EV YAPIMI BEYAZ PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BİYOJEN AMİN DEGREDE ETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ammar Rafiq Qasem ALMANSOUR

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2025
(Her hakkı saklıdır.)

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

EV YAPIMI BEYAZ PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BİYOJEN AMİN DEGREDE ETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Investigation of The Biogenic Amine Degrading Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Homemade White Cheese)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ammar Rafiq Qasem ALMANSOUR

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum

Ocak, 2025

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Ev Yapımı Beyaz Peynirden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Biyojen Amin Degrede Etme Potansiyellerinin Araştırılması

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Ammar Rafiq Qasem ALMANSOUR tarafından hazırlanan bu çalışma, 20/01/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / ~~oy çokluğu~~ (3/3)** ile kabul edilmiştir.

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

Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve …… sayılı kararı.

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

Prof.Dr. Alper NUHOĞLU
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 "Ev Yapımı Beyaz Peynirden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Biyojenik Amin Degrede Etme Potansiyellerinin 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	0	**30**
Kuramsal Temeller	13	**30**
Materyal ve Yöntem	13	**35**
Bulgular ve Tartışma	1	**20**
Sonuç ve Öneriler	0	**20**
Tezin Geneli	9	**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)	**Tez Danışmanı**
Ammar Rafiq Qasem ALMANSOUR	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
20.1.2025	**20.1.2025**
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	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 kadar 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 ve yardımlarını esirgemeyen, Sayın Prof. Dr. Gülşah Çanakçı ADIGÜZEL ve Doç. Dr. Mustafa Özkan BALTACI'ya,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeden, güzel sözlerini ve yardımlarını hatta dostluklarını hep arayacağım çok değerli ekip arkadaşlarım Ikrimah Al-HANBALİ, Sefa Nur AKKAYA, Merve AKKAYA, Rahime ALTINTAS, Selma SAOULA, Hilal TOSUN, Habibe KARADAŞ, Betül BAĞCI ve Elifnur AKBIYIK'a,

Evlatları olmaktan gurur duyduğum, varlıkları ve dualarıyla beni desteklemekten bir an olsun vazgeçmeyen, hayattaki duruşları ile beni bugünlere kadar taşıyan babam Rafique ALMANSOUR'a, annem Amneh ALMANSOUR'a, abim Mazen ALMANSOUR'a ve sevgili kız kardeşim Narjiss ALMANSOUR'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Ammar ALMANSOUR

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EV YAPIMI BEYAZ PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BİYOJEN AMİN DEGREDE ETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ammar Rafiq Qasem ALMANSOUR

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: Biyojenik aminler (BA'lar), birçok yiyecek ve içecekte bulunan, üretimi ve degradasyonu mikroorganizmalar tarafından kontrol edilen organik bileşiklerdir. BA'ların aşırı tüketimi insan sağlığını olumsuz etkilemektedir. Dolayısıyla potansiyel sağlık risklerini izlemek, olası durumları yönetmek ve güvenlik standartlarına göre besin kalitesini sağlamak için gıdalardan izole edilmektedir. Bu amaç doğrultusunda, mikroflora açısından oldukça zengin bir kaynak olan ev tipi beyaz peynirden, laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyonu, elde edilen izolatların fenotipik özelliklerinin karakterizasyonu ve bakteri izolatların BA degrede etme yeteneklerinin hem gen seviyesinde hemde HPLC analizi ile araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Erzurum ili ve çevresindeki ilçelerden toplanan ev yapımı beyaz peynir örneklerinden bakteri izolasyonu yapılmış ve elde edilen izolatların LAB olup olmadığı fenotipik testlerle belirlenmiştir. Potansiyel LAB izolatlarının, biyojenik aminler (histamin, tiramin, putresin ve kadaverin) üzerindeki degradasyon potansiyelini belirlemek için öncelikli olarak, BA üretim yeteneği gösteren suşlar hem gen seviyesinde hemde HPLC analizi ile belirlenerek çıkarılmıştır. Daha sonra kalan izolatların çoklu bakır oksidaz (MCO) enzim gen profilleri, genomik olarak belirlenerek HPLC ile teyit edilmiştir. Son olarak, istenilen özelliklere sahip izolatlar moleküler olarak tür seviyesinde tanımlanmıştır.

Bulgular: Tez çalışmasında, 500 adet bakteri izole edildi ve fenotipik karakterizasyon sonucunda 265 adet izolatın, LAB olabileceği belirlendi. Moleküler yaklaşım kullanılarak BA üretiminden sorumlu enzimlerin genlerini hedefleyen primerler ile PCR taraması yapıldı. Çalışma sonucunda, izolatların yaklaşık %72'sinin *hdcA* ve *tdcA* genleri için amplikon gösterdiği tespit edildi. Moleküler taramanın ardından seçilen izolatların BA üretme yetenekleri, HPLC yöntemi ile de teyit edilerek izolatların yaklaşık %72'sinin BA üretme yeteneğine sahip olduğu belirlendi. Çalışmanın devamında BA üretimi gösteren izolatlar elenerek, BA üretmeyen izolatlar ile yola devam edildi. BA üretmeyen tüm izolatlar kullanılarak, MCO üretiminden sorumlu *sufI* geninin varlığı tespit edildi ve tüm izolatların yaklaşık %12'sinin *sufI* geni için amplikon gösterdiği belirlendi. Daha sonra HPLC analizi yapıldı ve 9 suşun BA'ları %18 ile %44 oranında degrede edebildiği görüldü. Ek olarak BA'ların degrede edilmesinde pH ve sıcaklığın etkisine bakılarak optimum pH aralığının 4,5-5,5; optimum sıcaklık aralığının ise 32-37°C olduğu belirlendi. Son olarak seçilen 9 suşun moleküler seviyede tanılaması yapıldı ve sırasıyla: A6 kodlu izolatın, % 99,8 oranında *Levilactobacillus brevis*'e, A9 kodlu izoaltın, % 99,8 oranında *Lactiplantibacillus pentosus'a*, A43 kodlu izolatın, % 100 *Lentilactobacillus buchneri*'e, A86 kodlu izolatın, % 100 oranında *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum*'a, A90 kodlu izolatın, % 100 oranında *Pediococcus acidilactici*'e, A121 kodlu izolatın, % 99,9 oranında *Lactiplantibacillus paraplantarum'a*, A134 kodlu izolatın, % 100 oranında *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*'e, A170 kodlu izolatın, % 99,5 oranında *Latilactobacillus curvatus'a* ve A202 kodlu izolatın, % 100 oranında *Streptococcus thermophilus*'a benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Sonuçlar: Elde edilen veriler neticesinde; tanılama işlemi gerçekleştirilen 9 izolatın, BA'ları degrede etme noktasında oldukça önemli olduğu görülmüştür. İzolatların hem gen hem de HPLC analiz sonucunun kantitatif olarak verdiği yüzde hesaplarına bakıldığında, özellikle gıdalarda oluşan ve insan sağlığını tehdit eden BA gruplarını degrede ediyor olması, bu izolatların gıda güvenliği ve kalitesi açısından önemli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterisi, Biyojen amin, Multikopper oksidaz, HPLC

Ocak 2025, 62 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

INVESTIGATION OF THE BIOGENIC AMINE DEGRADING POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM HOMEMADE WHITE CHEESE

Ammar Rafiq Qasem ALMANSOUR

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: Biogenic amines (BAs) are organic compounds found in many foods and beverages, whose production and degradation are controlled by microorganisms. Excessive consumption of BAs adversely affects human health. Therefore, they are isolated from foods to monitor potential health risks, manage potential situations, and ensure nutritional quality according to safety standards. For this purpose, it was aimed to isolate lactic acid bacteria (LAB) from domestic white cheese, which is a very rich source of microflora, to characterize the phenotypic properties of the isolates obtained and to investigate the ability of bacterial isolates to degrade BAs both at the gene level and by HPLC analysis.

Method: Bacteria were isolated from homemade feta cheese samples collected from Erzurum province and its surrounding districts and the LAB of the isolates obtained were determined by phenotypic tests. In order to determine the degradation potential of potential LAB isolates on biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine), firstly, the strains showing BA production ability were identified both at gene level and by HPLC analysis. Then, multiple copper oxidase (MCO) enzyme gene profiles of the remaining isolates were genomically determined and confirmed by HPLC. Finally, the isolates with the desired characteristics were identified molecularly at the species level.

