarboksilasyon mekanizmasını katalize eder (Nuñez *et al*. 2016). Dekarboksilaz enzimi bitki ve hayvan dokularında bulunmakla birlikte mikroorganizmalar tarafından da üretilebilir. Gıdalarda mikrobiyal aktivite ile oluşan BA'lar oldukça yaygındır (Aktop & Şanlıbaba, 2018). BA oluşumunda özellikle 3 mekanizma etkilidir. Bunlar; aminoasitlerin dekarboksilasyonu, aldehit ve ketonların aminasyonu ve transaminasyonudur. Isıl işlemler ile BA'ları parçalamak zordur. Bu nedenle gıda işleme ve depolama aşamalarında BA miktarı, bozulma göstergesi veya kalite kriteri olarak kabul edilmektedir (Saaid *et al.* 2010). BA'lar; içerdikleri Azot (N) sayısına göre, monoaminler, diaminler ve poliaminler olarak; kimyasal özelliklerine göre ise alifatik, aromatik, uçucu ve heterosiklik olarak sınıflandırılabilirler (Peña-Gallego *et al*. 2012).

Tablo 1. Biyojen Aminlerin Kimyasal Özelliklere Göre Sınıflandırılması (Peña-Gallego *et al*. 2012)

Alifatik	**Aromatik**	**Uçucu**	**Heterosiklik**
Putresin	Triamin	Etilamin	Histamin
Kadaverin	Feniletilamin	Metilamin	Triptamin
Spermin		Dimetilamin	
Spermidin		İzopropilamin	

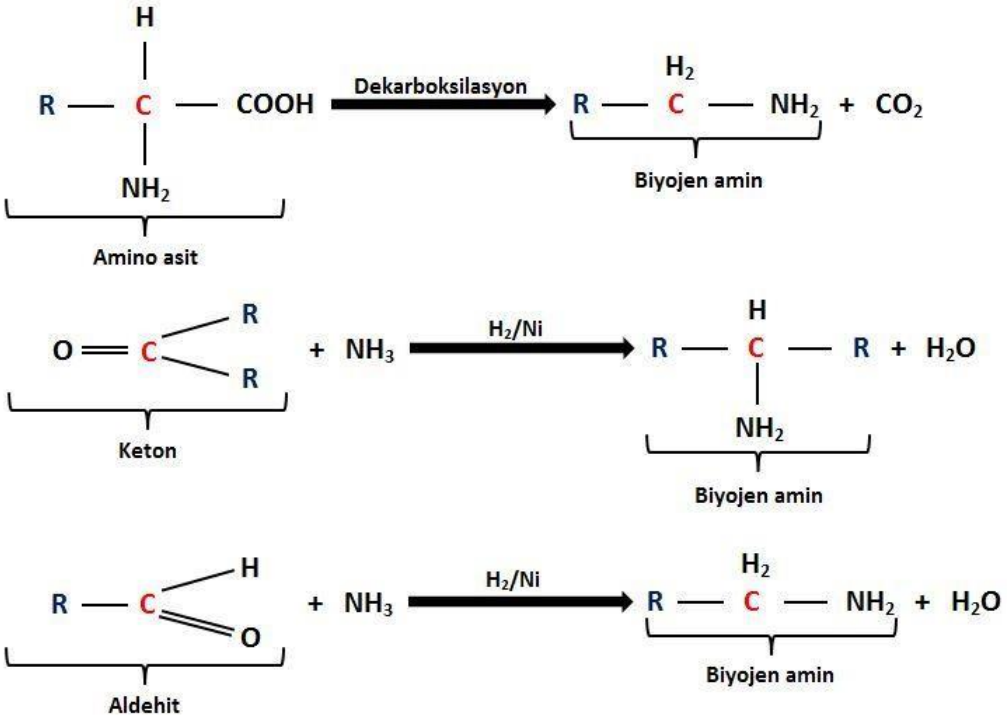
Litaratür taramalarında; tiramin, histamin, kadaverin, putresin, spermin, spermidin, triptamin, agmatin, etilamin ve metilamin gibi BA'ların gıdalarda yaygın olarak bulunduğunu görülmüştür (Munir *et al.* 2020; Wojcik *et al*. 2021; Suzzi *et al.* 2022). BA'lar, protein açısından zengin gıdalarda, özellikle fermente ürünlerde yaygın olarak bulunmaktadır. Tablo 2'de çeşitli fermente gıdalarda bulunan BA'lar ve konsantrasyonları gösterilmektedir.

Tablo 2. Çeşitli Fermente Gıdalarda Tespit Edilen Biyojen Aminler ve Konsantrasyonları (Behera *et al.* 2021, Huang *et al.* 2021, Meng *et al.* 2022).

Gıda	**Tespit Edilen Biyojen Amin**	**Tespit Edilen Konsantrasyon**
Otlu peynir	Kadaverin	1844,5 mg/kg
Kefir	Kadaverin, spermidin ve putresin	0,3-12,1 mg/L
Salam	Putresin ve tiramin	77,14 mg/kg
Sosis	Putresin, histamin ve kadaverin	689,89 mg/kg
Salam	Agmatinve spermin	8,3 mg/kg
Şarap	Histamin, tiramin, putresin, kadaverin, spermin, spermidin, agmatin, triptamin	3,6-83 µg/L
Peynir	Histamin, tiramin ve triptamin	50 – 100 µg/kg
Soya sosu	Histamin, putresin, Spermidin, Tiramin	20-60 µg/kg
Fermente inek sütü	Tiramin Spermidin	249.6 mg/L 82.9 mg/L

Biyojen Aminlerin Oluşum Mekanizmaları

BA'ların oluşumunda iki ana mekanizma rol oynamaktadır. Birincisi; amino asitlerin dekarboksilaz enzimi tarafından dekarboksilasyon olayıdır. İkincisi ise aldehitlerin ve ketonların aminasyonunu ve transaminasyonudur. (Peña-Gallego *et al.* 2012; Stojanović & Kos, 2020). Şekil 1'de BA oluşma mekanizmaları kısaca özetlenmiştir.



Şekil 1. Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları (Santos, 1996)

BA'lar Tablo 3'te gösterildiği gibi dekarboksilaz enziminin parçaladığı prekürsör amino aside göre isimlendirilmektedirler.

Tablo 3. Prekürsör Amino Asitler ve Biyojen Amin Çeşitleri (Biji *et al*. 2016; Özogul & Özogul, 2019).

Prekürsör amino asit	**Biyojen amin**
Tirozin	Tiramin
Histidin	Histamin
Lisin	Kadaverin
Ornitin	Putresin
Arginin	Agmatin
Arginin ve Putresin	Spermin ve Spermidin
Triptofan	Triptamin
Fenilalanin	β-feniletilamin

Gıdalardaki Mikrobiyal Kaynaklı Biyojenik Aminler

Gıdalardaki BA'lar, amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonu sonucunda oluşmaktadır. Bu mekanizma, ortamdaki serbest amino asitlerin varlığından ve ortamdaki dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip mikroorganizmaların varlığından etkilenmektedir. Mikrobiyal aktivite sonucu oluşan BA'lar; süt ürünleri, deniz ürünleri, fermente sebzeler, et ürünleri ve fermente içeceklerde yaygın olarak görülmektedir (Benkerroum *et al.* 2016; Doeun *et al*. 2017). Dekarboksilaz enzim aktivitesi bakterilerde yaygın olarak görülen bir durum değildir. *Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc* ve *Pediococcus* gibi bazı laktik asit bakteri (LAB) üyelerinin, amino asitleri dekarboksile edebildiği gösterilmiştir (Cubon *et al.* 2019; Luengo & Olivera, 2020). Birkaç LAB türünün özellikle tiramin üretimine dahil olduğu görülmekle birlikte diğer yandan kadaverin, putresin ve feniletilamin gibi BA'ların *Micrococcaceae* familyasının üyeleri tarafından üretilebildiği tespit edilmiştir. Dekarboksilaz enzimi açısından pozitif olan bakteriler, gıda mikrobiyotasında doğal olarak bulunur ve kontaminasyon yoluyla gıdaya aktarılabilir (Akyol *et al.* 2015). Mikroorganizmaların dekarboksilaz aktivitesini ve BA'ların üretimini etkileyen bir dizi faktör vardır. Sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonu bu faktörlerden bazılarıdır. Ortamdaki starter kültürlerin varlığı da dekarboksilaz aktivitesini etkilemektedir (Doeun *et al*. 2017; Durak-Dados *et al.* 2020). Dekarboksilaz pozitif bakterilerin gelişimi 4' ün altındaki pH değerleri ile sınırlı olduğundan, BA üretme yetenekleri de buna bağlı olarak sınırlıdır (Yeğin & Üren, 2008). Bakterilerin BA üretmesi için optimal ortam sıcaklığında olmaları gerekmektedir. Bu sıcaklıklar her bir bakterinin tür ve özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, 10 °C'de BA üretemeyen *Enterobacter cloacae*'nin, 20 °C'de putresin ürettiği gözlemlenmiştir. BA üretiminde, özellikle peynir ve balık üretimi yapan şirketler için sıcaklığın önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (Gardini *et al*. 2016). Üretimdeki bir diğer önemli faktör ise tuz konsantrasyonudur. Yüksek tuz konsantrasyonları, birçok bakterinin büyümesini ve buna bağlı olarak BA'ların üretimini engellemektedir.

Süt ve Süt Ürünleri

Süt ve süt ürünlerinin, BA üreten başlıca gıdalar olduğu, sıklıkla rapor edilmiştir. Süt ürünlerinde BA'ların oluşumundan öncelikle LAB, maya ve küf gibi mikroorganizmalar sorumludur. Süt ürünlerinde başlıca BA üreten bakterilerin *Enterococci, Streptococci, Lactobacillus* ve *Leuconostoc* türler olduğu bildirilmiştir (Papageorgiou *et al.* 2018). Peynir, BA oluşumu için en çok çalışılan süt ürünlerinden biridir. Peynirde BA'ların üretiminde Gram (+) bakteriler yer alır. Bununla birlikte, peynirdeki mikroorganizmalar tarafından üretilen BA'lar genellikle tiramin ile ilişkilendirilir. Yüksek düzeyde tiramin içeren

peynirlerin tüketilmesi "peynir reaksiyonu" adı verilen bir etkiye neden olur (de la Torre & Conte Jr, 2018). Genellikle çeşitli peynirlerden izole edilen *E. faecalis, E. faecium ve E. durans,* güçlü tiramin üreticileri olarak kabul edilir. 125 mg/kg ve üzeri tiramin alımının insan sağlığını olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Fernández *et al.* 2007; Andiç *et al.* 2010). Tiramin dışında kadaverin, histamin, putresin, triptamin ve feniletilamin gibi BA'larında peynirden izole edildiği bilinmektedir (Mayer & Fiechter, 2018; Gama & Rocha, 2020; Ramos *et al.* 2020). Peynirde üretilen BA'ların miktarı birçok faktöre bağlıdır. Peynirin türü, peynir üretim süreci, fermentasyon sırasında ortama eklenen mikroorganizmalar ve depolama süresi dekarboksilaz aktivitesini etkileyen faktörlerden bazılarıdır (Papageorgiou *et al.* 2018). Fermentasyon genel olarak peynirdeki BA miktarını arttıran bir işlemdir. Ek olarak, pastörize sütten yapılan peynirlerde sınırlı BA oluşumu rapor edilmiştir (O`Sullivan *et al.* 2015). Dekarboksilasyon aktivitesine sahip bakteriler peynire başlangıç kültürlerinden, çiğ süt yoluyla veya fermentasyon sırasında kontaminasyon yoluyla aktarılabilmektedir (O`Sullivan *et al.* 2015).

Et Ürünleri

Et ve et ürünleri, BA'lrın en fazla bulunduğu besin gruplarından biridir. *Escherichia, Salmonella, Proteus, Shigella* ve *Citrobacter* cinsine ait çeşitli gibi bakterilerin et ve tarım ürünlerinde BA üretiminde rol aldığı düşünülmektedir. Çiğ etteki bu bakteriler genellikle histamin, tiramin, kadaverin ve putresin oluşumu ile ilişkilendirilir (Schirone *et al*. 2022).

Deniz Ürünleri

Deniz ürünlerinin doğal mikrobiyotasına *Vibrioceae, Lactobacillus, Pseudomonas, Bacillus, Clostridium, Acinetobacter* ve *Flavobacterium* gibi mikroorganizmalar hakimdir. Su ürünlerinde tiramin, putresin, kadaverin, triptamin ve özellikle histamin gibi birçok BA varlığının bu baskın mikrobiyota tarafından üretildiği bildirilmiştir (Visciano *et al.* 2012; Biji *et al*. 2016). Balıklardan izole edilen *Morganella morganii, Klebsiella pneumoniae, Hafnia aluei* ve *Photobacterium phosfoeum*'un güçlü histamin üreticileri olduğu rapor edilmiştir. Deniz ürünlerinde oluşan BA'lar ciddi zehirlenmelerle ilişkilendirilmiştir. Çeşitli balık türleri tarafından alınan yüksek seviyelerde histamin, "scombroid zehirlenmesi" veya "histamin zehirlenmesi" olarak adlandırılan ve ölümcül olabilen ciddi zehirlenmelere neden olur. Scombroid zehirlenmesi genellikle Scombidae familyasına ait balıklarla ilişkilidir. Scombroid zehirlenmesinin belirtileri baş ağrısı, ishal, mide bulantısı, kusma, kaşıntı ve yanmadır (Zhao *et al*. 2022).

Fermente Sebze ve Soya Ürünleri

Taze meyve ve sebzelerde BA'ların oluşumunun nedeni mikrobiyal kaynaklı enzimatik aktivitelerdir. Fermente edilmiş veya taze meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan BA'lar arasında tiramin, histamin, putresin, kadaverin, spermin ve spermidin bulunmaktadır (Papageorgiou *et al.* 2018).

Fermente İçecekler

Yüksek miktarda BA barındıran fermente alkollü içecekler arasında bira, şarap ve sirke bulunmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* gibi maya türleri, bira üretiminde fermantasyona katılır. Histamin ve tiraminin bira üretimi sırasında mikroorganizmalar tarafından üretildiği bildirilmiştir. Şaraptaki temel BA'lar tiramin, histamin ve putresindir. Ayrıca şarapta az miktarda kadaverin ve feniletilamin bulunmaktadır (Guo *et al.* 2015). Şarapta BA oluşumu genellikle LAB ile ilişkilidir. *Lactobacillus, Pediococcus* ve *Oenococcus* cinsine ait türler, şaraptan izole edilen başlıca BA üreticileridir.

Özel Gıdalar

Çikolata ve kahve gibi gıdalarda; LAB, maya ve asetik asit bakterileri, BA'ların oluşumunda yer alan bakterilerdir. Çikolatanın ham maddesi olan kakao çekirdeklerinde histamin, serotonin, dopamin ve feniletilamin gibi BA'lar tespit edilmiştir. Ancak tiramin, histamin, triptamin, 2-feniletilamin, dopamin ve serotonin hem kakaoda hem de çikolatada bulunmaktadır. Çikolata, tipik olarak yüksek düzeyde feniletilamin içeren özel bir besindir. Yüksek konsantrasyonlarda vücuda giren feniletilaminin baş ağrısı ve tansiyon yükselmesi gibi semptomların yanı sıra kızarıklık gibi cilt reaksiyonlarına neden olduğu bilinmektedir Bununla birlikte, putresin, spermin, spermidin serotininin kahve ve kahve çekirdeklerinde en yaygın BA'lar olduğu bildirilmiştir. (Papageorgiou *et al.* 2018).