Findings: In the thesis study, 500 bacteria were isolated and as a result of phenotypic characterization, 265 isolates were identified as LAB. Using a molecular approach, PCR screening was performed with primers targeting the genes of enzymes responsible for BA production. As a result of the study, it was determined that approximately 72% of the isolates showed amplicons for hdcA and tdcA genes. Following the molecular screening, the ability of the selected isolates to produce BA was confirmed by the HPLC method and it was determined that approximately 72% of the isolates were capable of producing BA. In the continuation of the study, isolates showing BA production were eliminated and the study was continued with isolates that did not produce BA. Using all isolates that did not produce BA, the presence of the sufI gene responsible for MCO production was determined and it was determined that approximately 12% of all isolates showed amplicon for the sufI gene. HPLC analysis was then performed and 9 strains were found to degrade BAs by 18% to 44%. In addition, the effect of pH and temperature on the degradation of BAs was analyzed. It was determined that the optimum pH range was 4.5-5.5 and the optimum temperature range was 32-37°C. Finally, the 9 selected strains were identified at molecular level and respectively: A6 coded isolate was 99.8% related to *Levilactobacillus brevis*, A9 coded isolate was 99.8% associated with *Lactiplantibacillus pentosus*, A43 coded isolate was 100% related to *Lentilactobacillus buchneri*, A86 coded isolate was 100% related to *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum*, A90 coded isolate, 100% to *Pediococcus acidilactici*, A121 coded isolate, 99.9% to *Lactiplantibacillus paraplantarum*, A134 coded isolate, 100% to *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, A170 coded isolate, 99.5% to *Latilactobacillus curvatus*, and A202 coded isolate, 100% to *Streptococcus thermophilus*.

Results: As a result of the data obtained; it was observed that the 9 isolates identified were very important in terms of degrading BAs. Considering the quantitative percentage calculations of both gene and HPLC analysis results of the isolates, the fact that these isolates degrade BA groups, which occur in foods and threaten human health, shows that these isolates are important in terms of food safety and quality.

Keywords: Lactic acid bacteria, Biogenic amine, Multicopper oxidase, HPLC

January 2025, 62 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
TABLOLAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xi
GİRİŞ 1
KURAMSAL TEMELLER 3
Biyojen Aminler 3
Biyojen Aminlerin Oluşum Mekanizmaları 4
Gıdalarda biyojen aminler 5
Biyojenik Amin Toksisitesi 6
Biyojen Aminlerin Genel Özellikleri 8
Histamin 8
Tiramin 9
Putresin 9
Kadaverin 10
Biyojen Amin Üreten Mikroorganizmalar 10
Üretilen Biyojenik Aminleri Azaltma Stratejileri 11
Ambalajlama 12
Gıda katkı maddeleri ve koruyucu maddelerin uygulanması 12
Yüksek hidrostatik basınç 12
Işınlama 13
Sıcaklık 13
Mikrobiyal modelleme 13
Amin oksidazlar (AO) 14
Diamino oksidazlar (DAO) 14
Bakır içeren amin oksidazlar (CuAO) 15
Flavin içeren monoamin oksidazlar (MAO) 15

Çoklu Bakır Oksidazlar (MCO) 15
Gıdalarda Biyojen Amin Miktarlarının Tayini 16
MATERYAL VE METOT 18
Materyal 18
Tez çalışmasında kullanılan cihazlar 18
Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler 19
Çalışmada kullanılan çözeltiler 19
Çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanması 20
Metot 20
Örnek toplanması 20
Laktik asit bakterilerinin izolasyonu 20
Laktik asit bakteri izolatlarının fenotipik karakterizasyonu 21
Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi 21
Gram boyama 21
KOH testi 21
Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 22
Katalaz testi 22
Oksidaz testi 22
Moleküler ve Biyokimyasal bir Yaklaşım Kullanarak BA Üreten LAB'ların Seçimi 22
Moleküler yaklaşım 22
Biyokimyasal yaklaşım 24
Standart stok çözeltisi ve çalışma çözeltisinin hazırlanması 24
Standartların ve özütlerin türevlendirilmesi 24
İzolatların hazırlanması 24
BA-Degrede edici LAB'nin seçimi 25
HPLC kullanarak BA degrede eden LAB'nin seçimi 25
Farklı koşulların BA'ların bozunması üzerindeki etkisi 25
Seçilen izolatların moleküler yöntemlerle tanılanması 25
İzolasyon aşamaları 26
16S rRNA PCR işlemi ve PCR döngüsü 26
16S rRNA PCR elektroforez işlemi 27
DNA dizi analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik ağaç çizimi 27
Ev yapımı beyaz peynirde bulunan BA'ların konsantrasyonlarının belirlenmesi 28
İstatistiksel analiz 28
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 29

Bakteri İzolasyonu 29
Örneklerin toplanması ve laktik asit bakteri (LAB) izolasyonu 29
Laktik asit bakteri izolatlarının fenotipik karakterizasyonunun belirlenmesi 29
Moleküler yaklaşım (PCR) kullanılarak BA üretmeyen LAB'nin seçimi 30
HPLC kullanarak BA üreten LAB'lerin seçimi 30
LAB'nin BA'ları üretme yeteneği 32
BA-Degrede edici LAB suşlarının seçimi 32
HPLC kullanılarak BA-degrede edici LAB seçimi 33
BA'ların degrede edilmesinde pH ve sıcaklığın etkisi 34
BA'ların degradasyonunda sıcaklığın etkisi 35
16S rRNA sekans analizi ve filogenetik ağaç modeli 37
Ev yapımı beyaz peynirdeki BA konsantrasyonu 38
SONUÇ VE ÖNERİLER 40
KAYNAKÇA 42
ÖZGEÇMİŞ 48

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Prekürsör Amino Asitler ve Biyojen Amin Çeşitleri 5
Tablo 2. Çeşitli Fermente Gıdalarda Tespit Edilen Biyojen Aminler ve Miktarı..... 6
Tablo 3. Gıdalarda Bulunan Aminler ve Bu Aminleri Üreten Mikroorganizmalar..... 11
Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları 18
Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Üretici Firmaları 19
Tablo 6. BA Oluşumu ve Degradasyonunda Yer Alan Genleri Amplifiye Etmek İçin Kullanılan PCR Primerleri ve PCR Koşulları 23
Tablo 7. PCR'ın Hazılanışı ve PCR Döngüsü 27
Tablo 8. HPLC Yöntemiyle BA'ların Doğrusalitesi 31
Tablo 9. Diamin Oksidaz Test Sıvısında 0. saat (kontrol) ve 24. Saat Sonrası BA Konsantrasyonu 34
Tablo 10. BA-degrede Eden LAB Suşlarının 16S rRNA Benzerlik Yüzdeleri ve GenBank Numaraları 37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. BA'ların kimyasal özelliklere göre sınıflandırılması 3
Şekil 2. BA'ların içerdikleri azot sayısına göre sınıflandırılması 4
Şekil 3. Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları 4
Şekil 4. Biyojen aminlerin bağırsaklarda oksidasyon mekanizması ile katabolize edilmesi 8
Şekil 5. Histaminin kimyasal yapısı 8
Şekil 6. Tiraminin kimyasal yapısı 9
Şekil 7. Putresinin kimyasal yapısı 9
Şekil 8. Kadaverinin kimyasal yapısı 10
Şekil 9. Ev yapımı beyaz peynir örneklerinden izole edilen bazı LAB'lerin petri görüntüleri 29
Şekil 10. Histamin ve tiramin üretiminden sorumlu *hdcA* ve *tdcA* genleri için PCR amplifikasyon sonuçları gösterilmiştir. 30
Şekil 11. A) Putrasin için kalibrasyon eğrisi, **B)** Kadaverin için kalibrasyon eğrisi, **C)** Histamin için kalibrasyon eğrisi, **D)** Tiramin için kalibrasyon eğrisi 31
Şekil 12. BA'ların kromatogramı 32
Sekil 13. MCO üretiminden sorumlu *sufI* genleri için PCR amplifikasyon görüntüsü. 33
Şekil 14. LAB suşlarınının 30°C'de ve 24 saat inkübasyondan sonra test edilen BA'ları (histamin, tiramin, kadaverin ve putresin) degrede etme oranları gösterilmiştir. 34
Şekil 15. Mevcut LAB suşlarının, farklı pH değerlerinde BA'ları degrede etme yüzdeleri 35
Şekil 16. Mevcut LAB suşlarının, farklı sıcaklık değerlerinde BA'ları degrede etme yüzdeleri 36
Şekil 17. 16s rRNA gen dizileri temel alınarak oluşturulan LAB suşlarının, birkaç yakın akraba arasındaki ilişkileri gösteren filogenetik ağaç şeması. 38
Şekil 18. Ev yapımı beyaz peynirlerde histamin, tiramin, kadaverin ve putresin konsantrasyonları 39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C : Santigrat Derece

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

AO : Amin Oksidaz

BA : Biyojen Amin

BLAST : Basic Local Alingment Search Tool

$CaCl_2$: Kalsiyum Klorür

CAD : Kadaverin

CE : Kapiler Elektroforezi

CO_2 : Karbondioksit

CuAO : Bakır İçeren Oksidaz

Dansil-Cl : Dansil Klorür

DAO : Diamin Oksidaz

DNA : Deoksiribonükleik Asit

EtBr : Etidyum Bromür

FDA : Gıda ve İlaç Kurumu

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

HCI : Hidroklorik Asit

HİS : Histamin

HNMT : Histamin N-metiltransferaz

HPLC : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

IPTG : Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside

KOH : Potasyum Hidroksit

LAB : Laktik Asit Bakterisi

LB : Lizojeni Suyu

LTQ : Lizin Tirosilkinon

MAO : Monoamin Oksidaz

MAP : Modifiye Atmosfer Paketleme

MCO : Çoklu Bakır Oksidaz

MPa : Megapascal

MRS : De Man-Rogosa-Sharpe

NaCl **:** Sodyum Klorür

NaCl **:** Sodyum Klorür

PAO **:** Poliamino Oksidaz

PUT **:** Putresin

PZR **:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA **:** Ribonükleik Asit

RP-HPLC **:** Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

SPD **:** Spermidin

SPM **:** Spermin

TAE **:** Tris-asetat-EDTA

TLC **:** İnce Tabaka Kromatografisi

TPQ **:** 2,4,5-trihidroksifenilalanin Kinon

TRP **:** Triptamin

TSA **:** Tryptone Soya Agar

TSB **:** Tryptone Soya Broth

TYR **:** Tiramin

UV **:** Ultraviyole

GİRİŞ

Biyojenik aminler (BA), amino asitlerin dekarboksilasyonu yoluyla oluşan düşük molekül ağırlıklı organik bileşiklerdir (Ordóñez *et al.,* 1997; Santos, 1996). BA'lar moleküler yapılarına göre üç grupta sınıflandırılabilir. Tiramin, triptamin ve 2-feniletilamin gibi monoaminler I. sınıf; histamin, kadaverin ve putresin gibi diaminler II. sınıf; spermidin ve spermin gibi poliaminler ise III. sınıfta yer alır (Dapkevicius *et al.* 2000a; J.-I. Lee & Kim, 2013). Gıdalarda en çok bulunan BA'lara örnek olarak; histidin, lizin, tirozin, ornitin, fenilalanin, histamin, kadaverin, tiramin, putresin ve 2-feniletilamin verilebilir (Linares *et al.* 2011).

BA'lar, bitkiler, mikroplar ve hayvanlar tarafından üretilir ve süt ürünleri başta olmak üzere sosis, içecekler ve turşu gibi fermente gıdalarda yaygın olarak bulunur. Gıdalarda, özellikle de peynirlerde yüksek konsantrasyonlarda BA bulunması halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Es'haghi Gorji *et al.* 2014). Özellikle çiğ sütten yapılan peynirler hem doğal starter kültürlere hem de metabolik aktiviteleri tam olarak anlaşılmamış yerli mikroorganizmalara bağımlılıkları nedeni ile teknolojik açıdan zorluklar doğurmaktadır. Ayrıca bu peynirlerde yüksek seviyelerde biyojenik amin vardır ve özellikle tiramin ile histamin en bol bulunan aminlerdendir (Burdychova & Komprda, 2007). BA'ların, peynirlerde ve diğer gıdalarda birikmesi bir halk sağlığı sorunudur (Es'haghi Gorji *et al.* 2014). Apulian ve Sicilya peynirleri üzerinde yapılan araştırmada, peynirlerin %50'sinde en az bir BA bulunduğunu (özellikle histamin ardından tiramin ve putresin) ortaya koymuştur (Guarcello *et al.* 2015). Ek olarak peynir mikroflorası, BA'ların oluşumunda ve parçalanmasında önemli bir role sahip olduğundan son yıllarda süt ürünlerinde bu bileşiklerin birikmesini önleme veya azaltma amacıyla birçok önemli çalışma yapılmıştır (Herrero-Fresno *et al.* 2012; Čuboň *et al.* 2019; Del Rio *et al.* 2024). Süt ürünleri ile ilişkili laktik asit bakterilerine (LAB) örnek olarak *Lactobacillus* ve *Lactococcus* gibi bakteri cinsleri, BA üreticisi olarak katkıda bulunabilir (Flasarová *et al.* 2016).

BA'lar, beyin fonksiyonu, bağışıklık sistemi, vücut ısısı, mide fonksiyonu, mide pH'sı ve hücresel gelişimde önemli bir role sahip olmasına rağmen (Ladero *et al.* 2010) BA miktarı yüksek olan gıdaların aşırı tüketilmesi, gıda zehirlenmesine neden olmaktadır (O'Sullivan, 2015). Örnek olarak histamin, en sık görülen gıda kaynaklı zehirlenmelerden sorumlu BA olduğu bilinsede, bir arabulucu olarak hareket ederek patofizyolojik (iltihap ve alerji gibi) süreçleri düzenler (Gonzaga *et al.* 2009). Gıdalarda en çok bulunan diğer bir BA olan tiramin,

bulantı, migren, baş ağrısı, kusma ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklara neden olurken (Shalaby, 1996); putresin ve kadaverin, BA'ların parçalanmalarından sorumlu enzimleri inhibe ederek diğer aminlerin olumsuz etkilerini artırdığı bilinir (Stratton *et al.* 1991).

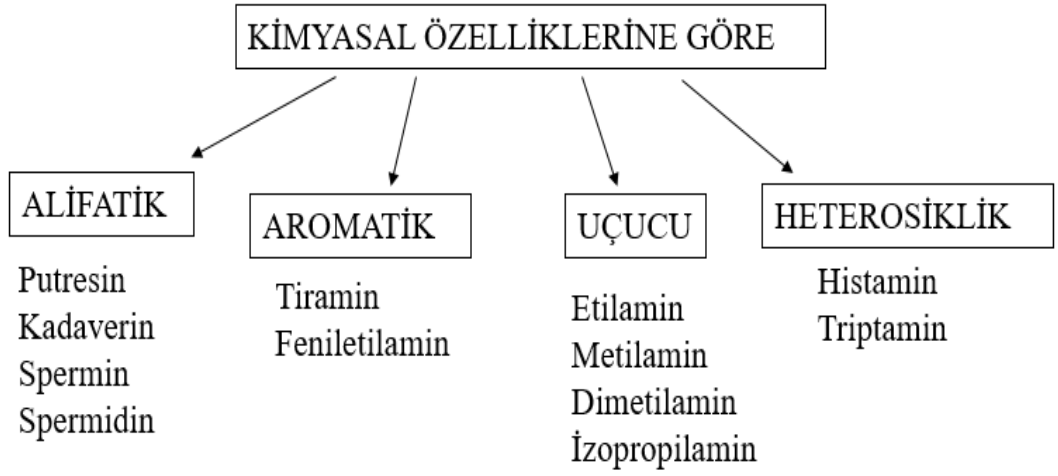
BA'ların toksisitesi, bireysel duyarlılık, gıdada diğer BA'ların varlığı ve genel diyet alımı dahil olmak üzere birçok farklı faktörlere bağlı olan karmaşık bir konudur. Peynirde BA'ların varlığı, bazı Avrupa ülkelerinde düzenleyici limitlere tabidir ve bu da uluslararası ticareti etkilemektedir Ayrıca Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesinin (EFSA) araştırmalarına göre histamin ve tiraminin toksikolojik açıdan en önemli biyojenik aminlerden olduğu rapor edilmiştir ve EFSA, risk değerlendirmesine dayalı olarak fermente gıdalarda BA'ların oluşumunu kontrol etmek için kılavuzlar yayınlamıştır (O'Sullivan *et al.* 2015). BA'lar (tiramin, histamin, kadaverin ve putresin) için önerilen güvenilir limit miktarının, 750-900 mg/kg olduğu bildirilmiştir (Ladero *et al.* 2009).

Türkiye geneline nazaran Erzurum'daki ev yapımı beyaz peynirin hem üretimi hem de tüketimi son zamanlarda artış gösterdiği göz önüne alınaraktan bu tez çalışmasında, LAB yoğunluğunun fazla olduğu bilinen ev yapımı beyaz peynir örnekleri kaynak olarak tercih edilmiş ve seçilen bu kaynaktan bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakteriler, genotipik ve fenotipik tanı yöntemleri kullanılarak karaterize edildikten sonra BA'ların üretimi ve degradasyonunda rol oynayan enzimlerin (dekarboksilazlar ve çoklu bakır oksidazlar) varlığını tespit etmek için hem polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) hem de yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniklerini kullanarak BA degrede eden LAB'nin varlığını araştırılmıştır.