Biyojen Aminlerin Sağlık Üzerine Etkileri

Gıdaların tüketimiyle vücuda giren yüksek düzeydeki BA'lar, sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından inaktive edilemeyen BA'lar bağırsakta emilir ve metabolize edilir. Genetik kusurları veya bozulmuş katabolizmaya sahip kişilerde şiddetli semptomlar görülmektedir. Düşük konsantrasyonlarda sağlık açısından tehlike oluşturmazlar (Pradenas *et al*. 2016). BA'ların neden olduğu semptomlar, şiddetlerine göre sınıflandırılabilir. Bu nedenle çeşitli reaksiyonlara, intoleranslara veya zehirlenmelere neden olabilirler. Yüksek konsantrasyonlarda emilen BA'ların mide bulantısı, baş ağrısı, hipotansiyon, hipertansiyon ve cilt alerjileri gibi semptomlara neden olduğu bilinmektedir

(Vinci *et al*. 2021). BA'lar, sindirim sistemindeki spesifik enzimler aracılığı ile detoksifiye edilir. Bu enzimler arasında diamin oksidaz (DAO), histamin N-metiltransferaz (HNMT) ve monoamin oksidaz (MAO) bulunmaktadır (Munir *et al.* 2020). MAO' lar hasar gördüğünde, vücutta BA'lar birikir ve zehirlenmelere sebebiyet verir. Vücutta biriken ve zehirlenmelere neden olan en yaygın BA'lardan biri histamindir. Öncü amino asidi olan histidinin dekarboksilasyonu ile üretilen histamin, güçlü biyolojik aktiviteye sahip bir bileşiktir. Histamin yaygın olarak çeşitli su ürünleri, özellikle balık ve fermente gıdalar ile ilişkilidir (Gardini *et al.* 2016; Moreno-Arribas *et al.* 2022). Histamin yüksek seviyelerde alındığında nefes darlığı, baş ağrısı, ateş, kusma ve bazı sindirim sorunlarına neden olabilir. Bu semptomların yanı sıra histaminin kaşıntı ve kızarıklık gibi cilt rahatsızlıklarına da neden olduğu belirtilmiştir (Zhao *et al*. 2022). Histaminin alt limiti 10 mg'dır. Ancak 5-10 mg arasında histamin alımının hassas bireyleri etkileyebildiği bilinmektedir. 100 mg histamin alımının orta derecede toksik etkilere neden olduğu ve 1000 mg histamin alımında yüksek düzeyde toksik etkilere neden olduğu bulunmuştur (Dong & Xiao, 2017). Vücuda besinler yoluyla giren ve vücutta birikerek toksisiteye neden olan bir diğer BA ise tiramindir. Tiraminin migrenle sıklıkla ilişkilendirildiği bilinmektedir. Baş ağrısı, bulantı, kusma, hedef organ hasarı, intraserebral kanama gibi belirtilere neden olabilir. Vücuda alınan yüksek seviyelerde tiramin, arteriyel kan basıncını arttırır. Bu durumun kalp atış hızını arttırdığı ve hipertansif krize yol açabileceği rapor edilmiştir (Özogul & Özogul, 2019; Rafehi *et al.* 2019; Stahl & Felker, 2008). Toksik olduğu bilinen ve gıdalarda yaygın olarak bulunan putresin ve kadaverinin, histamin ve tiramin gibi BA'lar toksik etkilerini, özellikle detoksifikasyon enzimlerinin inhibe etme yetenekleri sayesinde güçlendirdiği bulunmuştur (Dong & Xiao, 2017). Kadaverin ve putresin, nitritlerle reaksiyona girdiğinde oldukça toksik nitrozaminler üretilebilir (Kim *et al.* 2009). Birçok BA, toksik etkilerine rağmen insan ve hayvan fizyolojisinde önemli roller oynamaktadır. Fizyolojik fonksiyonlarda yer alan BA'ların örnekleri arasında feniletilamin türevleri (adrenalin, dopamin, vb.) yer alır. Bu BA'lar kan dolaşımının düzenlenmesinde rol oynayarak sinir sistemi ve düz kas üzerinde etki gösterirler (Aktop & Şanlıbaba, 2018). Sperm, spermidin ve putresin bitkilerde çiçeklenme ve meyve verme gibi süreçlerde rol oynar. Ek olarak BA'lar, DNA ve RNA stabilitesi, hücre farklılaşması ve çoğalması, nükleik asit fonksiyonunun ve hücre döngüsü düzenlenmesi gibi hücresel olaylarda yer alır (Setia & Setia, 2018; Luengo & Olivera, 2020). Uluslararası düzenlemelerde BA konsantrasyonları için deniz ürünleri hariç herhangi bir alt sınır belirlenmemiştir. Avrupa Birliği (AB) tarafından histamin limitleri belirlemek için geliştirilen bu yönetmelik, deniz ürünlerinde alt sınır limitlerinin aşılıp aşılmadığını kontrol etmeyi amaçlamıştır (Papageorgiou *et al.* 2018). Bazı ülkeler şarapta histamin alt sınırı belirlemiştir.

Almanya'da 2 mg/L, Belçika'da 5-6 mg/L ve Fransa'da 8 mg/L olarak ölçülen histamin konsantrasyonu buna bir örnek olabilir (Costantini *et al.* 2019).

Gıdalarda Biyojenik Amin Azaltma Stratejileri

Modifiye atmosfer paketlemesi

Ambalajlama işlemindeki kullanılan karbondioksit, histamin BA'ini üretme yeteneğine sahip bakterilerin büyümesini engelleyerek gıda raf ömrünü uzatmada önemli bir rol oynar. MAP'ta bulunan %75-100 CO_2'nin filetolardaki BA içeriğini önemli ölçüde azaltabileceği bildirilmiştir. Ek olarak, 4 °C'de saklanan vakumlu paketler, vakumlu olmayan ve hava korumalı paketlere göre daha düşük BA içeriği göstermiştir. MAP'ta 4 °C'de 23 güne kadar saklanan pişmiş tavuk, hava ile paketlenmiş olana kıyasla tiramin ve putresin üretimini azaltmıştır (Li & Lu, 2020).

Katkı Maddeleri

Katkı maddesi kullanımının, gıdalarda BA oluşumunu engelleyebileceği bildirilmiştir. 25 °C'de 10 gün bekletilen uskumrudaki, dekarboksilaz aktivitesini inhibe etmek ve histamin üretimini önlemek için D-sorbitol, süksinik asit, malik asit ve askorbik asit ile muamele edilebileceği bildirilmiştir. Yuecel ve Ueren, lahana turşusundaki %1'lik sitrik asidin fermantasyon sırasında biyojenik amin içeriğini azaltabileceğini bildirmiştir. Roseiro ve ark'nın yaptığı çalışmada sosise eklenen %6'lık tuzun putresin, tiramin, kadaverin düzeylerini azalttığını bildirmiştir.

Hidrostatik Basınç

Yüksek hidrostatik basınç, ham maddelerde ve gıdalarda bakteri sayısını ve BA birikimini azaltır. Lanchiotti ve ark'nın yaptığı çalışmada yüksek basınçlı sütten yapılan peynirin çiğ sütten yaklaşık 2,5 kat daha az BA'ya sahip olduğu göstermiştir. Ruiz-Capillas *et al.* (2019), yaptıkları çalışmada, paketlenmiş sosislerde putresin, kadaverin ve tiramin oluşumunun, vakum ve hidrostatik basınç işlemleriyle önemli ölçüde azaltıldığını bildirmiştir.

Işınlama

Gıda işlemede BA'yı azaltmak için birkaç ışınlama uygulaması vardır. Mavi uskumrunun gama ışınlamasının; histamin, tiramin, kadaverin ve putresin seviyelerini düşürdüğü, palamuttaki histamin seviyelerini önemli ölçüde azalttığı ve soya fasülyesinde BA üretimini etkili bir şekilde azalttığı bildirilmiştir. Işınlanmış sosislerdeki BA seviyeleri de ışınlanmamış sosislere kıyasla daha düşük olduğu ve ışınlanmış olgun sosislerdeki BA

seviyelerinin düştüğü bildirilmiştir. Ek olarak, ışınlama ile tedavi edilen tavuk, sığır eti ve domuz eti, tedavi edilmeyen kontrole kıyasla BA içeriklerinde önemli ölçüde azalma göstermiştir (Li & Lu, 2020).

Pastörizasyon

Bu işlemin, gıdalarda BA oluşumunu önleyebileceği bildirilmiştir. Peynir yapımından önce sütün ısıl işlemi ve pastörizasyonu sonucunda BA içeriğinde bir azalmanın tespit edildiği bildirilmiştir.

Sıcaklık

İşleme ve depolama sıcaklıkları, gıdada BA oluşumunu önlemek veya inhibe etmek için önemli bir stratejidir. Bunkova ve ark'nın yaptığı çalışmada, 5 °C'de olgunlaştırılmış Edam peynirindeki putresin, kadaverin ve tiramin konsantrasyonlarının, 10 °C'de olgunlaştırılmış peynirden daha düşük olduğunu göstermiştir. FDA (Food and Drug Administration) Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktalarına (HACCP) dayalı olarak, balıklarda histamin birikimini önlemek için işleme ve depolama için 4,4 °C veya daha düşük bir sıcaklık önerilmiştir (Li & Lu, 2020).

Başlangıç Kültürü

Fermente ve proteince zengin gıdalarda BA oluşumu gözlemlenmiştir. Bu mekanizmaya temel olarak olarak, amin (+) ve amin indirgeyici mikroorganizmalar hakimdir. Fermente gıdalarda (peynir, sosis, şarap, elma şarabı) çok sayıda amin parçalayıcı mikroorganizma (ADE) bulunmaktadır ve bu mikroorganizmalar ayrıca bu gıdalardaki BA içeriğini kontrol etmek için uygulanmıştır. Araştırmacılar, mikrobiyal amin parçalayıcı aktivitenin amin oksidaz (AO) ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu nedenle, türün birden çok BA'yı bozma yeteneği, mikroorganizmada bulunan birden çok AO enziminin varlığından kaynaklanıyor olabileceği öne sürülmüştür. Sonrasında multikopper oksidaz (MCO) keşfedilir keşfedilmez bu sonuç tamamen çürütülmüş, MCO'nun birden fazla BA'yı bozabileceği tespit edilmiş ve sonuçlar birçok araştırmacı tarafından doğrulanmıştır. LAB, renk ve tat oluşumu için önemli olan asitleştirici, proteolitik ve lipid oksitleyici özellikleri nedeniyle fermente ürünlerde en yaygın kullanılan başlatıcılardır. Amin parçalayan suşları taramak ve starter kültürlere uygulamak, fermente yiyecek veya içeceklerde BA birikimini kontrol etmek için mükemmel bir stratejidir (Li & Lu, 2020).

Amin Oksidazlar (AO)

AO'lar ilk olarak Yamada *et al.* (1965), tarafından *Aspergillus niger*'de, nitrojen kaynağı olarak monoamin veya diamin içeren ortamlarda büyütüldüğünde miselyumunda AO oluşabileceği bulunmuştur. AO'lar, BA'yı amonyak ve aldehite indirgeyebilen bir oksidatif deaminazdır. AO'lar, flavin içeren monoamin oksidazlar (MAO, EC. 1.4.3.4), bakır içeren oksidazlar (CuAO) veya diamin oksidazlarında (DAO, EC. 1.4.3.4) dahil olduğu bir oksidoredüktaz sınıfına aittir. AO'lar, hücre duvarında doğal olarak bir antitoksidan olarak görev yaparlar, BA'nın hücreye girmesini engelleyip, hücre içi ve hücre dışı asit-baz homeostazını korurmaktadırlar. Ancak AO'lar çeşitli maddelerle veya bazı ilaçların (klavulanik asit, verapamil, asetilsistein, metoklopramid) etkisiyle inhibe olabilirler. BA zehirlenmesinin ana nedenlerinden biri de, insan vücudunda büyük miktarda BA birikmesine neden olan AO aktivitesinin inhibisyonudur.

Bakır İçeren Amin Oksidazlar (CuAO)

Bakır içeren amin oksidaz (CuAO), aminleri aldehitlere oksitler. Enzim, 2 tür kofaktör içermektedir. Bunlar 2,4,5-trihidroksifenilalanin kinon (TPQ) ve lizin tirosilkinon'dur (LTQ). TPQ'lar da dahil olmak üzere CuAO'lar, maya, bakteri, mantar, hayvan ve bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadırlar. CuAO'lar tarafından katalize edilen amin ayrışma mekanizmasını aydınlatmak için hali hazırda birçok çalışma yürütülmektedir. *Arthrobacter kristalopoietes* KAIT-B-007'den saflaştırılan termostabil CuAO'ların, histamin degradasyon mekanizmasında yer aldığı kanıtlanmıştır. Başka bir çalışmada ise, *Arthrobacter aurescens* TC-1'den izole edilen, ve *E. Coli*'de eksprese edilen CuAO'ların, tiramin ve histamine karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Nagakubo *et al*. 2019)

Flavin İçeren Monoamin Oksidazlar (MAO)

CuAO'lara benzer şekilde, MAO'da elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanır ve bazı mikroorganizmalarda bulunan MAO, oksijeni eş zamanlı olarak indirgeyerek BA'da dahil olmak üzere çeşitli biyomolekülleri oksitleyebilmektedir. Benzerliklere rağmen, MAO ve CuAO enzimleri diğer yönlerden farklılık göstermektedir. Şu anda, MAO'lar üzerine yapılan araştırmalarda, esas olarak enzim tanımlama, enzimle ilişkili genlerin analizi ve aminleri parçalama yeteneklerinin değerlendirilmesine odaklanılmıştır. *Micrococcus luteus* ve *K.oxyspor*'un MAO'ları, tiramin ve tiraminle ilişkili bileşiklere karşı yüksek özgüllüklerinden dolayı tiramin oksidazlar olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca MAO'nun yapısal genleri araştırmacılar tarafından incelenmiştir. *Klebsiella pneumoniae*'de MAO yapısal genleri maoA ve maoC içeren bir MAO operonu keşfedildilmiştir (Sugino *et al.* 1992)

Çoklu Bakır Oksidazlar (MCO)

MCO'lar hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunmaktadır. MCO enzimi, zararsız katalitik ürünleri nedeniyle kağıt ve gıda endüstrileri gibi hayatın birçok alanında kullanılmaktadır. Moleküler biyolojide, MCO'lar mononükleer bakır merkezlerinden elektronları kabul eder ve onları trinükleer bakır merkezlerine aktarır. Oksijen, dört elektron aldıktan sonra trinükleer merkez ile birleşir ve iki su molekülüne indirgenir. MCO'lar doğada yaygın olarak bulunmasına karşın, bakterilerde MCO'larla ilgili çalışmalar hala sınırlıdır. Bakteriyel MCO'lar daha geniş substrat çeşidine ve pH skalasına sahiptir. Alkali ortamlara mantarlarda bulunan MCO'dan daha toleranslıdır. Fungal MCO'ların prokaryotik konaklarda aktif formda ifade edilmesi zordur ve mevcut pazar gereksinimlerini karşılayamaz. Öte yandan bakteriyel MCO'lar, transkripsiyon sonrası modifikasyonlar gerektirmez ve prokaryotik konakçılarda çözünür formda ifade edilebilir. Ayrıca, MCO aktivitesi, protein mühendisliği çalışmaları ile geliştirilebilir.

MCO enziminin birçok substratı okside etme kabiliyeti, hücre dışı ekspresyon özelliği, yüksek stabilitesi, geniş pH ve sıcaklık aralıkları, MCO enziminin yüksek potansiyel uygulama imkanı sunmaktadır. Lakkaz benzeri bir enzim olarak karakterize edilen MCO grubu, esas olarak yeni bileşiklerin sentetik reaksiyonlarında bir biyokatalizör olarak görev almaktadır. Dolayısıyla bu avantajlar, mevcut çalışmalarda bakteriyel MCO'ları, özellikle lakkazları değerlendirme eğilimindedir. Genetik mühendisliği yöntemleri ayrıca enzimleri ve enzimle ilgili genleri tanımlamak ve karakterize etmek için yaygın yöntemlerdir. MCO'lar doğada yaygın olarak bulunmasına rağmen BA'lar üzerine yapılan çalışma sayısı hayli azdır.

Guaiacol, diamonyum gibi bazı maddeler 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) tuzu (ABTS), 2,6-dimetoksifenol (DMP) ve katekol, uzun süredir lakkazlar için model substratlar olarak tanımlanmıştır (Li & Lu, 2020).

Gıdalarda Biyojen Amin Miktarlarının Tespit Edilmesi

Gıdalarda BA'lar için güvenlik önlemleri alınırken, birkaç faktör göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar;

1. BA etkilerinin limitlerinin belirlenmesi

2. Gıda üretim sürecinin kalite kontrolünün yapılması ve gıda kalitesi ve güvenliğinin sağlanmasıdır. Gıdalardaki BA'ların miktarları için uluslararası kuruluşlar tarafından belirlenen belirli bir sınır yoktur. Ancak, bazı ülkeler şarap ve balık gibi gıdalarda histamin düzeylerini yasallaştırmıştır.