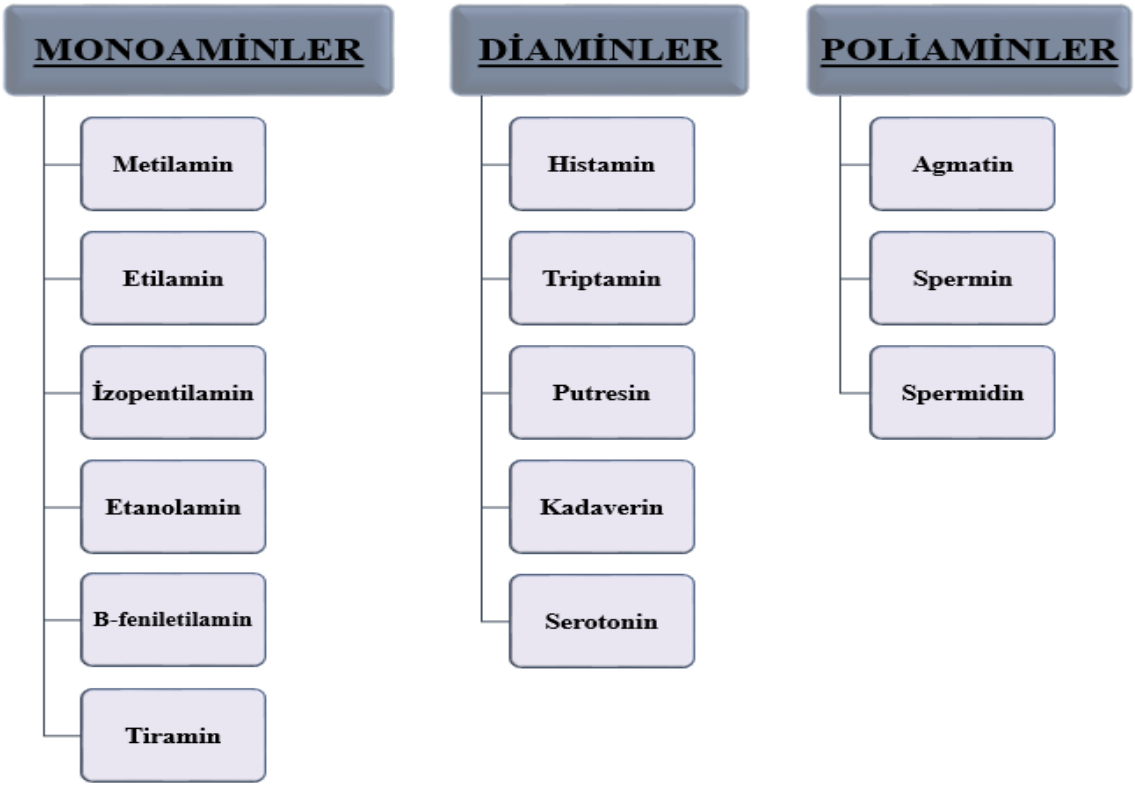
KURAMSAL TEMELLER

Biyojen Aminler

Biyojenik aminler (BA), canlı hücrelerde önemli metabolik aktiviteye sahip moleküllerdir. BA'lar, çeşitli gıdalarda bulunabilen organik bazlar olup fizyolojik poliaminler hariç olmak üzere esas olarak amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonu ile üretilirler (Önal *et al.* 2007; Düz *et al.* 2016). Bu maddelere "biyojen amin" denmesinin nedeni, canlıların yaşam süreçlerinde oluşmalarıdır. Aminoasitlerin belli bir kısmı ayrıldığında bu aminler ortaya çıkar. Bu olaya "dekarboksilasyon" denir ve bu işi yapanlara da "dekarboksilaz" enzimi denir. Proteinler parçalandığında oluşan biyojenik aminler, amino asitlerin farklı şekillerde değişmesi, azotlu maddelerin bir araya gelmesi ve bazı bileşiklerin suyla parçalanması gibi süreçlerle oluşur. BA'lar, içerdikleri azot sayılarına ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılabilir. İçerdikleri azot atomlarının sayısına göre üç ana gruba ayrılır: monoaminler, diaminler ve poliaminler (Düz *et al.* 2016) kimyasal özelliklerine göre ise alifatik, aromatik, uçucu ve heterosiklik olarak sınıflandırılır (Peña-Gallego *et al.* 2012). Kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılması **Şekil 1**'de, içerdikleri azot sayısına göre sınıflandırılması ise **Şekil 2**'de gösterilmiştir.



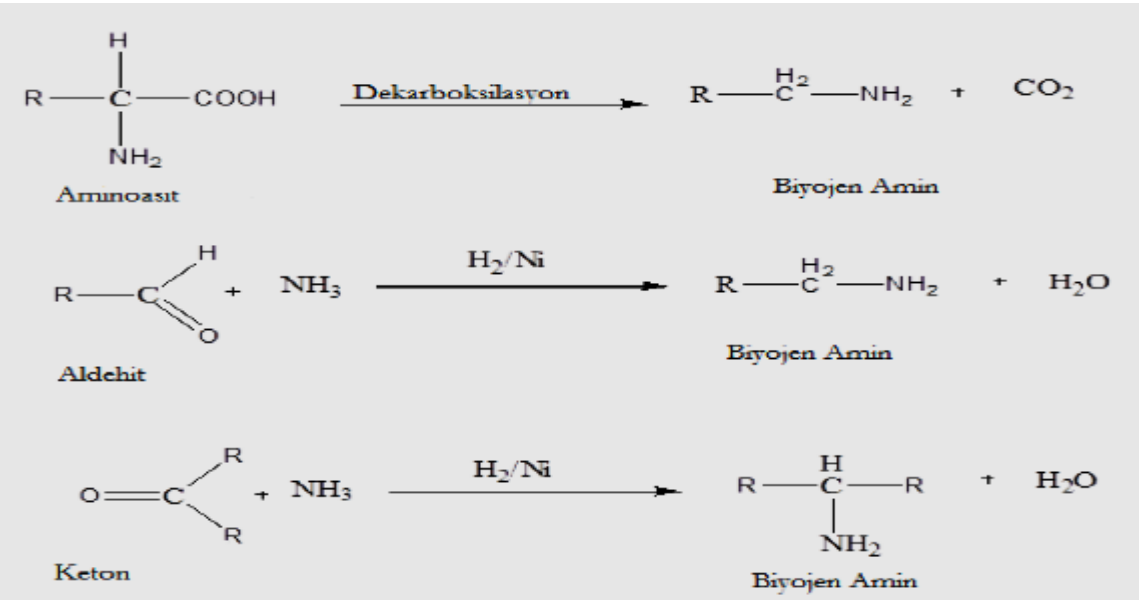
Şekil 1. BA'ların kimyasal özelliklere göre sınıflandırılması (Peña-Gallego *et al.* 2012)



Şekil 2. BA'ların içerdikleri azot sayısına göre sınıflandırılması (Düz *et al.* 2016)

Biyojen Aminlerin Oluşum Mekanizmaları

Biyojen aminlerin oluşumunda en önemli adım, amino asitlerin yapılarının değişerek yeni maddeler oluşturmasıdır. Bu olaya dekarboksilasyon denir (Düz *et al.* 2016). BA'ların oluşumu endojen ve ekzojen olmak üzere iki ana mekanizma ile gerçekleşir (Peña-Gallego *et al.* 2012; Natrella *et al.* 2024). **Şekil 3**'de BA'nın oluşum mekanizmaları kısaca özetlenmiştir.



Şekil 3. Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları (Düz *et al.* 2016)

Endojen mekanizmada; aldehitlerin ve ketonların aminasyonunu ve transaminasyonudur. Dokular tarafından üretilir ve insan vücudunda işlevsel rollere (dopamin, epinefrin, serotonin, melatonin gibi nörotransmitterin düzenlenmesi) sahiptir. Ekzojen mekanizmada; amino asitlerin dekarboksilaz enzimi tarafından dekarboksilasyonudur. Bu durum, vücudumuzdaki veya mikroorganizmalardaki özel enzimler (dekarboksilazlar) sayesinde gerçekleşir (Peña-Gallego *et al.* 2012; Düz *et al.* 2016). Aslında, "biyojenik" niteliği, amino asitlerin α-karboksil grubunu dekarboksile eden canlı organizmalar (bakteriler, küfler ve mayalar) tarafından oluşturulmasıdır. Mikroorganizmaların BA sentezlemesinin nedeni, esas olarak asit stresine yanıt olarak fizyolojik bir amaç doğurması ve matrisin yer aldığı olumsuz ekosistem koşullarında ek bir enerjinin elde edilmesidir. Bundan dolayı gıdalarda mikrobiyal parçalanma sonucu oluşan dekarboksilasyona daha sık rastlanmaktadır (Peña-Gallego *et al.* 2012; Natrella *et al.* 2024). BA moleküllerinin üretimi için belirli ön koşullara ihtiyaç vardır ve bunların başında öncüllerin varlığı gelmektedir (Natrella *et al.* 2024). **Tablo 1**'de, BA'lar ve bu BA'ların prekürsör amino asitleri gösterilmektedir.

Tablo 1. 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

Ancak, öncüller ve ürünleri arasında her zaman doğrudan bir ilişki yoktur çünkü öncüllerin varlığı BA üretimini etkileyen tek faktör değildir. Gıdalardaki BA'ların son konsantrasyonu, gıda işleme koşulları (işleme sıcaklıkları, zaman, ham maddenin kimyasal özellikleri, depolama) ve mikroorganizmalar (BA üreten ve BA tüketen), BA üretimini etkileyen faktörler arasındadır (Natrella *et al.* 2024).

Gıdalarda biyojen aminler

BA'lar azot içeren organik yapılar oldukları için deniz ürünleri, peynir, yumurta, et ve et ürünleri, sosis, fermente sebzeler, salam gibi bazı fermente gıdalara ek olarak şarap, bira ve bazı meyve suları gibi içeceklerde bulunurlar (Önal *et al.* 2007). Özellikle protein açısından

zengin olan peynir ortamı, BA birikimine eğilimlidir çünkü düşük pH ve düşük şeker, mikroorganizmaların metabolizmaları için enerji elde etme, hayatta kalma ve üremeleri için amino asit dekarboksilasyon süreçlerini tetikleyerek optimum mikrobiyal büyüme için ideal bir ortam sağlar (Natrella *et al.* 2024). Yapılan çalışmalarda; tiramin, histamin, kadaverin, putresin, spermin, spermidin, triptamin, agmatin, etilamin ve metilamin gibi BA'ların gıdalarda yaygın olarak bulunduğunu rapor edilmiştir (Munir *et al.* 2020; Wójcik *et al.* 2021; Suzzi *et al.* 2022). Özellikle fermente edilmemiş gıdalarda düşük konsantrasyonlarda endojen kaynaklı olarak bulunabilirken, fermente gıdalarda amino asit dekarboksilaz aktivitesi gösteren kontamine edici mikrofloralardan dolayı yüksek konsantrasyonlarda bulunabilirler. Bu durum, gıdaların protein zenginliğine ve enzim aktivitesine bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Önal *et al.* 2007; Tırıs *et al.* 2023). Gıdalardaki mikrobiyolojik kontaminasyon seviyesinin belirlenmesinde BA'ların miktarı, bir belirteç olarak kabul edilmelidir (Önal *et al.* 2007). Örneğin putresin, histamin ve kadaverin miktarı etin tazeliğini gösterir ve biyojenik amin indeksi (BAI) olarak tanımlanır (Wunderlichová *et al.* 2014). Bundan dolayı gıdalardaki biyojenik amin seviyelerinin izlenmesi önemlidir. Çeşitli fermente gıdalarda bulunan BA'lar ve konsantrasyonları **Tablo 2**'de gösterilmektedir.

Tablo 2. Çeşitli Fermente Gıdalarda Tespit Edilen Biyojen Aminler ve Miktarı (Behera *et al.* 2021, Huang *et al.* 2021, Meng *et al.* 2022; Turna *et al.* 2024).

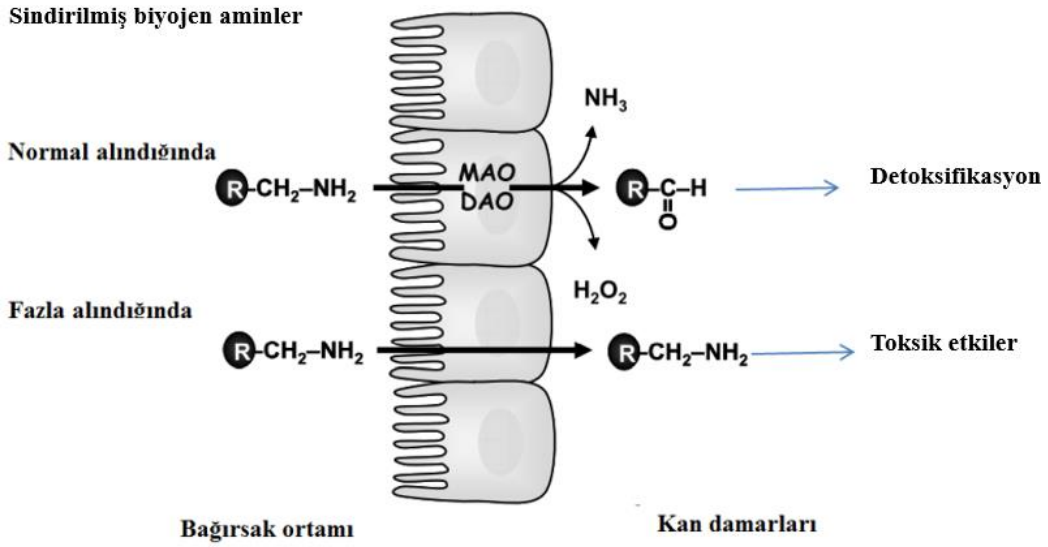
Gıda	Tespit Edilen Biyojen Amin	Tespit Edilen Miktarı
Otlu peynir	Kadaverin	1844,5 mg/kg
Kefir	Kadaverin, spermidin ve putresin	0,3-12,1 mg/L
Salam	Putresin ve tiramin	77,14 mg/kg
Sosis	Putresin, histamin ve kadaverin	689,89 mg/kg
Salam	Agmatin ve spermin	8,3 mg/kg
Şarap	Histamin, tiramin, putresin, 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
Balık ve balık ürünleri	Histamin	100 mg/kg
Karides	Putresin	3mg/kg

Biyojenik Amin Toksisitesi

İnsan sağlığı için hem yararlı hem de zararlı özellikler gösteren çok sayıda metabolit, mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilir. Bunlar arasında, bakteriyel büyüme ve

fermantasyon sırasında üretilen amino asit veya türevleri, insan fizyolojisi ile çeşitli şekillerde etkileşime girerek sağlık üzerinde etki gösterebilir (Natrella *et al.* 2024). Mikrobiyal aktivite sonucu oluşan ve çeşitli patojenik sendromlarda rol oynayan BA'lar, psikoaktif (merkezi sinir sistem üzerinde etkili) veya vasoaktif (damarlar üzerinde etkili) etki mekanizmalarına sahiptir. Psikoaktif aminler, özellikle dopamin, adrenalin ve noradrenalin gibi nörotransmiterlerin üzerinde etkili olurken, tiramin ve histamin gibi vasoaktif aminlerin etkileri ise doğrudan veya dolaylı olarak vasküler sistem üzerinedir (Düz *et al.* 2016).

Biyojen aminler, farklı kimyasal yapıları nedeniyle farklı toksik etkilere sahiptir (Düz *et al.* 2016; Natrella *et al.* 2024). Biyojen aminler arasında histamin, tiramin ve β-feniletilamin en yüksek toksisiteye sahip olanlardır. Bu bileşikleri içeren gıdaların tüketimi, ishal, bulantı, baş ağrısı gibi çeşitli farmakolojik etkilerle sonuçlanabilir. Biyojen aminlerin toksik etkilerinin net bir şekilde sınırlandırılması, gıdanın türü, miktarı ve amin içeriği gibi birçok faktörden dolayı oldukça zordur (Taylor *et al.* 1985; Düz *et al.* 2016). Bununla birlikte 1000 mg amin/kg gıda seviyesi sağlığı için tehlikeli limit olarak kabul edilmektedir (Taylor *et al.* 1985). İnsan vücudundaki BA konsantrasyonu, oksidasyon enzimleri (diamin oksidaz, poliamin oksidaz ve monoamin oksidaz) tarafından düzenlenir. Bu enzimler hem endojen hem de ekzojen kaynaktan gelen BA detoksifikasyonundan sorumludur (Natrella *et al.* 2024). Sağlıklı bireylerin gıda yolu ile aldıkları biyojen aminler, çoğunlukla asetilasyon ile veya monoamino oksidaz (MAO) ve diamino oksidaz (DAO) enzimlerini kullanarak oksidasyon mekanizması ile katabolize olurlar. Poliaminlerin ise genellikle asetillendirildikten sonra diamino oksidaz (DAO) ve poliamino oksidaz (PAO) enzimleri tarafından okside edildikleri belirtilmektedir (Glória, 2005; Rodriguez *et al.* 2014). Biyojen aminler, vücuda çok fazla miktarda alınmadıkları müddetçe insanlarda sağlık riski göstermemektedir. Ancak alerjisi olan bireylerde, biyojen aminleri katabolize eden enzimlerin inhibe olması veya genetik bozukluğun olduğu durumlarda detoksifiye edilemeyip vücutta birikerek toksik etki gösterebildikleri ifade edilmektedir (Akan *et al.* 2018). **Şekil 4**'de biyojen aminlerin bağırsaklarda oksidasyon mekanizması ile katabolize edilmesi gösterilmiştir.