Tablo 4. Otoriteler Tarafından Gıda Ürünlerindeki Biyojen Aminler İçin Belirlenen Yasal Limitler ve Toksik Seviyeler (Mah *et al.* 2019)

Sorumlu otorite	Gıda	Biyojen amin için limit değer	Biyojen amin
Bağımsız araştırmacı	Tüm gıdalar	Toksisite Eşiği: 100-800 mg/kg	**Tiramin**
Avrupa Ekonomik Komisyonu	Taze balık	Maksimum izin verilen seviye: 200 mg/kg	**Histamin**
Bağımsız araştırmacı	Balık	Tüketim için güvenli seviye: <50 mg/kg; olası toksik seviye: 50-200 mg/kg; muhtemel toksik seviye: 200-1000 mg/kg; toksik seviye: >1000 mg/kg	**Histamin**
Avrupa Komisyonu	Balık	Düzenleyici sınır: 100 mg/kg	**Histamin**
***ABD**	Balık ve balıkçılık ürünleri	Toksik seviye: 500 mg/kg	**Histamin**
***FAO/ WHO (Kommitesi)**	Balık ve balıkçılık ürünleri	Kalite ve hijyen indikatörü olarak: 200 mg/kg	**Histamin**
FAO/WHO	Balık ve balıkçılık ürünleri	Maksimum izin verilen seviye: 200 mg/kg	**Histamin**
Avustralya ve Yeni Zelanda	Balık ve balıkçılık ürünleri	Maksimum izin verilen seviye: 200 mg/kg	**Histamin**

BA'lar toksik olduğundan konsantrasyonlarını ölçmek için çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir. Son yıllarda biyojenik aminlerin tespiti için HPLC, TLC, GC, iyon değişim kromatografisi (IEC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi birçok analitik yöntem kullanılmaktadır (Zhang *et al.* 2019; Michalski *et a.l* 2021). BA'ları ölçmek için analitik yöntem seçerken, belirli faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Analit konsantrasyon aralığı, numune hacmi ve analit matrisinin fizikokimyasal, özellikleri bu faktörlerden bazılarıdır.

HPLC tabanlı yaklaşımların şu anda BA'ları tespit etmek için en hassas ve güvenilir yöntemler olduğu düşünülmektedir (Stojanović & Kos, 2020). Kromatografik yöntemlerle optimum analiz sağlamak için ekstraksiyon, saflaştırma ve türevlendirme prosedürleri uygulanmalıdır (Mohedano *et al*. 2015). BA'ların kromatografik yöntemlerle tespiti, kolon öncesi veya sonrası türevlendirmeyi ve karşılık gelen türevlerin floresan veya UV (ultraviyole) ışıkla tespit edilmesini gerektirir (Mohedano *et al*. 2015). Gıdadaki BA'ları tespit etmek için kullanılan reaktifler arasında dansil klorür (Dansil-Cl), dabsil klorür, o-ftaldialdehit (OPA), 6-aminokinolil-N-hidroksisüksinimidil karbamat (AQC), 4-kloro-3,5-dinitrobenzotriflorür (CNBF) ve benzoil klorür kullanılmaktadır (Restuccia *et a.* 2018; Han *et al.* 2022). Dansil-Cl, kolon öncesi türevlendirme için en yaygın kullanılan reaktiftir. OPA genellikle kolon sonrası türevlendirme için kullanılmaktadır (Pernica *et al* 2015).

MATERYAL VE METOD

Materyal

Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Cihaz	**Marka**
Buzdolabı (+4/-20 °C)	Vestel
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng
Çeker Ocak	Fume Hood Mikrotest
Dondurucu (-86 °C)	Glacier Ultralow Freezer
Etüv	Redline by-Bınder
Hassas Terazi	Ohaus Pioneer
İnkübatör	Thermo Scientific Heratherm
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Mikropipet Takımı	Thermo Scientific ve Eppendorf
Otoklav	Hmc Hiramaya
pH metre	Mettler Toledo FiveEasy Plus
Saf Su Cihazı	Mp Minipure
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Mikro 220R
Spektrofotometre	Beckman Coulter DU 730
Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
Su Banyosu	Memmert
Jel Görüntüleme sistemi	Vılber Lourmat-Quantum
Mikro dalga Fırın	Beko
Vortex	Fisons WhirliMixer

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Tablo 6. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Üretici Firmaları

Kimyasal	**Üretici Firma**
Agaroz (DNase-RNase-Protease free)	Sigma
Kalsiyum Klorür ($CaCI_2$)	Sigma
Magnezyum Klorür ($MgCI_2$)	Sigma
Mineral Yağı	Biomerieux
Sodyum Klorür (NaCI)	Sigma
Xgal	Sigma
$ZNSO_4$	Sigma
$CoCl_2$	Sigma
$MgSO_4$	Sigma
$NiCl_2$	Sigma
Histamin (Cas no:51-45-6)	Merck
Tiramin (Cas no:51-67-2)	Merck
Kadaverin (Cas no:462-94-2)	Merck
Putresin (Cas no:110-60-1)	Merck
API 20E (API kiti)	Biomerieux
dNTP	Thermo
Etidyum Bromür	Sigma
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)	Sigma
Gliserol	Sigma
Etanol	İso-Lab Chemicals
Metanol	İso-Lab Chemicals
İzopropanol	İso-Lab Chemicals
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Hidrojen klorür (HCl)	Sigma
Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)	Sigma
ABTS (2,2-azinobis3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit)	Sigma
Sodyum asetat	Sigma
n-Heptan	Sigma
Kloroform	Sigma
Amfisilin	Sigma
Metanol	Carlo Erba Reagents
Agaroz	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Tryptone Soya Agar	Oxoid
Tryptone Soya Broth	Oxoid

Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

%0,9'luk NaCI: 0,9 g NaCl tartılıp, 100 mL saf suda çözdürüldü.

%70'lik EtOH: 70 mL EtOH, 30 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0,2 M HCL: 165 µl HCL alınıp, üzerine 9835 mikrolitre su eklenerek 10 mL'ye tamamlandı.

1X TAE Tamponu: 100 mL 10X TAE alınıp hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

50 mM EDTA: EDTA'dan 1,46 g tartılarak 100 mL suda çözüldü ve pH'sı 8'e tamamlandı.

5M NaOH çözeltisi: 2 g NaOH tartılarak, 8 mL distile suda çözdürüldü.

ABTS: 0,022 g ABTS tartıldı, 10 mL suda çözdürüldü.

Amfisilin Solüsyonu: 20 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı. Çözelti - 20 °C'de saklandı.

$CaCl_2$ Solüsyon: 1,11 g $CaCl_2$, 100 mM'lık 100 ml saf su içerisinde çözülerek otoklavlandı ve soğutucu ayarı +4 °C'ye ayarlanarak saklandı.

IPTG Solüsyon: 23,8 mg/ml'lik miktarda distile su ile hazırlanan çözelti steril edilerek -20 °C'de saklandı.

N-bütanol/kloroform: Son konsantrasyon 5 mL olacak şekilde 2,5 mL'şer n-bütanol/kloroform karıştırılmıştır.

Sodyum asetat: 2,72 g sodyum asetat tartılıp, 100 mL suda çözdürülüp, pH'sı 5'e ayarlandı.

X-Gal Solüsyonu: 40 mg/ml olacak miktarda hazırlanarak, 20 °C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

LB Agar: 25 g LB Agar tartma işlemi sonrası 1000 mL'lik saf su içerisinde çözdürülerek otoklavlanma işleminden geçirildi.

LB Broth: 20 g LB Broth tartma işlemi sonrası 1000 mL'lik saf su içerisinde çözdürülerek otoklavlanma işleminden geçirildi.

MRS Agar: 66 g MRS agar tartma işlemi sonrası 1000 mL'lik saf su içerisinde çözdürülerek otoklavlanma işleminden geçirildi.

MRS Broth: 50 g MRS Broth tartma işlemi sonrası 1000 mL'lik saf su içerisinde çözdürülerek otoklavlanma işleminden geçirildi.

Tryptone Soya Agar (TSA): 40 g besiyeri 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek, 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavlandı ve steril petrilere döküldü.

Tryptone Soya Broth (TSB): 30 g besiyeri 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek 121 °C sıcaklıkta 1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile otoklavlandı.

Metot

Örnek Toplanması

Bu çalışmada kullanılan peynir örnekleri, Erzurum ili ve ilçelerinden toplanarak aseptik koşullarda laboratuvar ortamına getirilmiş ve örnekler, çalışmanın sonuna kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Adıgüzel, 2008).

Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Farklı bölgelerden alınan peynirlerden, laktik asit bakteri (LAB) izolasyonu yapılabilmesi için aseptik koşullarda 25 g numune alınmış olup, 225 mL %0,9'luk NaCl çözeltisi ile muamele edilmiştir. Ardından homojenattan gerekli seyreltmeler yapılmış ve LAB'nin izole edilmesi ve tanılanması için kullanılmıştır. LAB'nin izolasyonu için, MRS ve M17 agarda gerekli dilüsyonlarından yayma ekimi yapılarak 35 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Hücre ve koloni morfolojisi açısından farklılık gösterdiği görülen izolatlar, inkübasyon sonucunda gelişen tipik olarak farklı görünen kolonilerden seçilmiş ve MRS ile M17 agara çizgi ekimi yapılmış olup 35 derecede inkübe edilmiştir (Harrigan, 1976). Saflaştırılmış bu kolonilerin saklanması için 2-3 öze dolusu mikroorganizma, gliserol (%30) ve nutrient broth karışımına ilave edilip vortekslenmiştir. Hazırlanan stok kültürler kullanılıncaya kadar (-86 °C)'de saklanmıştır (Sanchez *et al*. 2000; Adıgüzel, 2008)**.**

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik Karakterizasyonu

İzolasyon aşamasında elde edilen izolatların LAB olup olmadığını belirlemek amacıyla, bu izolatlar çeşitli konvensiyonel testlere tabi tutulmuştur. Bu amaçla tüm izolatların petri görüntüleri incelenmiş olup; tipik görünüme sahip koloniler, LAB olabilme ihtimali yüksek izolatlar olarak seçilmiş ve bu kapsamda seçilen izolatlarında Gram özelliklerine, endospor varlıklarına, oksidaz ve katalaz enzim varlıklarına bakılmıştır**.**

Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

İzolatların morfolojik özelliklerinin belirlenebilmesi için kültürden De Man Rogosa Sharpe besiyerine bakterilerin çizgi ekimi gerçekleştirilmiş ve 35 derecede 24 saat anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Ardından petri kapları inkübatörden çıkarılarak ilk olarak; koloni morfolojileri belirlenip, ardından hücre morfolojisi (kokoid, çomak, virgül, spiral, pleomorfik, vs.) tespit edilmiştir.

Gram Boyama

İzolatların Gram özellikleri, iki farklı yöntemle belirlenenebilmektedir.

Bu yöntemlerden ilkinde, bakteri kültürü, steril bir öze ile alınarak bir lam üzerine yayılır ve 1 dakika boyunca kristal viyole ile muamele edilir. Kristal viyole ile muamele sırasında Gram (+) ve Gram (-) bakteriler mor renk alırlar. Sonrasında distile su ile preparattaki fazla boya uzaklaştırılarak, preparatı fikse etmek amacıyla, lugol eklenip 1 dakika boyunca inkübe edilir. Preparat daha sonra %96'lık etanol ile yıkanır. Yıkama sonrasında Gram (+) özelliğe sahip bakteriler kalın peptidoglikan tabakasından dolayı kristal viyole-Lugol kompleksini terk etmez ve mor rengini korurken, Gram (-) özelliğe sahip bakterilerin dış zarı ince peptidoglikan tabakasından dolayı bozulur, renk değişikliği olur ve boyaları tutamaz. Yıkama işleminden sonra saf su ile yıkanan preparat, safranin ile 20 saniye muamele edilir. Bu işlemin ardından yıkama işlemine tabi tutulan preparat kurutulup, immersiyon objektifinde incelenir. Mikroskopta görülen hücreler içerisinde mor renkler Gram pozitif, pembe-kırmızı renkler ise Gram negatif değerlendirimektedir (Adıgüzel, 2008).

KOH testi, ise Gram boyamanın tespiti için ikinci yöntemidir. Bakteriler %3'lük KOH ile etkileşime sokulur. Gram negatif bakterilerin duvarları ince olduğundan çekirdek ve sitoplazma bu sırada dışarı çıkar sümüksü bir yapı gözlenir. Ancak %3'lük KOH hücre yapılarını bozamadığı için Gram pozitif bakterilerde böyle bir oluşum gözlenmez. KOH testini gerçekleştirmek için MRS'de büyütülen 1-2 günlük kültürlerden bir öze bakteri örneği alınarak, KOH solüsyonu ile 5 ve 8 saniye arasında muamele edilerek öze preparat üstüne hareket ettirilip, Gram pozitif bakterilerin herhangi birinde uzama oluşmadığı gözlenirken, Gram negatif bakterilerde ise uzayan bir yapı ortaya çıktığı gözlenmiştir (Baltaci, 2016).

Endospor Boyama Deneyi

Geleneksel tanılama yöntemlerinden biri olan endospor boyama testi, endosporların varlığını test etmek için kullanılmaktadır. LAB stok besiyeri ortamından MRS ortamına aktarılmış ve 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Sonrasında petriler inkübatörden çıkarılarak çeşitli stres koşulları altına bekletilmiş, ardından saf kültürleden preparatlar

hazırlanıp sıcak su banyosuna yerleştirilmiştir. Daha sonrasından preparatların üzeri tamamen malaşit yeşili ile kaplanarak üzerine kurutma kağıdı yerleştirilip malaşit yeşili ile 5-7 dakika sürekli nemlendirilmiştir. Süre sonunda lam üzerindeki kurutma kağıdı alınarak fazla boyayı uzaklaştırmak için su ile yıkanıp, sonrasında preparata ortamında karşıt bir boya olan safranin eklenip, 20-30 saniye örnekler muamele edilmiştir. Preparat tekrar su ile yıkanıp ve kurutularak endospor oluşturup oluşturmadığı immersiyon objektifinde ile tespit edilmiştir (Arslan, 2017).

Hareketlilik testi

Bu deney için test izolatları, MRS + %0,6'lık agardan oluşan tüplere öze ile ekildi ve 1-2 gün inkübasyonu gerçekleştirildi. Tüplerdeki ekim çizgisine göre gelişim gözlemlenerek hareketlilik durumu incelendi (Arda, 2000; Temiz, 2000).

Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Katalaz testi

Bu deney için, canlandırılan suşlardan 1 öze dolusu alınarak, %5'lik H_2O_2 damlatılan lam üzerine yerleştirilir ve karıştırılır. Ardından hava kabarcığı gözlenen bakteriler katalaz enzimi yönünden pozitif, oluşmayanlar bakteriler ise, katalaz enzimi yönünden (-) kabul edilmiştir (Arslan, 2017).

Oksidaz testi

Bakterilerdeki elektron taşınmasında ciddi bir role sahip olan sitokrom c proteinini, taşıyıp taşımadığı oksidaz testi ile kontrol edilmektedir. Sitokrom c proteini, mitokondride bulunan ve solunumla ilgili bir transmembran proteinidir. Oksidaz testi için %1'lik tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür içeren kullanıma hazır 49 kit kullanılmıştır. Bunun için kite dahil olan diskin üzerine su damlatılarak diskin yüzeyine bir miktar bakteri alınmıştır. Oksidaz (+) bakterilerde mavi ve mor renk oluşumu gözlenirken, negatif bakterilerde herhangi bir renk oluşumu gözlenmemiştir (Arslan, 2017).

İzolatların Biyojen Amin İçeriklerinin Belirlenmesi

Dekarboksilaz Aktivitesi

Moleküler yöntemler, gıda üretiminin erken aşamalarında bakterilerin sahip olduğu dekarboksilaz enziminin spesifik, hızlı ve güvenilir olarak tespit edilebilmesi için araçlar sağlamaktadır. Bu doğrultuda moleküler bir yaklaşımla, gıdalardaki biyojen amin (BA) birikiminin önlenmesi için erken risk değerlendirmesi yapılabilmekte ve kontrol önlemleri

alınabilmektedir (Moreno-Arribas *et al.* 2022). Bu doğrultuda dekarboksilasyon enzimi yönünden, izolatların dekarboksilaz enzimini barındırıp barındırmadıklarını tespit etmek için, ilk aşamada API 20E test kiti ile, lizin dekarboksilaz (LDC) ve ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimleri incelenmiştir. Bu amaçla API 20E Sistem tercih edilmiştir. Bu test kiti için, elde edilen saf LAB, ilk olarak üç faz ekim ile MRS ve M17 agar üzerinde inoküle edilmiştir. Petriler, 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitiminde, koloniler önce steril bir öze ile toplanarak ve steril su içinde süspanse edilmiştir. Süspanse hale getirilen hücreler daha sonra McFarland 0,5 yoğunluğuna göre ayarlanmuş olup gerekli bakteri miktarı belirlendi, bakteri süspansiyonu bu oranda API 20E ortamına aktarıldı. Ortamda bakteri süspansiyonunun homojen dağılımı sağlandı. Steril bir pastör pipeti kullanılarak şerit üzerindeki 20 mikrotüp elde edilen homojenattan belirtilen miktarlarda inoküle edilmiş ve mikrotüpün üzeri 3-4 damla mineral yağı ile kaplanmıştır. Tamamen inoküle edilmiş API 20E şeritleri, 37 °C'de etüv koşullarında 18-24 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası APILAB Plus Ver. 3.3 (BioMérieux Diagnostik A, İstanbul) yardımıyla elde edilen veriler değerlendirilmiştir (BioMérieux).