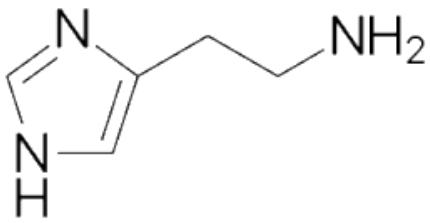


Şekil 4. Biyojen aminlerin bağırsaklarda oksidasyon mekanizması ile katabolize edilmesi (Akan *et al.* 2018)

Biyojen Aminlerin Genel Özellikleri

Histamin

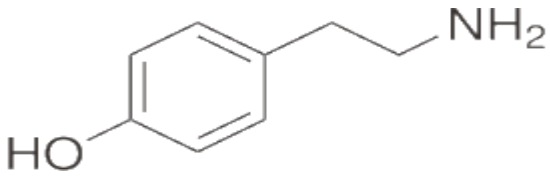
Histamin (HİS), öncü maddesi olan histidin amino asidinin dekarboksilasyonu ile oluşan bir biyojenik amin türüdür. Gıda ürünlerinde özellikle fermantasyon süreçlerinde önemli bir rol oynaması nedeniyle gıda güvenliği açısından dikkat edilmesi gereken bir organik bileşiktir (Natrella *et al.* 2024). Histamin, özellikle fermente gıdalarda bulunabilen toksik özellikleriyle bilinir. Histaminin gıdalarda bulunan en toksik amin olduğu rapor edilmiştir ve skombroid (balık zehirlenmesi) olarak bilinen histamin zehirlenmesi, bilinen en yaygın zehirlenme çeşididir (Durak-Dados *et al.* 2020). Ayrıca histamin, çeşitli alerjik reaksiyonların başlamasında etkili olduğu gibi yüksek histamin birikimi solunum yetmezliğine, terlemeye, çarpıntıya, döküntüye ve hatta yanma hissine yol açabilir (Durak-Dados *et al.* 2020; Natrella *et al.* 2024). Histaminin vücutta oluşturduğu dezavantajların yanında vücut ısısının, mide hacmi ve mide pH'nın, serebral aktivitelerin, nörotransmitterlerin ve inflamasyonun dengelenmesi gibi birçok süreçte olumlu etkisi bulunmaktadır (Natrella *et al.* 2024).



Şekil 5. Histaminin kimyasal yapısı (Durak-Dados *et al.* 2020)

Tiramin

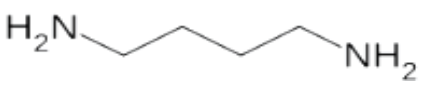
Tiramin (TYR), biyojenik aminler sınıfına ait bir bileşiktir ve amino asitlerin dekarboksilasyonu ile oluşur. Hipertansif (kan damarlarındaki basıncın normal değerlerin üzerinde olduğu durum) etkilere sahip olduğu bilinir ve genellikle olgun peynirler gibi belirli gıdalarda bulunur. Tiramin, vücuttaki sinir sistemini etkileyerek adrenalin ve noradrenalin adı verilen önemli hormonların salınımını artıran bir maddedir ve çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. 125 mg/kg ve üzeri tiramin alımının insan sağlığını olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Fernández *et al.* 2007). Vücuttaki çoğu fonksiyon, sempatik sinir sistemiyle kontrol edildiği için tiramin miktarı yüksek gıda tüketimi durumunda genellikle kan basıncının artmasına, kalp çarpıntısına, baş ağrısına, bazı oksidaz enzimlerinin inhibisyonuna, akciğer ödemine, solunum ve kalp yetmezliğine, tükürük ve salya oluşumuna, kan şekerinin yükselmesine, migrene ve damar daralmasına sebep olmaktadır (Düz *et al.* 2016; Ercan *et al.* 2017). Ayrıca tiraminin, yapısında bulunan amin ve hidroksil grupları nedeniyle güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir (Düz *et al.* 2016).



Şekil 6. Tiraminin kimyasal yapısı (Düz *et al.* 2016)

Putresin

Gıdalarda bulunan ve diğer bir amin türü olan putresin (PUT), gastrointestinal sistemdeki hücre büyümesi, çoğalması ve olgunlaşmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Wunderlichová *et al.* 2014; Del Rio *et al.* 2024). Putresin, çok çeşitli canlı hücrelerde önemli fizyolojik işlevleri yerine getirir ve diğer poliaminlerin (spermin ve spermidin) sentezinde öncüdür (Wunderlichová *et al.* 2014). Putresin biyosentezi istisnai bir durum olup, ardışık reaksiyonlar (dekarboksilasyon ve deiminasyon) ile sentezlenmektedir (Del Rio *et al.* 2024). Araştırmalara göre, putresin'in toksik etkilerinin histamin ve tiraminin toksik etkilerinden daha az etkili olduğu bilinsede, gıdalardan alınan putresin miktarının artması, normal dengenin bozulmasına ve ciddi toksikolojik sonuçlara sebep olacaktır (Wunderlichová *et al.* 2014). Yüksek miktarda putresin alımı düşük kan basıncına, ekstremitelerde kas spazmlarına ve tümör gelişimini uyarabileceği bildirilmiştir. Bundan dolayı putresinin gıdalardaki konsantrasyonu kontrol edilmelidir (Del Rio *et al.* 2024).



Şekil 7. Putresinin kimyasal yapısı (Del Rio *et al.* 2024)

Kadaverin

Kadaverin (CAD), biyojen aminler arasında yer alan bir bileşiktir. Bu bileşik, aminoasitlerin dekarboksilasyonu veya aminasyonu sonucu oluşur ve özellikle bozulmuş gıdalarda sıkça bulunur (Önal *et al.* 2007; Tırıs *et al.* 2023; Natrella *et al.* 2024). Protein açısından önemli bir besin kaynağı olan balık ve balık ürünleri, hasat aşamasından tüketim aşamasına kadar uygun koşullarda tutulmazsa bakteriyel bozunma başlar. Bozunma sonucu kadaverin ve putresin üretimi sürekli bir şekilde artar ve bu artış, balık kalitesi için potansiyel bir indikatör olduğu düşünülmektedir (Düz *et al.* 2016). Kadaverin, bazı gıda maddelerinde bulunmasının yanı sıra, insan vücudunda da nitrozaminlerin (kanserojenik bir madde) oluşumununa ve oksidaz enzimlerini inhibe ederek histamin ve tiraminin toksisitesini artırmasına neden olur (Natrella *et al.* 2024).



Şekil 8. Kadaverinin kimyasal yapısı (Natrella *et al.* 2024)

Biyojen Amin Üreten Mikroorganizmalar

BA'lar, mikroorganizmaların dekarboksilasyon veya deiminasyon yolu ile üretilir. Deiminasyon yolu, putresin biyosentezinde görev alan enzimlerden biridir, ancak BA'ların oluşumu için ana yol, dekarboksilasyon yoludur. Dekarboksilaz, belirli amino asitler üzerinde spesifik olarak etki eden ve karboksil gruplarını çıkararak aminleri ve CO_2'yi oluşturan enzimlerdir (Li *et al.* 2020). Bu mekanizma, ortamdaki serbest amino asitlerin varlığından ve ortamdaki dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip mikroorganizmaların varlığından etkilenmektedir. Dekarboksilaz enzim aktivitesi bakterilerde yaygın olarak görülen bir durum değildir. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* gibi bazı LAB türlerinin, amino asitleri dekarboksile edebildiği gösterilmiştir (Čuboň *et al.* 2019; Luengo & Olivera, 2020). Ayrıca, *Clostridium, Proteus, Aerobacter, Betabacterium, Escherichia, Pseudomonas, Salmonella, Achromobacter* ve *Shigella* gibi bakteri türlerininde biyojen amin üretebildiği rapor edilmiştir (Tailor *et al.* 1994). Birkaç LAB türünün özellikle tiramin üretiminde etkili olduğu ve diğer yandan kadaverin, putresin ve feniletilamin gibi BA'ların *Micrococcaceae* familyasının üyeleri tarafından üretilebildiği tespit edilmiştir (Akyol *et al.* 2015). *Clostridium, Lactobacillus, Escherichia, Salmonella* ve *Bacillus* türlerinin, histidin dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Halász *et al.* 1994). Gıdalarda bulunan biyojen aminler ve bu aminleri üreten mikroorganizmalar **Tablo 3**'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Gıdalarda Bulunan Aminler ve Bu Aminleri Üreten Mikroorganizmalar (Guo *et al.* 2015; Ercan *et al.* 2017)

Gıda	Biyojen amin	Mikroorganizma
Et ve et ürünleri	Kadaverin Putresin Histamin Tiramin	*Pediococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Pseudomonas, Enterobacteriaceae* ve *Micrococcus*
Deniz ürünleri	Kadaverin Putresin Histamin Tiramin Spermin Spermidin	*Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Morganella morganii, Klebsiella pneumonia, Hafnia alvei, Clostridium perfringenes* ve *Enterobacter aerogenes*
Süt ve süt ürünleri	Kadaverin Putresin Histamin Tiramin Triptamin B-feniletilenamin	*Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus buchneri, Lactobacillus plantarum Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus casei, Streptococcus faecium, Streptococcus mitis* ve *Bacillus maceran*
Fermente içecekler	Histamin Tiramin Putresin Kadaverin Feniletilenamin	*Oenococcus, Lactobacillus, Pediococcus* ve *Saccharomyces cerevisiae*

Mikroorganizmaların dekarboksilaz aktivitesini ve BA'ların üretimini, sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu ve starter kültürlerin varlığı etkilemektedir (Doeun *et al.* 2017; Durak-Dados *et al.* 2020). Gıdalarda, 20-37°C sıcaklık ve 5-7 pH aralığında yeterli miktarda amin üretebilen mikroorganizmaların ortamda olması ile amin oluşumunun hızlandığı, ancak tuz oranının %5'ten fazla olması durumunda ise biyojen aminlerin oluşumunun azaldığı görülmüştür (Aygün, 2003).

Üretilen Biyojenik Aminleri Azaltma Stratejileri

Biyojenik amin oluşumu, mikrobiyal büyümenin engellenmesi veya mikroorganizmaların dekarboksilaz aktivitesinin engellenmesi yoluyla kontrol edilebilir. Günümüzde fermente gıdalarda (peynir, sosis, balık ürünleri, şaraplar) çok sayıda amin parçalayan mikroorganizma bulunmuştur ve bu mikroorganizmalar, BA içeriklerini kontrol etmek için çeşitli gıdalara da uygulanmıştır (Naila *et al.* 2010; Li & Lu, 2020). Gıdalarda biyojenik amin oluşumunu;

- Sıcaklık kontrolü

- Yüksek kaliteli hammadde kullanımı
- İyi üretim uygulamaları
- Fermantasyon için nonamin oluşturan (amin-negatif) veya amin oksitleyen starter kültürlerin kullanımı
- Aminleri okside etmek için çeşitli enzimlerin kullanımı
- Biyojenik amin oluşumunu geciktirmek için uygun koşulları değerlendirmek amacıyla mikrobiyal modellemenin kullanımı
- Yüksek Basınçlı işlem (HPP)
- Işınlama
- Gıda katkı maddeleri kullanımı

gibi bir çok farklı yöntem ile engellenebilir (Naila *et al.* 2010).

Ambalajlama

Paketleme yoluyla koruma genellikle ürünü çevreleyen ortamın gaz karışımını değiştirmeyi içermektedir. Bu yöntem, mikroorganizmaların veya biyojenik amin üreten enzimlerin inhibisyonuna neden olur ve bu sayede biyojenik aminlerin üretimini geciktirir (Naila *et al.* 2010). Ambalajlama işleminde kullanılan karbondioksit (CO_2), histamin BA'ini üretme yeteneğine sahip bakterilerin büyümesini engelleyerek gıda raf ömrünü uzatmada önemli bir rol oynar. Modifiye atmosfer paketlemede (MAP) bulunan %75-100 CO_2'nin filetolardaki BA içeriğini önemli ölçüde azaltabileceği bildirilmiştir (Li & Lu, 2020). Ayrıca, 4 °C'de saklanan vakumlu paketlerin, vakumlu olmayan ve hava korumalı paketlere göre daha düşük BA içeriği göstermiştir (Naila *et al.* 2010).

Gıda katkı maddeleri ve koruyucu maddelerin uygulanması

Katkı maddeleri ve koruyu maddelerin kullanımı, gıdalarda BA oluşumunu engelleyebileceği bildirilmiştir ve yapılan bir çalışmada 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 (Shalaby *et al.* 1996).

Yüksek hidrostatik basınç

HPP, mikroorganizmaların hücre zarlarına zarar vererek inaktivasyona veya öldürücü olmayan yaralanmaya yol açan termal olmayan bir koruma yöntemidir. Ayrıca gıda ürünlerindeki bozulmayı önlemek ve patojenik bakterileri öldürmek için, ≥ 300 MPa basınç kullanılarak yapılır (Naila *et al.* 2010). Bu işlem, besin değerlerini korur ve depolama

ömürlerini uzatır. Özellikle aromalı bileşikleri etkilemez ve bu da onu ısıya duyarlı gıdaların işlenmesi için uygun hale getirir. Ruiz-Capillas ve ark'nın çalışmalarında, paketlenmiş sosislerde putresin, kadaverin ve tiramin oluşumunun, vakum ve hidrostatik basınç işlemleriyle önemli ölçüde azaltabildiğini bildirmiştir (Ruiz-Capillas *et al.* 2019). Huang ve ark'nın yaptığı çalışmada ise >250 MPa'da sarı yüzgeçli orkinos etindeki histaminin oluşumunu geciktirmeyi başarmışlardır (Huang *et al.* 2022).

Işınlama

1950'lerde ortaya çıkan ışınlanma, gıdaların raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadır. Işınlama, gıdaların güvenliğini sağlamak ve kimyasal koruyucuların kullanımını azaltmak için kullanılır (Naila *et al.* 2010). Gıda işlemede BA'ı azaltmak için birkaç ışınlama uygulaması mevcut olup biyojenik amin üretiminden sorumlu bakteri sayısını azaltarak gıdalardaki biyojenik amin oluşumunu kontrol etmektedir (Li & Lu, 2020). Dokuz çeşit biyojen amin kullanılarak yapılan bir çalışmada örneklerin her biri gama ışınına maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonucunda BA'ların %95'inden fazlasını bozduğu rapor edilmiştir (Kim *et al.* 2004).

Işınlanmış sosislerdeki BA seviyelerinin ışınlanmamış sosislere kıyasla daha düşük olduğu ve ışınlanmış olgun sosislerdeki BA seviyelerinin düştüğü bildirilmiştir. Ayrıca, ışınlama ile tedavi edilen tavuk, sığır eti ve domuz eti, tedavi edilmeyen kontrole kıyasla BA içeriklerinde önemli ölçüde azalma göstermiştir (Li & Lu, 2020).

Sıcaklık

Gıda işleme ve depolama sıcaklıkları, BA oluşumunu önlemek veya inhibe etmek için önemli bir stratejidir (Naila *et al.* 2010). Kore pirinç şarabı kullanılarak yapılan bir çalışmada, depolama sıcaklığının hem BA içeriğini hemde mikroflora içeriğini nasıl etkilediği araştırılmıştır. 4°C'de, sadece putresinin az miktarda bulunduğu ve mikrofloranın sabit kaldığı; 20°C'de ise birkaç BA'in tespit edildiği ve mikrofloranın arttığı gözlemlenmiştir (Kim *et al.* 2011). Balıklarda histamin birikimini önlemede işleme ve depolama sıcaklığının 4,4°C veya daha düşük bir sıcaklıkta olması, FDA (Food and Drug Administration) tarafından önerilmiştir (Li & Lu, 2020).

Mikrobiyal modelleme

Mikrobiyal modelleme, mikroorganizmaların büyümesini ve inaktivasyonunu incelemek için kullanılır (Li & Lu, 2020). Sıcaklık, zaman ve pH biyojenik amin üretimini etkilemektedir ve bu faktörler, belirli gıdalardaki belirli mikrobiyal türler için modellenebilir. Bu tür modeller, amin üretimini sınırlamak için koşulların tasarlanmasına yardımcı olabilir.

Ancak bu yöntemin dezavantajı, halihazırda bilinen veya henüz bulunamayan birçok bakteri türünün biyojenik amin üretiyor olmasıdır. Bundan dolayı tüm bu türleri hesaba katan genel bir modelleme karmaşık ve zaman alıcı olacaktır (Naila *et al.* 2010). Mevcut modeller arasında olan Emborg ve ark'nın yaptığı çalışmada, balıklarda histamin oluşturan *Mycobacterium psychrotolerans* ve *Morganella morganii* bakterilerin büyümesi matematiksel bir model geliştirilerek engellenmiştir.

Amin oksidazlar (AO)

Amin oksidazlar hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunur. Bu organizmalarda oksidatif deaminasyon sürecinde ve vücudun homeostazisinde hayati bir rol oynamaktadır (Li & Lu, 2020). Fermente ve proteince zengin gıdalarda BA oluşumu gözlemlenmiştir ve bu mekanizmada temel olarak olarak, amin pozitif ve amin indirgeyici mikroorganizmalar hakimdir. Özellikle fermente gıdalarda (peynir, sosis, şarap) çok sayıda amin parçalayıcı mikroorganizma bulunmaktadır. Araştırmacılar mikrobiyal amin parçalayıcı aktivitenin, amin oksidaz (AO) ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir (Naila *et al.* 2010). AO'lar, BA'ı amonyak ve aldehite indirgeyebilen bir oksidatif deaminazlardır. AO'lar, flavin içeren monoamin oksidazlar (MAO, EC. 1.4.3.4), bakır içeren oksidazlar (CuAO) ve diamin oksidazların (DAO, EC. 1.4.3.4) dahil olduğu bir oksidoredüktaz sınıfına aittir. AO'lar, hücre duvarında doğal olarak bir antitoksidan olarak görev yaparlar ve 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. Ayrıca BA zehirlenmesinin ana nedenlerinden biri de insan vücudunda büyük miktarda BA birikmesine neden olan AO aktivitesinin inhibisyonudur (Floris & Agro, 2013; Li & Lu, 2020).

Diamino oksidazlar (DAO)

DAO, prokaryotlarda ve ökaryotlarda (bakteri, mantar, bitki ve hayvan) bulunan yaygın enzimlerdir. DAO'ların fizyolojik rolü çok yönlüdür. Çünkü bu sınıf, farklı lokalizasyonlara ve substratlara sahip çeşitli enzimleri içermektedir. DAO'ların memelilerdeki işlevi çok çeşitli ve belirsizdir. Hatta bazen zıt olan çok sayıda fizyolojik işlev tanımlanmıştır. DAO'lar esas olarak putresin ve kadaverin gibi kısa alifatik diaminler üzerinde aktiftir. Ayrıca DAO'lar, diaminlerin ve poliaminlerin vücuda girmesini önlemede bir bariyer görevi görmektedir. Dahası bu enzimler, alerji, peptik ülser ve anafilaktik reaksiyonlar gibi çeşitli patolojik durumlara neden olabilen endojenik histaminide uzak tutabilmektedir (Floris & Agro, 2013).