MCO (Multikopper oksidaz) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Guaiacol, 2,2'-Azinobis3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit tuzu (ABTS), 2,6-dimetoksifenol (DMP) gibi bazı maddeler uzun süredir multikopper oksidaz'lar (MCO) için model substratlar olarak tanımlanmıştır. Bu doğrultuda tez çalışmamızda; API test kiti kullanılarak, dekarboksilasyon enzimi yönünden negatif sonuç veren izolatların MCO enzim aktivitesine sahip olup olmadığına bakılmıştır. Bu işlem için, MCO enzim aktivitesi belirlenmesi amacıyla stoktan alınarak katı besiyerinde canlandırılan hücreler MRS ön kültürüne alınmıştır. İnkübasyon sonunda 1 mL ön kültür 100 mL optimal besiyeri içeren fermentasyon ortamına inoküle edilerek sırasıyla 24, 48, 72 ve 96 saat süreleri boyunca 37 °C'de sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. MCO enzim aktivite ölçümü için, substrat olarak 4 mM 100 µl ABTS, 200 Mm (pH 5) Sodyum-Asetat tomponu ve enzim kaynağı olarak 5 mL kültür süpernatantı kullanılmıştır (Wang *et al.* 2022). 37 °C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 420 nm dalga boyunda spektrofotometre'de absorbans ölçülmüştür (Taşpınar & Kolankaya, 1998). Enzim aktiviteleri kaydedilerek elde edilen veriler sonucunda en yüksek MCO aktivitesine sahip izolat tez çalışmamızda kullanılmıştır.

Seçilen İzolatlatın Moleküler Yöntemlerle Tanısının Yapılması

Genomik DNA İzolasyonu

Saf olarak elde edilen izolat MRS ve M17 agara çizgi ekim ile inoküle edildi ve 35 °C

sıcaklıkta 24-48 saat inkübe edildi. Gelişim gösteren izolattan bir öze dolusu alınarak Man Rogosa Sharpe besiyerine besiyerine inoküle edildi. Ardından 1-2 gün 35 °C' de ikinci bir inkübasyon süreci sonrasında, DNA izolasyon aşamasına geçildi. Promega wizardR genomic DNA purification kit (A2360) protokolü ile izolasyon yapıldı.

İzolasyon Aşamaları

MRS Broth besiyeri içerisinde gelişim gösteren hücreler, tüplere alınarak santrifüj ile çöktürüldü. Santrifüj işlemi sonucunda ependorfun dibinde biriken hücreler 480 µl, pH'ı 8 olan 50 mM EDTA içinde çözdürülmüştür. Akabinde içine 120 µl ve 10 mg/ml lizozim enzimi eklenerek karıştırma işlemi gerçekleştirildi. 37 derece sıcaklıkta 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

- Daha sonra oluşan karışım 13000 devir/dk'da 120 sn santrifüj yapılarak süpernatant çıkarıldı. Sonrasında 600 µl Nüklei Lizis Solüsyonuda eklenerek, dikkatli bir şekilde pipetajlama işlemi gerçekleştirildi.
- Oluşan karışım 80 °C sıcaklıkta 5 dk inkübasyona tabi tutulup, soğutulmuştur. Üstüne 3 µl RNaseA eklenerek, birkaç kez karıştırılarak 37 °C'de yarım saat inkübe edildi.
- Etüvden çıkarılan karışımın oda sıcaklığı ortalamasına gelene kadar bekletilip üstüne 200 µl Protein Presipitasyon Solüsyonu eklenmesi sonrası dakikanın 3'te 1'i kadar vortexleme işlemi gerçekleştirildi.
- Elde edilen karışım 5 dk buzda bekletildikten sonra 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi ve süpernatant, içerisinde, 600 µl, izopropanol bulunan yeni tüplere aktarıldı. Ependorflarda pellet görülünceye kadar alt üst edildi.
- Pellet oluşumu olan tüpler 13000 rpm'de 2 dk santrifüjlenip, süpernatantları dökülerek ve kurutma kağıdı yardımıyla iyice kurutulmuştur.
- Tüplere 600 µl %70'lik EtOH eklendikten sonra aşağı yukarı karıştırıldı ve 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonunda süpernatant atıldı ve EtOH'un uzaklaşması için 15 dk 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- Son olarak, tüplere 100 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenerek, 65 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süreç bitiminde DNA'mızı taşıyan tüp daha sonra kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi (Adıgüzel, 2008).

16S rRNA PCR İşlemi

16S rRNA bölgesi bakterilerde çok korunaklı bir bölge olduğu için, 16S rRNA bölgesi, dizi analiz karakterizasyonu çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. İzolata ait 16S rRNA gen bölgesi, laboratuvar şartlarında evrensel primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Bu doğrultuda 30 µl reaksiyon ortamında hazırlanmıştır. Reaksiyon tüpü içine, 1,8 µl $MgCl_2$, 17,1 µl ddH2O, 0,6 µl dNTPs, 3 µl 10X PCR tamponu, 1,2 µl DMSO, 3 µl (5 µM) evrensel primer olan 27F (ileri 5`-AGA GTT) TGA TCC TGG CTC AG 3'), (5 µM) primer 1492R (geri 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') ve 0.3 µl Taq DNA polimeraz son olarak da izole edilmiş DNA eklenmiştir.

PCR Döngüsü: Reaksiyon tüplerimizi PCR cihazına uygun şekilde koyarak; ön denatürasyon işlemi için 94 °C'de 120 sn ve 36 tekrar edilerek; denatürasyon işleminde 94 °C sıcaklıkta 60 sn, bağlanma işleminde 52 °C sıcaklıkta 60 sn ve uzama işleminde 72 °C sıcaklıkta ve 120 sn olacak şekilde ayarlamalar yapıldı. 36 tekrarın sonuncunda ise son uzama işlemi 72 °C sıcaklıkta 300 sn olacak şekilde programalar yapılarak, 16S rRNA gen bölgesi çoğaltılması sağlanmıştır (Adıgüzel, 2008).

16S rRNA PCR Elektroforez İşlemi

PCR işlemi ile çoğalan gen bölgesini doğrulamak için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bu amaçla 0,8 g agaroz tartılıp, 80 mL 1X TAE ile karıştırıldı ve tamamen eriyene kadar mikrodalgada bırakıldı. Ardından mikrodalgadan çıkarılan agaroz ve TAE karışımı bir süre soğumaya bırakıldı el yakmayacak kıvama geldiği zaman jel ünitesinin camı aşağı indirilerek 3,5 µl etidyum bromür (EtBr) eklendi, EtBr eklenen karışım hafifçe karıştırılarak, içinde tarağın takılı olduğu elektroforez küvetine yavaşça döküldü. Jel dondurulduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jelde 1X TAE içeren bir elektroforez kabına yerleştirildi. Ardından ilk kuyucuğa 4 µl markır yüklendi ve diğer kuyucuklara 6X boyası ve PCR ürünü karışımından oluşan numune yüklendi. Elektroforez jel sisteminin pozitif (+) ve negatif (-) kutup noktaları dikkatli bir şekilde uygun bölmelere takıldıktan sonra numuneler 90 V 50 dk süreyle yürümeye bırakıldı. DNA bantları bir jel görüntüleme sistemi ile görselleştirilip ve bilgisayarda analiz edilmiştir (Baltacı, 2016).

Kompetent Hücrelerin Hazırlanma İşlemi

Bu amaçla; ilk klonlama basamağı olan kompetant hücrelerin hazırlanmasına başlandı. Bunun için *E. coli* suşu JM101, LB agara ekildi ve gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda petri kabından öze ucu ile bir koloni toplandı, LB brot ortamına enjekte edilmiş ve ön kültüre alınmıştır. Daha sonra bu kültürden 1 mL alınarak LB besiyerine

inoküle edildi ve OD_{600} değeri periyodik olarak kontrol edilerek bu değerin 0,4 - 0,6 değerleri arasında kalması sağlandı (Baltacı, 2016). Bu hücreler ardından satrifüj edilip, $CaCl_2$ ile birleştirildi.

Ligasyon İşlemi

PCR ile birlikte çoğaltılan 16S rRNA gen bölgeleri pGEM®-T Easy (Promega) vektörüne aktarımı sağlandı. Bu sebeple, 5 µl ve 2X Ligasyon buffer 3 µl, Polimer Zincir Reaksiyonu ürünü ile 1 µl vektör, 1 µl T4 DNA ligaz aynı ortamda karıştırılarak elde edilen karışım 16 °C'de 16 saat inkübe edildi (Baltacı, 2016).

Transformasyon İşlemi

Mevcut çalışmamızda, transformasyon işlemini gerçekleştirmek için ısı şok yöntemi kullanılmıştır. Kompetant hücreler ligasyon ürünleri ile bir araya getirilmiştir. Isı şoku için, önce yarım saat buz üstünde tutularak, ardından 42 °C'ye ayarlanmış olan su küvetinde 120 saniye tutularak uygulanmıştır. Isı şok sonucunda bakteri hücre duvarı yapısındaki gözenekler açılarak ligasyon ürününün bakteri hücresine nüfuz etmesine izin verilmiştir. Isı şokundan sonra organizmalar, 2 saat boyunca LB broth içinde büyütülüp, bakteriler daha sonra X-gal, IPTG ve ampisilin içeren LB agar plakalarına ekilip 37 °C'de 12-14 saat inkübe edilmiştir (Baltacı, 2016).

Koloni Seçimi ve Sıvı Kültür İşlemleri

İnkübasyonun süresi sonucunda, petriler kapları inkübatör cihazından çıkarıldı ve mavi renkli kolonilerin oluşumunun belirlenmesi için gece boyunca +4 °C sıcaklıkta tutuldu. 16S rRNA geninin girmediği kolonilerde mavi rengin, 16S rRNA geninin girdiği kolonilerde ise beyaz rengin oluşumu beklendi. (Baltacı, 2016)

Koloni PCR İşlemi

Seçilen beyaz kolonileri pozitif olarak kabul etmek hatalı bir sonuç doğuracağından, doğrulama işlemi için koloni PCR yapılmıştır. Bu amaçla kürdan yardımıyla pozitif kabul edilen beyaz koloniler tespit edilerek aşağıda gösterilen reaksiyona aktarılmıştır.

19,1 µl dH_2O, 0,6 µl dNTP karışımı, 3 µl tampon ($MgCl_2$ ile), 1,8 µl $MgCl_2$ (25 mM), 2 µl 5 µM T7 (5`-AATACGACTCACTATAG–3`) primer, 2 µl 5 µM SP6 (5`–ATTTAGGTGACACTATAG –3`) primer, 1,2 µl DMSO, 0,3 µl Taq DNA polimeraz ve kalıp DNA olarak kullanılan beyaz renkli koloni topluluğu reaksiyon ortamına eklenmiştir.

Polimeraz Zincir Reksiyon Programı: Denatürasyon için: 94 °C sıcaklıkta 120 sn,

amplifikasyon: 94 °C sıcaklıkta 30 sn, 55 °C sıcaklıkta 30 sn, 72 °C sıcaklıkta 120 sn 35 tekrar şeklinde ayarlanıp PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. İstenen geni taşıyan koloniler, EtBr ile desteklenmiş %1'lik agaroz jele, PCR işlemi sonundaki örnekler yüklenerek görüntüleme cihazı ile analizi gerçekleştirilmiş, seçilen beyaz kolonilerin istenilen geni taşıdığı teyit edildikten sonra, plazmit izolasyonu için ampisilin içeren LB sıvı besiyerine ekilmiştir (Baltacı, 2016).

Plazmit İzolasyonu, Kontrolü ve Konsantrasyonların Ölçme İşlemi

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Sistemi (Promega, A1330) kullanılarak Plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmit kontrolü için numuneler EcoRI ile kesildi ve bir agaroz jel içerisinde yürütülerek istenilen bant profili plazmitlerinin konsantrasyonunu >100 ng/µl olarak ayarlamak için Nanodrop cihazı (Thermo Scientific, Multiskan GO, ABD) kullanıldı ve dizi analizi için tüplerden 30 – 50 µl numuneler alnıp sekans analizlerinin sonuçlarını öğrenmek için Macrogen firmasına gönderildi.

DNA Dizi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Şirketin web sitesinden elde edilen sıralama sonuçları BioEdit adlı program yardımı ile analiz edildi ve FASTA formatına dönüştürüldü. Diziler daha sonra yaklaşık 1500 bç'lik bir dizi elde etmek için ortak bölgeden cakıştırıldı. Ardından anlamlı sekans verileri http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify adresi kullanılarak, izolatımızın tanımlanması amaçlanmıştır.

Seçilen İzolatın Multicopper Oksidaz MCO Geninin Spesifik PCR ile Belirlenmesi

LAB suşlarında BA bozunmasından sorumlu bir enzim olan, MCO'yu kodlayan geni tespit etmek için spesifik PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. İzolatların BA içeriğinin belirlenmesi için yapılan API test kiti deneyi sonucunda, dekarboksilaz enzimi açısından negatif olarak belirlenen izolatların MCO enzim aktivitesini belirlemek için yapılan deney sonucunda, en yüksek aktiviteye sahip 1 izolatın MCO enzim geni spesifik PCR ile belirlenmiştir. Bu amaçla tanılanan izolata spesifik primerler belirlenip alınmış, belirlenen gene spesifik PCR protokolü literatür taraması sonucunda belirlenmiş ve PCR koşulları optimize edilmiştir (Lee *et al.* 2021).

MCO Enzim Optimizasyonu

En yüksek enzim aktivitesine sahip izolat üzerinden tez çalışmalarına devam edilerek, MCO enzim üretim potansiyelini arttırmak için kültür koşullarının optimizayonu gerçekleştirilmiştir. Guaiacol, ABTS ve DMP gibi bazı maddeler uzun süredir MCO'lar için model substratlar olarak tanımlanmıştır. Bu amaçla, fermentasyon süresi, sıcaklık, pH, ağır metal gibi paramatrelerin optimizasyonu yapılmıştır.

MCO Enziminin Optimal Fermantasyon Süresinin Belirlenmesi

MCO enzim optimizasyonu için fermantasyon süresinin belirlenmesi amacıyla, stoktan alınarak katı besiyerinde canlandırılan hücreler, MRS besiyerinde ön kültürüne alınmıştır. İnkübasyon sonunda 1 mL ön kültür 100 mL optimal besiyeri içeren fermentasyon ortamına inoküle edilerek sırasıyla 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca 37 °C'de sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. MCO enzim aktivitesi ölçümü substrat olarak 4 mM 100 mikrolitre ABTS, 200 Mm (pH 5) Sodyum-Asetat tomponu ve enzim kaynağı olarak 5 mL kültür süpernatantı kullanılmıştır (Wang *et al.* 2022). 37 °C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 420 nm dalga boyunda spektrofotometre'de absorbans ölçülmüş (Taşpınar & Kolankaya, 1998). Enzim aktiviteleri kaydedilerek, bulunan verilere göre MCO aktivitesinin en yüksek olduğu fermantasyon süresi belirlenip, diğer basamaklarda kullanılmıştır.

MCO Enziminin Optimal pH Değerinin Belirlenmesi

MCO enzim aktivitesi için optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla hücreler stoktan alınarak MRS besiyerinde canlandırılmış, ardından MRS ön kültürüne alınmıştır. Ardından 1 mL ön kültür sırasıyla 5 ile 9 arasındaki pH verilerine sahip 100 mL optimal besiyeri içeren besiyeri ortamına inoküle edilerek, en yüksek fermantasyon süresi olarak belirlenen 24 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. MCO enzim aktivitesi ölçümü için substrat olarak 4 mM 100 mikrolitre ABTS, 200 Mm (pH 5) Sodyum-Asetat tomponu ve enzim kaynağı olarak 5 mL kültür süpernatantı kullanılmıştır. 37 °C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 420 nm dalga boyunda spektrofotometre'de absorbans ölçülmüştür. Enzim aktiviteleri kaydedilerek MCO aktivitesindeki en yüksek pH verileri alınarak sonraki basamaklarda kullanılmıştır.

MCO Enziminin Optimal Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

MCO enzim aktivitesi için optimal sıcaklığın belirlenmesi amacıyla stok besiyerinden alınan hücreler MRS besiyerinde canlandırılmıştır. Canlandırılan hücreler MRS ön kültürüne alınarak 37 °C sıcaklıkta 1 gün inkübe edilmiştir. Ön kültürün 1 mL'si optimal olarak

belirlenen besiyeri (100 mL, pH 7, 24 saat) içeren erlenlere inoküle edilmiş ve erlenler sırasıyla 24, 30 ve 35 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörlerde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. MCO enzim aktivite ölçümü için substrat olarak 4 mM 100 mikrolitre ABTS, 200 mM (pH 5) Sodyum- Asetat tomponu ve enzim kaynağı olarak 5 mL kültür süpernatantı kullanılmıştır. 37 °C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 420 nm dalga boyunda spektrofotometre'de absorbans ölçülmüştür. Enzim aktiviteleri kaydedilerek kayıt altına alınan veriler içerisindeki en yüksek MCO enzim aktivitesine sahip sıcaklık değeri diğer basamaklarda kullanılmıştır.

MCO Enziminin Aktivitesi Arttıran Ağır Metalin Belirlenmesi

MCO enzim aktivitesini arttıran ağır metalin belirlenmesi amacıyla stok besiyerinden alınan hücreler MRS besiyerinde canlandırılmıştır. Canlandırılan hücreler MRS ön kültürüne alınarak 37 °C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından ön kültürün 1 mL'si optimal olarak belirlenen besiyeri (37 °C, pH 7, 24 saat) içeren erlenlere inoküle edilmiş ve erlenlere sırasıyla eser miktarlarda $ZnSO_4$, $CoCl_2$, $MgSO_4$ ve $NiCI_2$ metalleri eklenmiş ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde 24 saat süresince beklemeye bırakılmıştır (Li *et al*. 2020). MCO enzim aktivitesi ölçümü için substrat olarak 4 mM 100 mikrolitre ABTS, 200 mM (pH5) Sodyum-Asetat tomponu ve enzim kaynağı olarak 5 mL kültür süpernatantı kullanılmıştır. 37 °C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 420 nm dalga boyunda spektrofotometre'de absorbans ölçülmüştür. Enzim aktiviteleri kaydedilerek, kaydedilen veriler içerisindeki en yüksek ağır metal değeri diğer basamakta kullanılmıştır.

İzolatlatın Biyojen Amin Parçalama Miktarlarının (LC-MS) ile Belirlenmesi

Mevcut tez çalışmasının amacına uygun olarak; API test kiti sonucunda dekarboksilaz enzimi negatif olarak belirlenen izolatlar arasından, en yüksek MCO enzim aktivitesine sahip 1 izolatın moleküler tanılaması yapılmış olup ardından, MCO enzim genine sahip olduğu spesifik PCR ile tespit edilmiştir. Ardından literatür taraması sonuçlarına göre, en toksik dört BA (histamin, putresin, kadaverin, tiramin) belirlenip, besiyeri ortamına eklenmiştir. İzolatın üretemediği dört BA'nın (histamin, tiramin, kadaverin ve putresin) besiyeri ortamına eklenmesiyle MCO enziminin BA'ları parçalama miktarını ve yeteneğini belirlemek amacıyla LC-MS analizi gerçekleştirilmiştir (Lee *et al*. 2021).

Örneklerin Ekstraksiyonu ve Türevlendirilmesi

Tez çalışmasında, erlenlerden 1'i pozitif kontrol olmak şartıyla 2 besiyeri hazırlanmış olup pozitif kontrole yapılan deneyler sonucu seçilen izolat eklenmeyip onun haricindeki şartlar (37 °C, pH7, $ZnSO_4$) eşit hale getirilmiştir (Lee *et al.* 2021). Ardından stok

besiyerinden alınan hücreler MRS besiyerinde canlandırılmıştır. Canlandırılan hücreler MRS ön kültürüne alınarak 37 °C sıcaklıkta 1 gün inkübe edilmiştir. Ön kültürün 1 mL'si optimal olarak belirlenen (37 °C, pH 7, $ZnSO_4$) besiyeri dört BA'yı (histamin, tiramin, kadaverin ve putresin) içeren erlene inoküle edilmiş ve 37 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 24, 48, 72 ve 96 saatleri boyunca boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından örnekler 5500 rpm' de 5 dk boyunca santifüj edilmiş ve hücreler uzaklaştırılmıştır. Daha sonrasıda süpernatantdan 1 mL alınarak 50 mL'lik falkonlara aktarılmıştır. Sonrasında örneklerin üzerine 4 g NaCl ve 1 mL (%50) NaOH eklenerek kuvvetlice çalkalanmıştır. Ardından 3000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj işlemi tabi tutulmuş, süpernatant kısmı alınmıştır. Süpernatantın üzerine 5mL n-bütanol/kloroform (1:1) eklenmiştir. Karışım 2 dk boyunca kuvvetlice çalkalanarak sonrasında tekrar 3000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir, süpernatant alınıp ayırma hunisine aktarılmıştır. Üzerine 5 mL heptan eklenerek 3'er kez 1 mL 0,2 M HCL eklenmiş ve faz oluşumu gözlenmiştir. Faz oluşumu gözlendikten sonra alt fazı tüpelere alınarak 95 °C'de kurumaya bırakılmıştır (AboEl-Makarem *et al.* 2016). Ardından kuruyan örnekler, LC-MS analizi yapılabilmesi için, Atatürk Üniversitesi yerleşkesinde bulunan Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'a gönderilmiş ve LC-MS analizi DAYTAM tarafından gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. Örnek: Seçilen izolatın eklendiği besiyeri; Kontrol: Seçilen izolatın eklenmediği besiyeri

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bakteri İzolasyonu

Örneklerin Toplanması

Tez çalışmasında kullanılan 21 adet peynir örneği Erzurum ili ve çevre ilçelerinden temin edilmiştir.

Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Erzurum ili ve ilçelerinden toplanan 21 adet peynir örneğinden, uygun prosedürler kullanılarak, bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda toplamda 76 adet izolat elde edilmiş ve kullanılıncaya kadar -86 °C'de muhafaza edilmiştir.

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik Karakterizasyonunun Belirlenmesi

Peynir örneklerinden izole edilen 76 adet izolatın sonraki çalışmalarda kullanılabilecek potansiyel laktik asit bakterisi (LAB) olup olmadığı, fenotipik analizlerle ortaya konuldu. Bu amaçla ilk olarak koloni morfolojisine bakılarak tipik LAB seçildi. Daha sonra bu izolatların LAB olma ihtimallerini pekiştirmek amacıyla; Gram, endospor boyama, oksidaz, katalaz ve hareketlilik testi yapıldı. Uygulanan bu testler neticesinde; 76 izolattan yalnızca 12 tanesinin (EM2, EM3, EM4, EM5, EM6, EM7, EM8, EM9, EM10, EM11, EM12 ve EM13) LAB olma ihtimali yüksek olduğu gözlemlendi. Fenotipik karakterizasyon sonuçları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. İzolatların Fenotipik Karakterizasyon Sonuçları

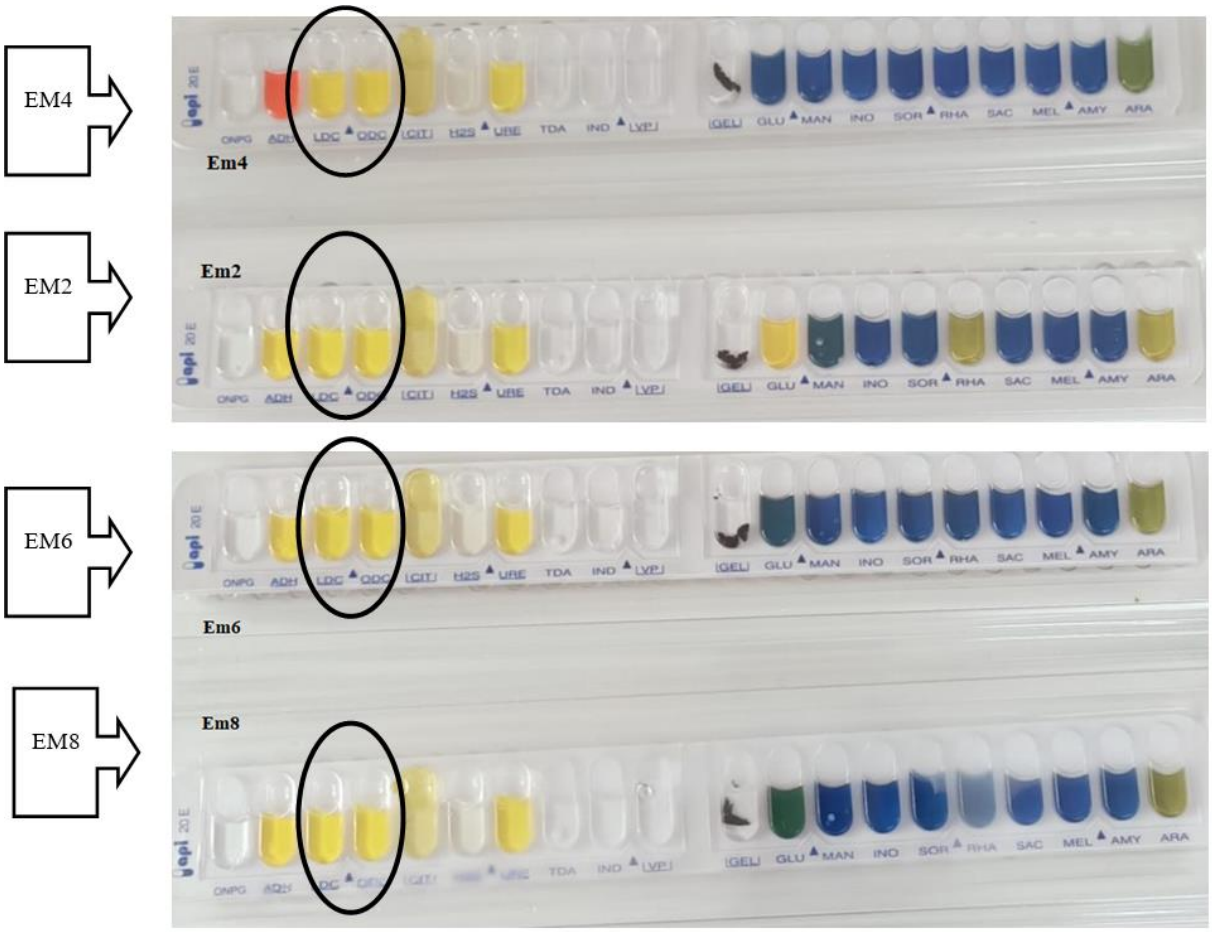
İzolat Kodu	Morfoloji	Gram	Endospor	Oksidaz	Katalaz	Hareketlilik
EM 2	Tipik görünümlü	+	-	-	-	+
EM 3	Tipik görünümlü	+	-	-	-	-
EM 4	Tipik görünümlü	+	-	-	-	-
EM 5	Tipik görünümlü	+	-	-	-	+
EM 6	Tipik görünümlü	+	-	-	-	-
EM 7	Tipik görünümlü	+	-	-	-	+
EM 8	Tipik görünümlü	+	-	-	-	-
EM 9	Tipik görünümlü	+	-	-	-	-
EM 10	Tipik görünümlü	+	-	-	-	-
EM 11	Tipik görünümlü	+	-	-	-	-
EM 12	Tipik görünümlü	+	+	-	-	-
EM 13	Tipik görünümlü	+	-	-	-	-

Dekarboksilaz Aktivitesi Sonuçları

Bakteriler tarafından biyojenik amin (BA) üretimini veya dekarboksilaz aktivitesini ölçen tahlillerde, pH göstergelerine dayalı diferansiyel ortamlar kullanılmaktadır (Bover-Cid & Holzapfe, 1999). Bu testlerde artan pH ile mor renk oluşması, pozitif olarak kabul edilmektedir. Bir çalışmada, şalgam fermantasyonundan izole edilen izolat 2C5'in, tirozin içeren ortamda tiramin üretmiş, ancak dekarboksilaz testlerinde negatif sonuç vermiştir. Buda, izolatın dekarboksilaz testinde yalancı negatif sonuç oluşturduğu ihtimalini akla getirmiştir. Araştırmacılar bu bilgiler ışığında; amin miktarlarının, özellikle asitli ortamda üretildikleri göz önüne alındığında, pH değişimini sağlamaya yetecek düzeyde olmadığı ve bu nedenle renk dönüşümünün gerçekleşmediği sonucuna varmışlardır (Garai *et al.* 2007). Moleküler yöntemler, gıda üretiminin erken aşamalarında bakteriyel dekarboksilaz enzimlerinin spesifik, hızlı ve güvenilir tespiti için araçlar sağlamaktadır. Bu doğrultuda erken risk değerlendirmesi yapılarak gıdalarda BA birikiminin önlenmesi için kontrol tedbirleri devreye sokulmaktadır (Moreno-Arribas *et al.* 2022). Bu amaçla; tez çalışmamızda dekarboksilasyon yönünden, izolatların dekarboksilaz enzimini barındırıp barındırmadıklarını tespit edebilmek için, ilk aşamada API test kiti ile; arjinin dekarboksilaz (ODC), lizin dekarboksilaz (LDC) enzimlerinin davranışları incelenmiştir. Bu yüzden, API 20E Sistem tercih edilmiştir. Sonuç olarak 12 izolattan 4'ünün dekarboksilaz enzimini barındırmadıklarını tablo 8'de verilen API okuma tablosu baz alınarak yapilmiş olup, test kiti üzerinde sarı renk oluşumu gözlendiği, 8'inin ise dekarboksilaz enzimi yönünden pozitif olduğu ve test kiti üzerinde kırmızı-turuncu renk oluşturduğu gözlenmiştir. pH indikasyonu baz alınarak; yapılan yapılan çalışmalardaki yalancı negatiflik durumları ve BA'ların her birinin tespiti için farklı besiyeri kullanımı gerekmesi durumu göz önünde bulundurulduğunda, tez çalışmamızda dekarboksilasyon yönünden, izolatların dekarboksilaz enzimini barındırıp barındırmadıklarını belirlemek için ilk aşamada API test kiti (BioMerieux) kullanılması çalışmamızı, literatürdeki çalışmaların bir adım önüne cıkarmaktadır. Değerlendirmeler sonucunda, fenotipik karakterizasyon basamağındaki LAB olma ihtimali yüksek olan 12 izolattan 4' ünün dekarboksilaz enzim varlığı yönünden negatif olduğu tespit edilerek tez çalışmasına; EM2, EM4, EM6, EM8 kodlu 4 izolat üzerinden devam edilmiştir.

Tablo 8. API 20E Okuma Tablosu

Testler	Aktif içerikler	Miktar (mg/küp.)	Reaksiyonlar/ Enzimler	Sonuçlar	
				Negatif	Pozitif
ONPG	2-nitrofenil-βD-galaktopiranozid	0.223	β-galaktosidaz (Ortho Nitrofenil-βD Galaktopiranosidaz	Renksiz	Sarı (1)
ADH	L-arjinin	1.9	Arjinin DiHidrolaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu (2)
LDC	L-lizin	1.9	Lizin Dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu (2)
ODC	L-ornithin	1.9	Ornithin Dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu (2)
CIT	Trisodium sitrat	0.756	CITrate (sitrat) kullanımı	Açık yeşil/Sarı	Mavi-yeşil/Mavi
H_2S	Sodium thiosülfat	0.075	H_2S üretimi	Renksiz/ Grimsi	Siyah çökelti/İnce çizgi
URE	Üre	0.76	UREaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu (2)
TDA	L-triptofan	0.38	Triptofan DeAminaz	TDA/hemen Sarı	Kırmızı kahverengi
IND	L-triptofan	0.19	INDol üretimi	JAMES/hemen Renksiz/ zayıf yeşil/sarı	Pembe
VP	Sodium pirüvat	1.9	Asetoin üretimi (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2/10dk Renksiz	Pembe/kırmızı
GEL	Jelatin (sığır kaynaklı)	0.6	GELatinaz	Siyah pigment yaygın değil	Siyah pigment yaygın
GLU	D-glikoz	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (GLUkoz) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı/grimsi sarı
MAN	D-mannitol	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (MANnitol) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
INO	İnositol	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (INOsitol) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
SOR	D-sorbitol	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (SORbitol) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
RHA	L-rhamnoz	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (RHAmnoız) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
SAC	D-sukroz	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (SACcharoz) (4)	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
MEL	D-melibioz	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (MELibioz) (4)	Mavi/mavi	Sarı
AMY	Amygdalin	0.57	Fermentasyon/oksidasyon (AMYgdalin) (4)	Mavi/mavi	Sarı
ARA	L-arabinoz	1.9	Fermentasyon/oksidasyon (ARAbinoz) (4)	Mavi/mavi	Sarı
OX	(oksidaz test prospektüsüne bakınız)		Sitokrom-Oksidaz	(oksidaz test prospektüsüne bakınız)	



Şekil 3. EM4, EM2, EM6, EM8 İzolatlarının API 20E Test Kiti Sonuçları

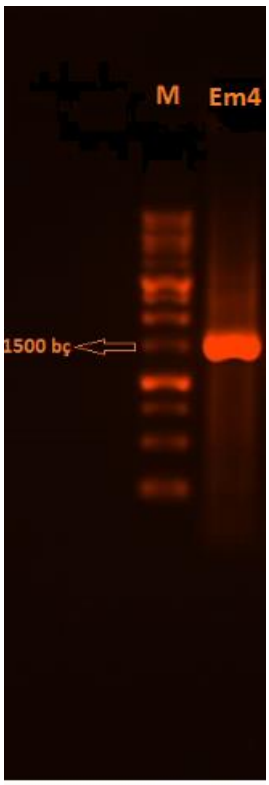
Multikopper oksidaz (MCO) Enzim Aktivitesi Sonuçları

MCO'lar, aminler ve aromatik bileşikler dahil olmak üzere birçok substratın oksidasyonunu katalize eden; mantarlarda, bitkilerde ve bakterilerde bulunan enzimlerdir. Son zamanlarda MCO'lar BA'ları degrede etme yeteneği nedeniyle büyük ilgi görmüştür. MCO enzimatik aktivitesini tespit etmek için bir dizi substrat kullanılmıştır. DMP, ABTS ve SGZ gibi kimyasallar laboratuvarlarda yaygın olarak tercih edilmektedir. Çoğu MCO için, ABTS oksidasyonunun nötr ve güçlü asidik pH'da meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca *Klebsiella* 601 MCO' sunun sırasıyla pH 7.0 ve pH 3.0'da SGZ ve ABTS' yi katalize ettiği bulunmuştur (Wang *et al.* 2022). MCO' lar, sıcaklık, pH değerleri, inhibitörlerin varlığı gibi farklı çevresel koşullar altında yeteneklerini korumalıdır. Bu bilgiler ışığında tez çalışmamızda, API test kiti kullanılarak, dekarboksilasyon yönünden negatif sonuç veren 4 izolatın MCO enzim aktivitesine sahip olup olmadığına bakılmıştır. Sonuç olarak, enzim aktiviteleri kaydedilmiş ve elde edilen veriler sonucunda en yüksek MCO aktivitesine sahip olan izolatın EM4 olduğu görülmüş ve tez çalışmasına EM4 kodlu izolat üzerinden devam edilmiştir.

İzolatın Moleküler İdentifikasyonu

İzolatın 16S rRNA gen bölgelerinin çoğaltılması

EM4 kodlu izolatın moleküler identifikasyonu amacıyla ilk olarak; 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması işlemi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda izolatın 16S rRNA gen bölgesi PCR işlemi ile çoğaltıldı. İzolata ait PCR bant profili Şekil 3'de verilmiştir.



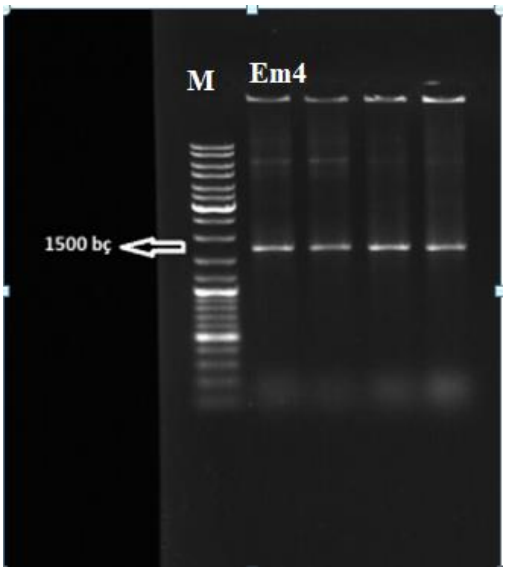
Sekil 3. İzolata ait 16S rRNA PCR bant görüntüsü (M: markır; EM4: Seçilen izolat)

16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

İzolatın moleküler identifikasyonunu gerçekleştirebilmek için; amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesinin nükleotid dizisini belirlemek amacıyla, klonlama çalışması yapıldı. Bu amaçla elde edilen 16S rRNA gen bölgesinin pGEM®-T Easy (Promega) vektörüne ligasyonu ve ligasyon ürününün uygun kompetant *E.coli* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. İşlemin başarısı mavi beyaz koloni taraması ile belirlendi (Şekil 4).



Şekil 4. Mavi beyaz tarama



Şekil 5. İzolatların koloni PCR bant profilleri (M: Markır)

16S rRNA sekans analizi

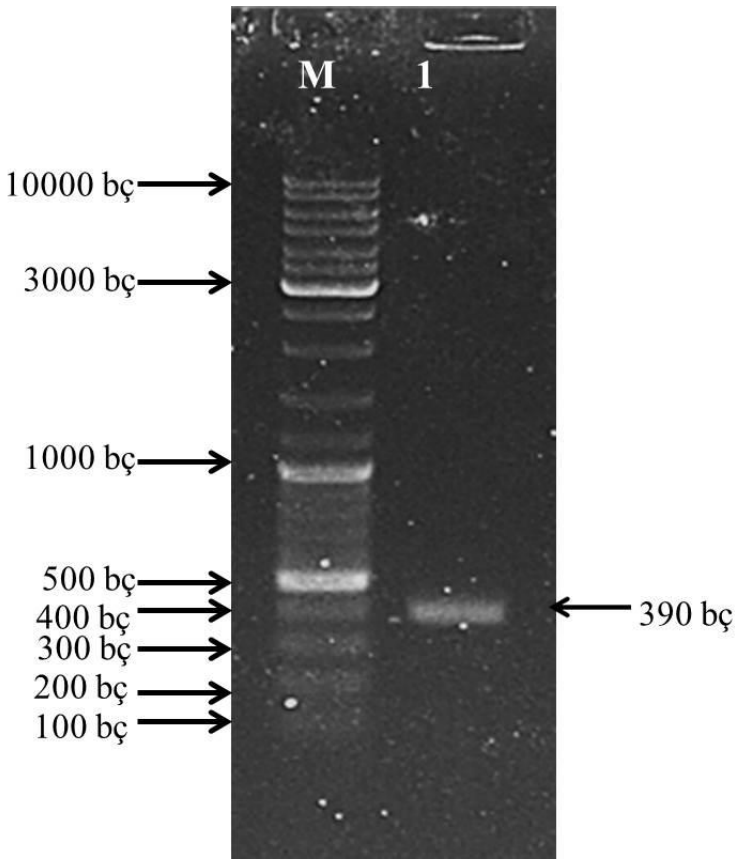
Test izolatının sekans analizi gerçekleştirilerek, 16S rRNA dizisi belirlendi. Elde edilen sekans verileri, Belirlenen diziler GENBANK® veritabanında bulunan diğer diziler ile kıyaslandı. Kıyaslama sonucunda izolatın tür ismi ve benzerlik oranı belirlendi. Son olarak test strainin verileri GENBANK®'a girilerek, izolat için accession numarası alındı (Tablo 9).

Tablo 9. İzolatın 16S rRNA Dizi Analiz Sonucu

İzolat Kodu	Benzediği Tür İsmi	Benzerlik Oranı	Genbank Numarası
EM4	*Levilactobacillus brevis*	%99	OR144159

İzolatın MCO Geninin Spesifik PCR ile Belirlenmesi

Moleküler yöntemler, gıda üretiminin erken aşamalarında bakterilerin sahip olduğu amino asit dekarboksilaz enzim genlerinin veya MCO enzim genlerinin spesifik, hızlı ve güvenilir tespit edilmesi için araçlar sağlamaktadır. Bu doğrultuda moleküler bir yaklaşımla gıdalardaki BA birikiminin önlenmesi amacıyla erken risk değerlendirmesi yapılabilmekte ve önlemler alınabilmektedir. Yapılan çalışmalarda LAB suşlarının, BA içeriğini azaltmak ve BA ile ilgili gıda güvenliği sorunlarını önlemek için starter veya koruyucu kültür olarak kullanmanın önemi vurgulanmıştır (Moreno-Arribas *et al.* 2022). LAB suşlarında bulunan MCO geninin BA degradasyonundan birincil derecede sorumlu olabileceği doğrulanmıştır (Moreno-Arribas *et al.* 2022). Bu bilgiler doğrultusunda, tez çalışmasının amacına uygun olarak, LAB suşlarında BA bozunmasından sorumlu bir enzim olan MCO'yu kodlayan geni tespit etmek için PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla spesifik primerler belirlenip (L-bre FprimerTGCCCGTTACGTGAGACTAC ve L-breRprimer GACTTGTGCTGAACGTGCTG) satın alınmıştır. MCO genine spesifik PCR protokolü literatür taraması sonucunda belirlenmiş ve PCR koşulları optimize edilmiştir (Lee *et al.* 2021). İzolatların BA içeriğinin belirlenmesi için yapılan API test kiti deneyi sonucunda dekarboksilaz enzimi negatif olarak tanımlanan 4 izolat için, MCO enzim aktivitesine bakılarak, en yüksek aktivite gösteren EM4 kodlu izolatın, multikopper oksidaz enzimine sahip olduğu PCR metodu ile kanıtlanmıştır. Bulunun sonuçlar, literatürdeki MCO enzim geni ile ilgili yapılan ilk çalışmadaki bant büyüklüğü (390 bç) açısından benzerlik gösterdiği görülmüştür (Lee *et al.* 2021).

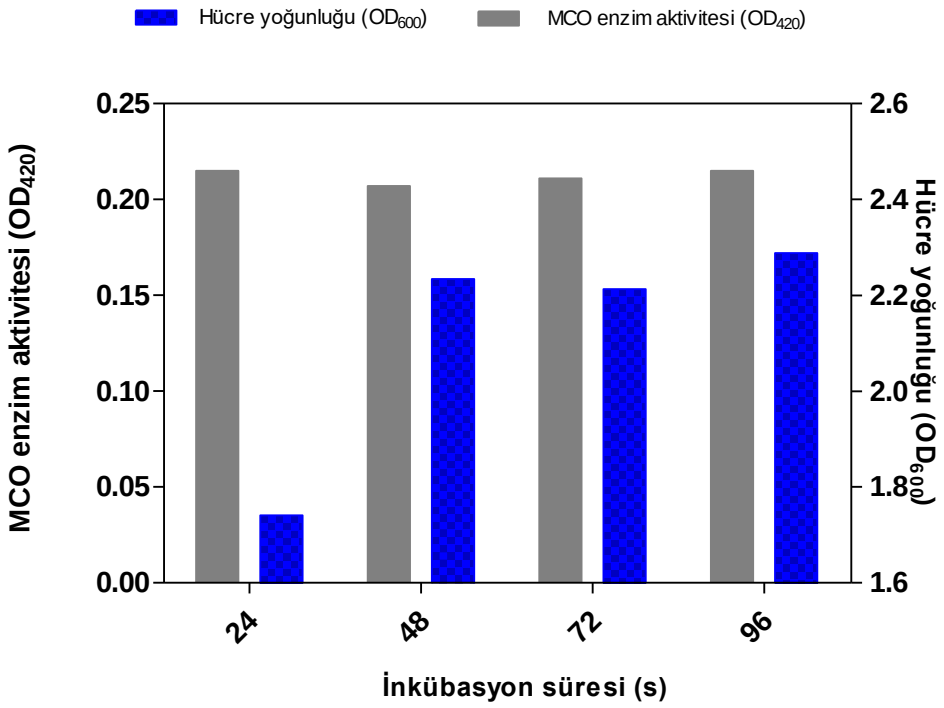


Şekil 6. MCO enzim geni görüntüsü (M: markır; 1: EM4)

MCO Enzim Optimizasyonu

MCO enziminin optimum fermantasyon süresinin belirlenmesi

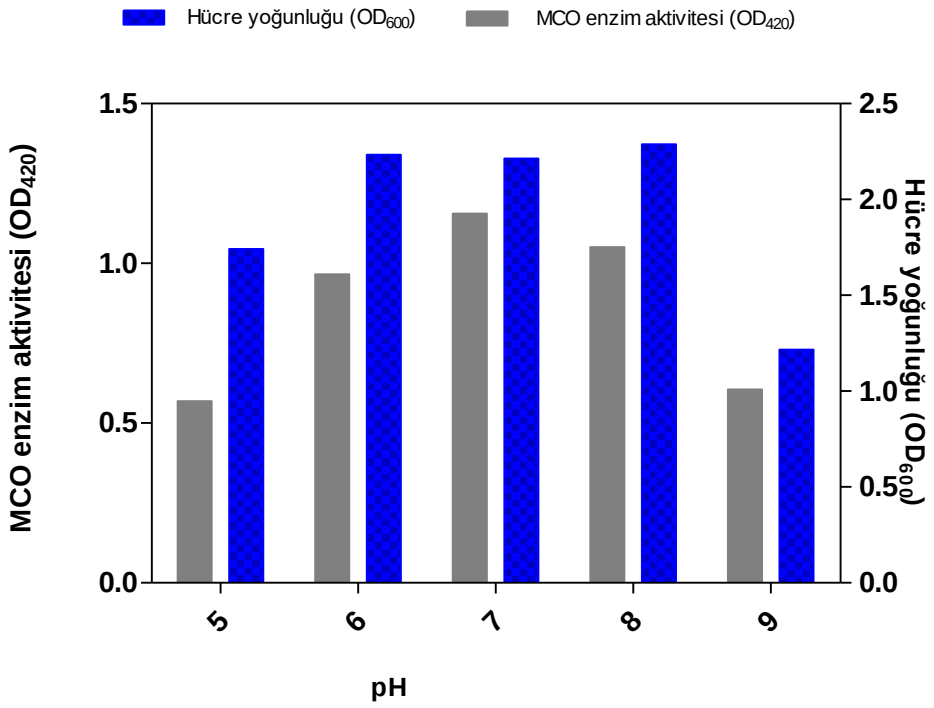
MCO enziminin aktivitesini arttıran parametrelerden biri de fermentasyon süresidir. Fermentasyon süresinin enzimlerin üzerine etkisinin araştırıldığı optimizasyon çalışmaları literatürde bulunmaktadır. MCO'lar, sıcaklık, pH değerleri, inhibitörlerin varlığı gibi farklı çevresel koşullarda yeteneklerini korumalıdır. Yapılan tez çalışmasında, MCO enzim aktivitesi arttırmak için optimal fermantasyon süresinin belirlenmesi amacıyla 4 farklı sıcaklıkta deneyler gerçekleştirilmiştir (Wang *et al.* 2022). Şekil 6'da verilen sonuçlarda da görülebileceği gibi MCO enzim aktivitesi maksimum değere 24 saat'te ulaşmıştır. Sonuç olarak MCO enzim aktivitesi sıcaklığa bağlı olarak değişim gösterdiği görülmüştür. Ancak MCO'lar doğada yaygın olarak bulunmasına karşın, bakteri MCO'ları ile ilgili çalışmalar hala yetersiz durumda olduğu için, mevcut tez çalışması MCO enzim optimizasyonu için bir başlangıç niteliği taşımaktadır.



Şekil 7. MCO enziminin inkübasyon süresi grafiği

MCO enziminin optimal pH değerinin belirlenmesi

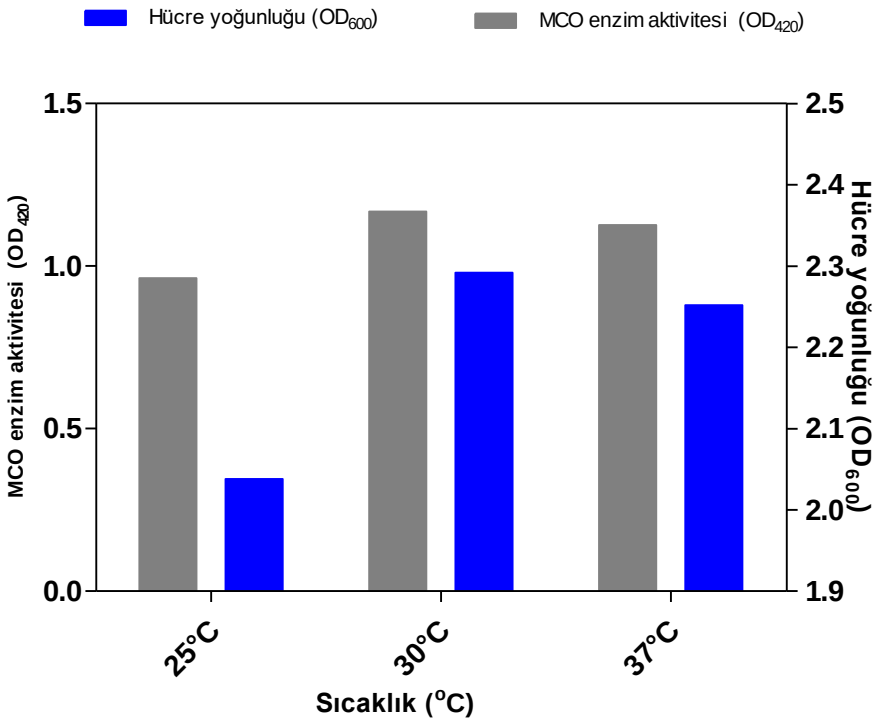
Enzimler genellikle belirli bir pH'ta aktiftir. Enzimler, proteinlerin yapısında bulunan maddeler olduklarından, amin ve karboksil grupları ortamın pH'ına bağlı olarak az ya da çok iyonlaşarak enzimin konformasyonunda (yapısal dizilişinde) değişiklikler meydana getirmektedir. Ek olarak, protein yapıları nedeniyle hem yüksek hem de düşük pH değerleri enzimleri denatüre edebilir. Enzimler üzerine pH'ın etkisinin araştırıldığı optimizasyon çalışmaları literatürde mevcuttur. Mevcut tez çalışmasında, MCO enzim aktivitesi arttırmak için pH değerinin belirlenmesi amacıyla 5 farklı pH değerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. MCO enzim optimizasyonu için pH değerinin belirlenmesi amacıyla, MCO enzim aktivitesi ölçümü için substrat olarak 4 mM 100 mikrolitre ABTS, 200 mM (pH 5) Sodyum-Asetat tomponu ve enzim kaynağı olarak 5 mL kültür süpernatantı kullanılmıştır. 37 °C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 420 nm dalga boyunda spektrofotometre'de absorbans ölçülmüştür. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, *Lactobacillus sakei*'nin MCO geni klonlanmış olup heterolog olarak ifade edilmiştir. Sonuç olarak katalitik etkinlik için en uygun pH 3.0 olarak bulunmuştur (Wang *et al.* 2021). Mevcut tez çalışmamızdaki; sonuçlarda da görülebileceği gibi MCO enzim aktivitesi pH'a bağlı olarak değişim göstermiştir. MCO enzim aktivitesi maksimum değere 7 pH'da ulaşmıştır. Literatürle kıyaslandığında farklı sonuçlar elde edilmesinin sebebi MCO enziminin geniş bir pH skalasına sahip olması ve MCO enziminin geniş bir substrat yelpazesini oksitleme yeteneğine sahip olması ve kullanılan substratın tipi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Wang *et al.* 2021).



Şekil 8. MCO enziminin pH grafiği

MCO enziminin optimal sıcaklık değerinin belirlenmesi

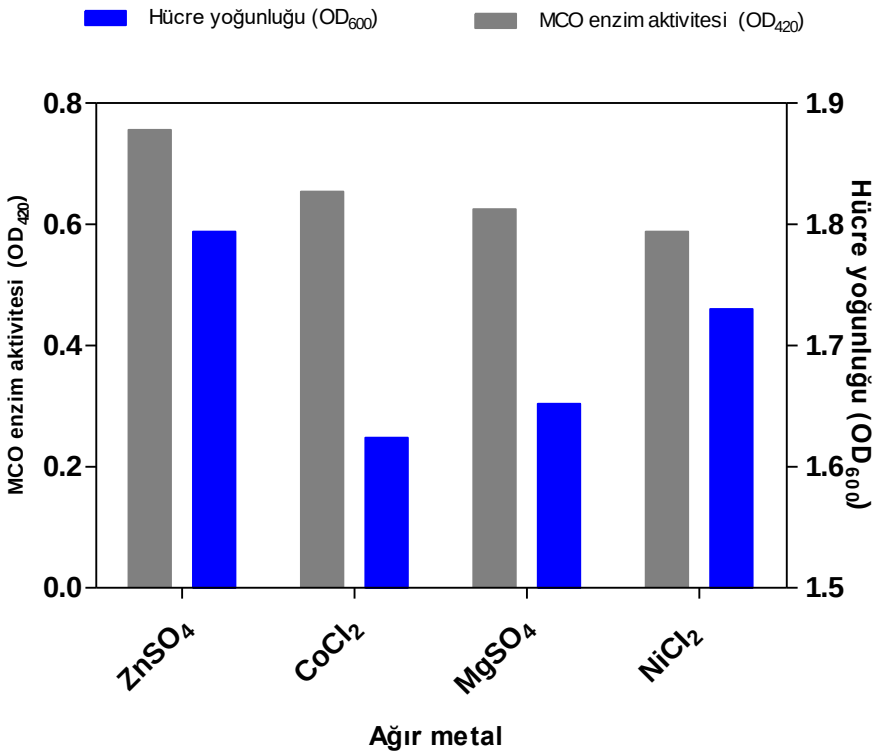
MCO enzim optimizasyonu için sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla MCO enzim aktivitesi ölçümü için substrat olarak 4 mM 100 mikrolitre ABTS, 200 mM (Ph 5) Sodyum-Asetat tomponu ve enzim kaynağı olarak 5 mL kültür süpernatantı kullanılmıştır. 37 °C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 420 nm dalga boyunda spektrofotometre'de absorbans ölçülmüştür. Mevcut tez çalışmamızdaki; sonuçlarda da görülebileceği gibi MCO enzim aktivitesi sıcaklık'a bağlı olarak değişim göstermiştir. MCO enzim aktivitesi maksimum değere 30 °C'de ulaşmıştır. Literatürdeki çalışmalarda, sıcaklığın MCO'nun katalitik aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmış ve en yüksek oksidasyon aktivitesi 25 °C'de bulunmuştur. Örneğin, *Bacillus velezensis* TCCC 111904'ten elde edilen lakkaz, 80 °C'de maksimum aktivite sergilerken *Fusarium oxysporum* HUIB02'den elde edilen lakkaz, 40 °C sıcaklıkta maksimum aktivite sergilemiştir (Pištěková *et al* 2020). Tez çalışmamızdaki sonuçlar ile literatürdeki bulunan sonuçlar karşılaştırıldığında, LAB'ın optimal büyüme sıcaklığı göz önünde bulundurulduğunda çıkan sonuçlar şaşırtıcı olmamaktadır. Ek olarak, MCO enziminin geniş bir sıcaklık sklasına sahip olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 9. MCO enziminin sıcaklık grafiği

MCO enziminin aktivitesi arttıran ağır metalin belirlenmesi

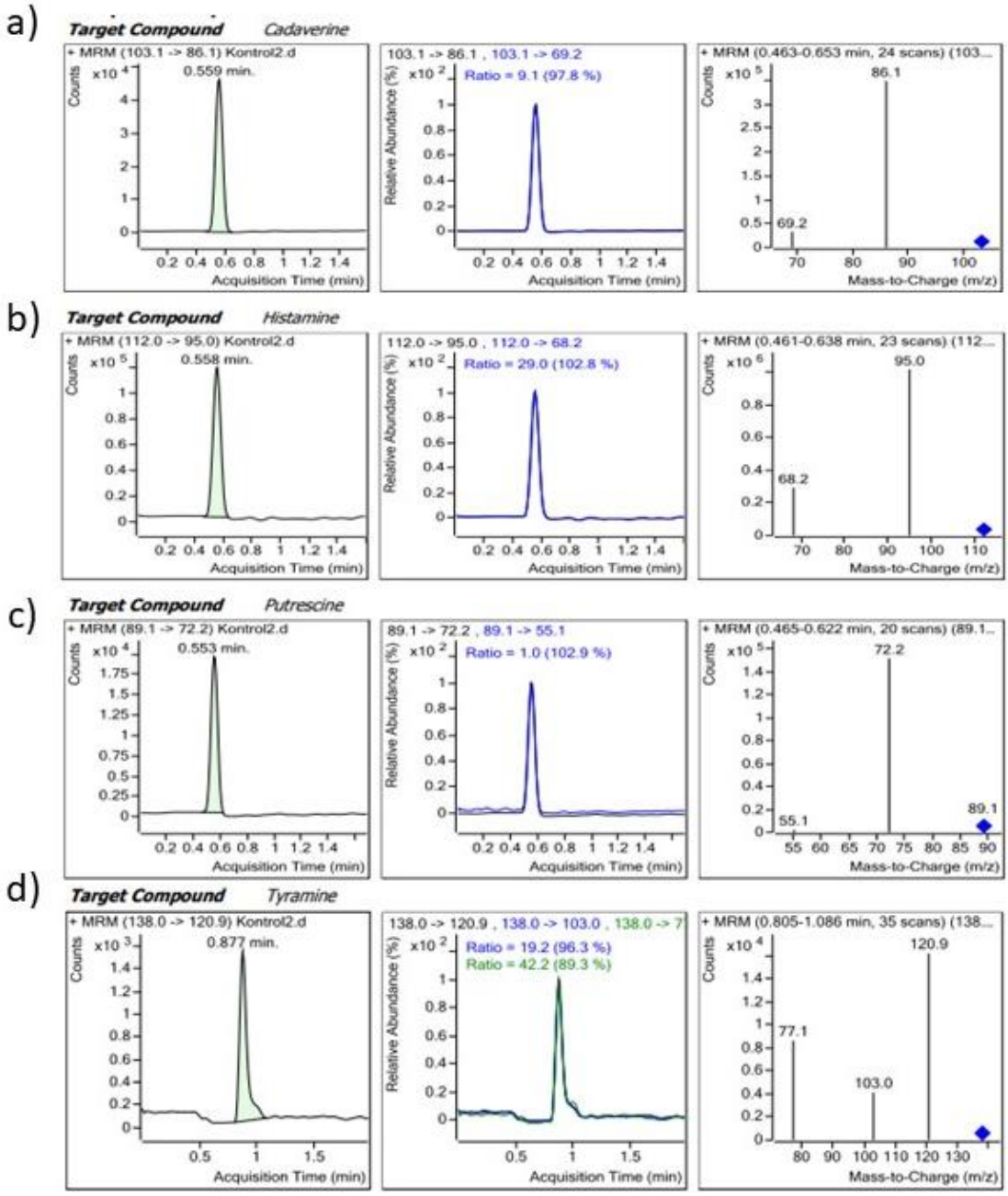
MCO enzim optimizasyonu için ağır metal değerinin belirlenmesi amacıyla MCO enzim aktivitesi ölçümü için substrat olarak 4 mM 100 mikrolitre ABTS, 200 mM (pH 5) Sodyum-Asetat tomponu ve enzim kaynağı olarak 5 mL kültür süpernatantı kullanılmıştır. 37 °C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 420 nm dalga boyunda spektrofotometre'de absorbans ölçülmüştür. Şekil 10'da da görüldüğü üzere maksimum enzim aktivitesi $ZnSO_4$ ilavesiyle gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar Zn^{+2} iyonlarının MCO'nun aktivitesi üzerine olumlu etki yaptığını göstermektedir. Öte taraftan Co^{+2} iyonları ise hem bakteri büyümesini hemde enzim aktivitesini olumsuz etkilediği görülmüştür. Literatür verileri incelendiğinde kobaltın bakteri metabolizması üzerindeki zararlı etkileri belirtilmiş ve kobaltın çeşitli metabolik yollarda demir ile rekabet halinde bulunduğu bununda hücre büyümesini oluşuz etkilediği bildirilmiştir. (Majtan *et al.* 2011; Ranquet *et al.* 2007; Skovran *et al.* 2004)



Şekil 10. MCO enziminin ağır metal grafiği

İzolatlatın biyojen amin parçalama miktarlarının LC-MS metodu ile belirlenmesi

EM4 kodlu izolatın maksimum MCO üretimini gerçekleştirdiği optimize koşullar altında; BA parçalama miktarları LC-MS yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla, içerisinde histamin, kadaverin, putresin ve tiramin içeren ve bakteri bulunmayan kontrol grubu ve aynı konsantrasyonlarda aynı BA'ları içeren ve bakteri ilavesi yapılan muamele grubu oluşturuldu. 24 saat sonunda parçalanan BA miktarları Şekil 11' ve Tablo 10' da verilmiştir.



Şekil 11. Kontrol ve Test gruplarında biyojen aminlere ait LC-MS kromotogramları ve kütle spektrumları a) kadeverin, b) histamin, c) putresin, d) tiramin

Tablo 10. Kontrol ve Test grubuna ait biyojen amin konsantrasyonları

	Kadaverin (ng/ml)	**Histamin (ng/ml)**	**Putresin (ng/ml)**	**Tiramin (ng/ml)**
Kontrol	2944,7	4279,9	1288,8	117,76
Test	1420,4	757,8	795,9	87,8

Şekil 11 ve Tablo 10'da ki veriler incelediğinde kadaverin miktarı kontrol grubunda 2944,7 ng/ml iken, EM4'ün 24 saatlik kültüründe 1420,4 ng/ml' ye, histamin miktarı 4279,9 ng/ml iken 757,8 ng/ml' ye, putresin miktarı 1288,8 ng/ml iken 795,9 ng/ml' ye tiramin miktarı 117,76 ng/ml iken, 87,8 ng/ml'ye düştüğü görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında EM4' ün

optimize koşullar altında ürettiği MCO'nun dört BA'yı parçalanmasında rol oynadığı görülmüştür. Oransal bazda en yüksek parçalanmanın histaminde olduğu (%83), buna karşın ise en az parçalanmanın tiraminde (%26) gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Literatür verileri incelendiğinde, Ni *et al* (2021), yapmış olduğu araştırmada *B. Amyloliquefaciens* tarafından üretilen MCO'nun histaminin parçalanmasında en iyi yeteneği gösterdiğini bildirmiştir. Yine başka bir çalışmada (Wang *et al.* 2021) *Lactobacillus sakei* bakterisine ait MCO' nun histamini çok iyi derecede parçaladığını bildirmişlerdir. Bu yönüyle elde edilen sonuçlar literatür verileriyle uyuşmaktadır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında, öncelikle biyojen aminleri (BA) degrede edebilen laktik asit bakterilerilerini (LAB) tespit edebilmek amacıyla, LAB yoğunluğunun fazla olduğu düşünülen peynir kaynak olarak tercih edilmiş, Erzurum ili ve ilçelerinden 21 adet farklı peynir örneği toplanmıştır. Ardından, LAB'nin izolasyonu gerçekleştirilip, bu aşamadan sonra, BA'ları degrede edebilme noktasında kilit role sahip çeşitli enzimlerin (MCO, dekarboksilaz) üretim profillerinin ortaya konulabilmesi için, BioMerieux firmasına ait API test kiti kullanılmıştır. Sonrasında, özellikle dekarboksilaz ve multikopper oksidaz (MCO) enzim aktivitesi açısından değerlendirilen izolatların, belirtilen enzimlerin optimizasyonu açısından değerlendirilmesi öngörülmüş ve enzim optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Enzim üretim potansiyeli kanıtlanmış, enzim optimizasyon çalışması tamamlanmış olan izolatın daha sonra BA'ları degrede edebilme potansiyellerini belirlemek amacıyla BA içeren ortamdaki davranışları LC-MS ile ölçülmüştür. Sonrasında, EM4 kodlu izolatın tanılama işlemleri yapılmıştır, tanılama sonucunda %99 oranında *Levilactobacillus brevis* türüne benzediği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; Elde edilen verilerden yola çıkılarak; tüm parametreler açısından pozitif sonuç elde edilen EM4 kodlu *Levilactobacillus brevis*'in BA'ları parçalama noktasında oldukça önemli bir izolat olduğu görülmüş, izolatın hem gen, hem biyokimyasal seviyede hem de LC-MS analizlerine göre kantitatif olarak belirlenen yüzde hesaplarına bakıldığında, özellikle gıdalarda oluşan ve insan sağlığını tehdit eden BA gruplarını degrede ediyor olması, bu izolatı hem teknolojik olarak hem de gıda güvenliği açısından oldukça önemli bir noktaya taşımıştır. İzolatın; GRAS (Generally Recognized as Safe) mikroorganizma olarak kullanılabilmesi teknolojik özellikler açısından gıdalara eklenebilmesine BA'ları degrede etmesinden dolayı gıdaları iyileştirebilme potansiyeline sahip olabilmesinin kanıtlanması için, uygulama noktasında daha ileri boyutlu çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKÇA

Abo El-Makarem, H. S., & Amer, A. A. (2016). Biogenic amine levels during Ras cheese ripening. In *Third International Food Safety Conference, Damanhur University* (Vol. 10, No. 10, p. 2016).

Adıgüzel, G., Fermente Türk Sucuğundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik Ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu. 2008.

Aktop, S. and Şanlıbaba, P. 2018. Occurred Biogenamins Resulting from Microbial Activities. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 6(8), 1035-1042.

Akyol, V., Kundakçı, A. ve Ergönül, B. 2015. Gıdalarda Biyojen Aminler-Biogenic Amines in Foods. Celal Bayar University Journal of Science, 11(2), 294-305.

Alper, N., & Temiz, A. (2001). Gıdalardaki Biyojen Aminler ve Önemi Biogen Amines In Food. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, *58*(2), 71-80.

Andic, S., Genccelep, H. and Kose, S. 2010. Determination of biogenic amines in herby cheese. International Journal of Food Properties, 13(6), 1300-1314.

Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46: 548s.

Arslan, S., 2017. Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

Arzu, Ü. N. A. L., Çabuk, A., & Kolonkaya, N. (2011). Dechlorination of 2, 4, 6-trichlorophenol by free and immobilized laccase from Trametes versicolor in a lab scale bioreactor. *Anadolu University Journal of Science and Technology C-Life Sciences and Biotechnology*, *1*(2), 113-24.

Baltaci, O., Genc, B., Arslan, S., Adiguzel, A. 2016. "Isolation, characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary." 90 Research an biotechnological enzyme potential 10.1080/01490451.2015.1137662.

Behera, S.S., Panda, S.K. and Ray, R.C. 2021. Biogenic amines in fermented vegetables: food safety issues. Microbial Biotechnology in Food and Health, 165-195.

Benkerroum, N. 2016. Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15(4), 801- 826.

Biji, K.B., Ravishankar, C.N., Venkateswarlu, R., Mohan, C.O. and Gopal, T.S. 2016. Biogenic amines in seafood: a review. Journal of Food Science and Technology, 53(5), 2210-2218.

Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 53, 33–41.

Costantini, A., Vaudano, E., Pulcini, L., Carafa, T. and Garcia-Moruno, E. 2019. An overview on biogenic amines in wine. Beverages, 5(1), 19.

Čuboň, J., Haščík, P., Hleba, L., Cviková, P., Tkáčová, J., Lopašovský, Ľ. and Pavelková, A. 2019. Biogenic Amines as Risk Factors of Food Chain. Archives of Ecotoxicology, 1(1), 7-10.

de la Torre, C.A.L. and Conte-Junior, C.A. 2018. Detection of biogenic amines: Quality and toxicity indicators in food of animal origin, In: Food Control and Biosecurity. Academic Press, 225-257.

Doeun, D., Davaatseren, M. and Chung, M.S. 2017. Biogenic amines in foods. Food Science and Biotechnology, 26(6), 1463-1474.

Dong, H. and Xiao, K. 2017. Modified QuEChERS combined with ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine seven biogenic amines in Chinese traditional condiment soy sauce. Food Chemistry, 229, 502-508.

Durak-Dados, A., Michalski, M. and Osek, J. 2020. Histamine and other biogenic amines in food. Journal of Veterinary Research, 64(2), 281-288.

Fernández, M., Linares, D.M., Del Río, B., Ladero, V. and Alvarez, M.A. 2007. HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. Journal of Dairy Research, 74(3), 276-282.

Fernández, M., Linares, D.M., Rodríguez, A. and Alvarez, M.A. 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. Applied Microbiology and Biotechnology, 73(6), 1400-1406.

Gama, M. R. and Rocha, F.R. 2020. Solventless separation of underivatized biogenic amines by sequential injection chromatography. Microchemical Journal, 156, 104839.

Garai, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A., & Moreno-Arribas, M. V. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(5), 473-478.

Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G. and Özogul, F. 2016. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. Frontiers in Microbiology, 7, 1218.

Gezgin, Y., Akyol, I., Kuley, E. and Özogul, F. 2013. Biogenic amines formation in *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made natural yogurt. Food Chemistry, 138(1), 655-662.

Göncü, B., Akın, M. S., & Akın, M. B. (2017). Peynirde biyojen amin varlığı ve tespit edilme yöntemleri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, *21*(1), 126-132.

Guo, Y.Y., Yang, Y.P., Peng, Q. and Han, Y. 2015. Biogenic amines in wine: A review. International Journal of Food Science and Technology, 50(7), 1523-1532.

Han, B., Han, X., Deng, H., Wu, T., Li, C., Zhan, J., Huang, W. and You, Y. 2022. Profiling the occurrence of biogenic amines in wine from Chinese market and during fermentation using an improved chromatography method. Food Control, 136, 108859.

Harrigan FW, McCance EM. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. London, Academic Press, 1976.

Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martin, M.C., Ladero, V. and Alvarez, M.A. 2012. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. International Journal of Food Microbiology, 157(2), 297-304.

Huang, L., Wang, Y., Li, R., Wang, Q., Dong, J., Wang, J. and Lu, S. 2021. Thyme essential oil and sausage diameter effects on biogenic amine formation and microbiological load in smoked horse meat sausage. Food Bioscience, 40, 100885.

Jain, A. and Verma, K.K. 2018. Strategies in liquid chromatographic methods for the analysis of biogenic amines without and with derivatization. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 109, 62-82.

Kim, M.K., Mah, J.H. and Hwang, H.J. 2009. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. Food Chemistry, 116(1), 87-95.

Lee, J., Jin, Y. H., Pawluk, A. M., & Mah, J. H. (2021). Reduction in biogenic amine content in baechu (napa cabbage) kimchi by biogenic amine-degrading lactic acid bacteria. Microorganisms, 9(12)

Li, B., & Lu, S. (2020). The importance of amine-degrading enzymes on the biogenic amine degradation in fermented foods: A review. *Process Biochemistry*, *99*, 331-339.

Li, T., Huang, L., Li, Y., Xu, Z., Ge, X., Zhang, Y., ... & Liu, Y. (2020). The heterologous expression, characterization, and application of a novel laccase from *Bacillus velezensis*. *Science of The Total Environment*, *713*, 136713.

Luengo, J.M. and Olivera, E.R. 2020. Catabolism of biogenic amines in Pseudomonas species. Environmental Microbiology, 22(4), 1174-1192.

Mah, J.H., Park, Y.K., Jin, Y.H., Lee, J.H. and Hwang, H.J. 2019. Bacterial production and control of biogenic amines in Asian fermented soybean foods. Foods, 8(2), 85.

Majtan, T., Frerman, F. E., & Kraus, J. P. (2011). Effect of cobalt on *Escherichia coli* metabolism and metalloporphyrin formation. Biometals, 24, 335-347.

Mayer, H.K. and Fiechter, G. 2018. UHPLC analysis of biogenic amines in different cheese varieties. Food Control, 93, 9-16.

Meng, G., Zhang, C., Du, P., Sun, S., Zhang, X., Wang, B. and Lu, X. 2022. A Dual- Channel Luminescent Signal Readout Nanoprobe for Rapid Monitoring of Biogenic Amines in Milk and Yogurt. Sensors and Actuators B: Chemical, 131435.

Michalski, R., Pecyna-Utylska, P. and Kernert, J. 2021. Determination of ammonium and biogenic amines by ion chromatography. A review. Journal of Chromatography A, 1651, 462319.

Mohedano, M.L., López, P., Spano, G. and Russo, P. 2015. Controlling the formation of biogenic amines in fermented foods, In: Advances in fermented foods and beverages. Woodhead Publishing, 273-310.

Moreno-Arribas, M.V., Smit, A.Y. and du Toit, M. 2022. Biogenic amines and the winemaking process, In: Managing Wine Quality. Reynolds, A.G. (ed), Woodhead Publishing, 595-627.

Munir, M.A. and Badri, K.H. 2020. The importance of derivatizing reagent in chromatography applications for biogenic amine detection in food and beverages. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2020, 14 pages.

Mürüvvet, D. Ü. Z., & Fatih Fidan, A. (2016). Biogenic amines and effects. *Kocatepe Veterinary Journal*, *9*(2), 114-121.

Nagakubo, T., Kumano, T., Ohta, T., Hashimoto, Y., & Kobayashi, M. (2019). Copper amine oxidases catalyze the oxidative deamination and hydrolysis of cyclic imines. *Nature communications*, *10*(1), 413.

Ni, X., Chen, J., Du, G., & Fang, F. (2021). Food-grade expression of multicopper oxidase with improved capability in degrading biogenic amines. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 1-11.

Nuñez, M., del Olmo, A. and Calzada, J. 2016. Biogenic Amines, In: Encyclopedia of Food and Health. Caballero, B., Finglas, P. M. and Toldrá, F. (eds), Academic Press, 416-423.

O'Sullivan, D.J., Fallico, V., O'Sullivan, O., McSweeney, P.L., Sheehan, J.J., Cotter, P.D. and Giblin, L. 2015. High-throughput DNA sequencing to survey bacterial histidine and tyrosine decarboxylases in raw milk cheeses. BMC Microbiology, 15(1), 1-12.

Ordóñez, J.L., Callejón, R.M., Troncoso, A.M. and García–Parrilla, M.C. 2017. Evaluation of biogenic amines profile in opened wine bottles: Effect of storage conditions. Journal of Food Composition and Analysis, 63, 139-147.

Özdestan, Ö. and Üren, A. 2010. Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product. European Food Research and Technology, 231(1), 101-107.

Özogul, Y. and Özogul, F. 2019. Biogenic Amines Formation, Toxicity, Regulations in Food, In: Biogenic Amines in Food: Analysis, Occurrence and Toxicity. Saad, B. and Tofalo, R. (eds), 1-17.

Papageorgiou, M., Lambropoulou, D., Morrison, C., Namieśnik, J. and Płotka-Wasylka, J. 2018. Direct solid phase microextraction combined with gas chromatography– Mass spectrometry for the determination of biogenic amines in wine. Talanta, 183, 276-282.

Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J. and Ferreira, V. 2012. High- performance liquid chromatography analysis of amines in must and wine: a review. Food Reviews International, 28(1), 71-96.

Pernica, M., Poloucká, P., Seifertová, M. and Šimek, Z. 2015. Determination of alkylphenols in water samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry after pre-column derivatization with dansyl chloride. Journal of Chromatography A, 1417, 49-56.

Pištěková, H., Jančová, P., Berčíková, L., Buňka, F., Sokolová, I., Šopík, T., ... & Buňková, L. (2020). Application of qPCR for multicopper oxidase gene (MCO) in biogenic amines degradation by *Lactobacillus casei*. *Food Microbiology*, *91*, 103550.

Pradenas, J., Galarce-Bustos, O., Henríquez-Aedo, K., Mundaca-Uribe, R. and Aranda, M. 2016. Occurrence of biogenic amines in beers from Chilean market. Food Control, 70, 138-144.

Rafehi, M., Faltraco, F., Matthaei, J., Prukop, T., Jensen, O., Grytzmann, A., Blome, F.G., Berger, R.G., Krings, U., Vormfelde, S.V., Tzvetkov, M.V. and Brockmöller, J. 2019. Highly variable pharmacokinetics of tyramine in humans and polymorphisms in OCT1, CYP2D6, and MAO-A. Frontiers in Pharmacology, 1297.

Ramos, R.M., Brandão, P.F. and Rodrigues, J.A. 2020. Development of a SALLE- HPLC-FLD analytical method for the simultaneous determination of ten biogenic amines in cheese. Food Analytical Methods, 13(5), 1088-1098.

Ranquet C, Ollagnier-de-Choudens S, Loiseau L, Barras F, Fontecave M. Cobalt stress in *Escherichia coli*. The effect on the iron-sulfur proteins. J Biol Chem. 2007; 282(42):30442–30451. doi: 10.1074/jbc.M702519200

Restuccia, D., Loizzo, M.R. and Spizzirri, U.G. 2018. Accumulation of biogenic amines in wine: role of alcoholic and malolactic fermentation. Fermentation, 4(1), 6.

Ruiz-Capillas, C. and Herrero, A.M. 2019. Impact of biogenic amines on food quality and safety. Foods, 8(2), 62.

Saaid, M., Saad, B., Ab Rahman, I., Ali, A.S.M. and Saleh, M.I. 2010. Extraction of biogenic amines using sorbent materials containing immobilized crown ethers. Talanta, 80(3), 1183-1190.

Sanchez, I., Palop, L., Ballesteros, C., 2000. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermantation of „Almagro" eggplants. International Journal of Food Microbiology, 59: 9-17.

Sanlier, N. and Bektesoglu, M. 2021. Migraine and Biogenic Amines. Annals of Medical and Health Sciences Research, 11(4), 1362-1371.

Santos, M.H.S. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology, 29(2-3), 213-231.

Schirone, M., Esposito, L., D'Onofrio, F., Visciano, P., Martuscelli, M., Mastrocola, D. and Paparella, A. 2022. Biogenic Amines in Meat and Meat Products: A Review of the Science and Future Perspectives. Foods, 11(6), 788.

Setia, N. and Setia, R.C. 2018. Polyamines: an overview and prospects in crop improvement. Crop Improv Strateg App, 376-393.

Skovran E, Lauhon CT, Downs DM. Lack of yggx results in chronic oxidative stress and uncovers subtle defects in Fe-S cluster metabolism in *Salmonella enterica*. J Bacteriol. 2004;186(22):7626–7634. doi: 10.1128/JB.186.22. 7626–7634. 2004.

Stahl, S.M. and Felker, A. 2008. Monoamine oxidase inhibitors: a modern guide to an unrequited class of antidepressants. CNS Spectrums, 13(10), 855-871.

Stojanović, Z. and Kos, J. 2020. Detection of metabolites of microbial origin in beverages with harmful effect on human health-Biogenic amines and mycotoxins, In: Safety Issues in Beverage Production. Grumezescu, A.M. and Holban, A.M. (eds), Academic Press, 39-77.

Sugino, H. I. R. O. Y. U. K. I., Sasaki, M. I. N. O. R. U., Azakami, H. I. R. O. Y. U. K. I., Yamashita, M. I. T. S. U. O., & Murooka, Y. (1992). A monoamine-regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the monoamine oxidase structural gene (maoA) and the maoC gene. *Journal of bacteriology*, *174*(8), 2485-2492.

Suzzi, G., Perpetuini, G. and Tofalo, R. 2022. Biogenic Amines, In: Encyclopedia of Dairy Sciences. McSweeney, P.L.H. and McNamara, J.P. (eds), Academic Press, 95-102.

Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi,Ankara.

Vinci, G., Maddaloni, L., Prencipe, S.A. and Ruggieri, R. 2021. Natural Contaminants in Wines: Determination of Biogenic Amines by Chromatographic Techniques. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18(19), 10159.

Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R. and Suzzi, G. 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood. Frontiers in Microbiology, 3(188), 1-10.

Wang, J., Zhang, X., Li, X., Yu, Z., Hu, J. and Zhu, Y. 2021. Effects of plant extracts on biogenic amine accumulation, bacterial abundance and diversity in fermented sausage. CyTA-Journal of Food, 19(1), 771-781.

Wang, X., Zhao, Y., Zhang, S., Lin, X., Liang, H., Chen, Y., & Ji, C. (2022). Heterologous Expression of the *Lactobacillus sakei* Multiple Copper Oxidase to Degrade Histamine and Tyramine at Different Environmental Conditions. Foods, 11(20), 3306. 2570.

Wójcik, W., Łukasiewicz, M. and Puppel, K. 2021. Biogenic amines: formation, action and toxicity–a review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 101(7), 2634-2640.

Yamada, H., Adachi, O., & Ogata, K. (1965). Amine oxidases of microorganisms: part I. Formation of amine oxidase by fungi. *Agricultural and Biological Chemistry*, *29*(2), 117-123.

Yeğin, S. ve Üren, A. 2008. Gıdalarda biyojen amin oluşumunu etkileyen faktörler, Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, 977-980, Erzurum.

Yerlikaya, P., & Gökoğlu, N. (2002). Gıdalarda biyojen aminler ve önemi. Gıda Mühendisliği Dergisi, 6(12), 24-30

Zhang, Y.J., Zhang, Y., Zhou, Y., Li, G.H., Yang, W.Z. and Feng, X.S. 2019. A review of pretreatment and analytical methods of biogenic amines in food and biological samples since 2010. Journal of Chromatography A, 1605, 360361.

Zhao, Y., Zhang, X., Jin, H., Chen, L., Ji, J. and Zhang, Z. 2022. Histamine Intolerance- A Kind of Pseudoallergic Reaction. Biomolecules, 12(3), 454.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı: **Doğum tarihi:** **Doğum Yeri:** **Uyruğu:** **Adres:** **Tel:** **E-mail:**	Elifnur MERAL
Eğitim	
Lise: **Lisans:** **Yüksek lisans:**	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	