Bakır içeren amin oksidazlar (CuAO)

Bakır içeren amin oksidazlar (CuAO), aminleri aldehitlere oksitleyen ve 2 tür kofaktör (2,4,5-trihidroksifenilalanin kinon (TPQ) ve lizin tirosilkinon (LTQ)) içeren enzimlerdir. CuAO'lar, maya, bakteri, mantar, hayvan ve bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. CuAO'ların aminlerin parçalanmasına yönelik aktiviteleri uzun yıllardır araştırılmaktadır. CuAO'lar, *Escherichia coli*, *Arthrobacter globiformis*, *Hansenula polymorpha* ve *Pichia pastoris* gibi birçok mikroorganizmada bulunmuştur (Li & Lu, 2020). Yapılan bir çalışmada, *Arthrobacter aurescens* TC-1'den izole edilen ve *Escherichia coli*'de eksprese edilen CuAO'ların, tiramin ve histamine karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Nagakubo *et al.* 2019)

Flavin içeren monoamin oksidazlar (MAO)

Mitokondrial monoamin oksidaz (EC 1.4.3.4, MAO) flavin içeren, mitokondri zarının dışında bulunan ve nörotransmitter aminlerin oksidasyonunu katalizleyen bir enzimdir (De Colibus *et al.* 2005). MAO, elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanırlar. Bazı mikroorganizmalarda bulunan MAO, oksijeni eş zamanlı olarak indirgeyerek BA'da dahil olmak üzere çeşitli biyomolekülleri oksitleyebilmektedir (Li & Lu, 2020). Bu aminler metabolizmada canlılık, sıcaklık düzeni, yeme davranışları, saldırganlık, cinsellik, uyku ve hipofizin düzenlenmesi gibi temel işlevlere etki ederler (De Colibus *et al.* 2005). Ayrıca MAO'nun yapısal genleri araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Li & Lu, 2020).

Çoklu Bakır Oksidazlar (MCO)

Çoklu bakır oksidaz (MCO), çok çeşitli fenolik ve fenolik olmayan aromatik bileşikleri oksitleyen ve aynı zamanda dioksijenin suya indirgenmesiyle çalışan bir enzim grubudur (Ni *et al.* 2022). MCO enzimi, birçok substratı okside etme, hücre dışı eksprese özelliği, yüksek stabilite, geniş pH ve sıcaklık aralığı ile yüksek potansiyel uygulama fırsatı sunmaktadır. Lakkaz benzeri bir enzim olarak karakterize edilen MCO, esas olarak yeni bileşiklerin sentetik reaksiyonlarında bir biyokatalizör olarak görev almaktadır. MCO enzimi, zararsız katalitik ürünler oluşturması nedeni ile kağıt, biyoyakıt ve gıda endüstrileri gibi yaşamın birçok alanında kullanılmaktadır. MCO'lar doğada yaygın olarak bulunmasına rağmen, bakterilerde MCO'larla ilgili çalışmalar hala sınırlıdır. Ayrıca bakteriyel MCO'lar, daha geniş substrat çeşidine ve pH sıkalasına sahip olup protein mühendisliği çalışmaları ile geliştirilebilirler. Bakterilere nazaran fungal MCO'lar ise prokaryotik konaklarda aktif formda ifade edilmeleri zordur ve mevcut pazar gereksinimlerini karşılayamazalar. Ek olarak bakteriyel MCO'lar, transkripsiyon sonrası

modifikasyonlar gerektirmezler ve prokaryotik konakçılarda çözünür formda ifade edilebilirler (Li & Lu, 2020).

MCO'ların bakterilerdeki spesifik rolleri tam olarak anlaşılamamıştır (Sharma *et al.* 2007; Kudanga *et al.* 2009). Ancak, MCO'ların BA'ların bozulmasına katkıda bulunması mümkündür (Callejón *et al.* 2014; Grembecka, 2015). Fermente gıdalarda bulunan ve BA'ları parçalayabilen MCO'lar, bazı laktik asit bakterilerinde (LAB) karakterize edilmiştir (Ni *et al.* 2022). Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus curvatus* G-1 genomunda MCO'nun olduğu doğrulanmıştır ve bu enzimin histamin, tiramin ve putresin dahil olmak üzere altı yaygın BA'nın bozunmasında yetenek gösterdiği bildirilmiştir (Li *et al.* 2018). *Lactobacillus plantarum* J16'dan elde edilen MCO'nun ise tiramin, histamin ve putresini parçalayabildiği rapor edilmiştir (Callejón *et al.* 2014).

Gıdalarda Biyojen Amin Miktarlarının Tayini

Gıdalarda bulunan aminlerin belirlenmesinin nedeni, potansiyel toksisiteleri ve gıda kalite belirteçleri olarak kullanılmalarıdır (Givanoudi *et al.* 2023). Biyojenik aminlerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi, çoğunlukla kromatografik tekniklere dayanmaktadır. Bu teknikler arasında;

- ✓ İnce tabaka kromatografisi (TLC)
- ✓ Gaz kromatografisi (GC)
- ✓ Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC)
- ✓ İyon kromatografisi
- ✓ Kapiler elektroforezi (CE)

verilebilir. Kromatografik teknikler, biyojen aminlerin katı veya sulu matrislerinden çıkarılması için kapsamlı numune hazırlama (katı faz ekstraksiyonu, matris katı faz dispersiyonu ve biyojenik aminlerin kolon bazlı ayrılması dahildir) gerektirir (Önal, 2007; Givanoudi *et al.* 2023). Ayrıca BA'ları ölçmek için analitik yöntem seçerken, analit konsantrasyon aralığı, numune hacmi ve analit matrisinin fizikokimyasal özellikleri gibi belirteçler göz önünde bulundurulmalıdır.

HPLC tekniği, BA'ları tespit etmede hassas ve güvenilir bir yöntem olduğu düşünülmektedir (Stojanović & Kos, 2020). HPLC yöntemi, balık ürünlerinin gıda güvenliği kriterlerine uygunluğunun rutin olarak test edilmesinde kullanılmaktadır (Sanz-Vicente *et al.* 2023). BA'ların kromatografik yöntemlerle tespiti, kolon öncesi veya sonrası türevlendirmeyi ve karşılık gelen türevlerin floresan veya UV (ultraviyole) ışıkla tespit edilmesi gerekmektedir (Mohedano *et al.* 2015). Gıdadaki BA'ları tespit etmek için kullanılan reaktifler arasında dansil

klorür (Dansil-Cl), 4-kloro-3,5-dinitrobenzotriflorür (CNBF), dabsil klorür, o-ftaldialdehit (OPA), 6-aminokinolil-N-hidroksisüksinimidil karbamat (AQC), ve benzoil klorür kullanılmaktadır (Restuccia *et al.* 2018; Han *et al.* 2022). Özellikle dansil-Cl, kolon öncesi türevlendirme için en yaygın kullanılan reaktiftir. OPA ise genellikle kolon sonrası türevlendirme için kullanılmaktadır (Pernica *et al.* 2015).

MATERYAL VE METOT

Materyal

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Tablo 4. 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 5. 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
$ZnSO_4$	Sigma
$CoCl_2$	Sigma
$MgSO_4$	Sigma
$NiCl_2$	Sigma
Histamin (Cas no:51-45-6)	Sigma
Tiramin (Cas no:51-67-2)	Sigma
Kadaverin (Cas no:462-94-2)	Sigma
Putresin (Cas no:110-60-1)	Sigma
Dansil klorür (Dansil-Cl)	Sigma
Deoksinükleotid Trifosfat (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
Sodyum asetat	Sigma
n-Heptan	Sigma
Kloroform	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.

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

Çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanması

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.

M17 Agar: 55 g M17 agar tartma işlemi sonrası 1000 mL'lik saf su içerisinde çözdürülerek otoklavlanma işleminden geçirildi.

M17 Broth: 42.5 g M17 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 yirmi adet ev yapımı beyaz peynir örnekleri, Erzurum ili ve çevre illerden (Tortum ilçesi; 40.294645 enlem ve 41.549948 boylam, Hınıs ilçesi; 39.3567 enlem ve 41.7031 boylam, Aşkale ilçesi; 39.9202 enlem ve 40.6947 boylam, Horasan ilçesi; 40.0397 enlem ve 42.1711 boylam) toplandı. Çalışmada kullanılan örnekler aseptik koşullar altında laboratuvar ortamına getirildi ve analiz edilinceye kadar -20°C'de saklandı (Adıgüzel, 2008).

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu

Her bir örnekten 10 g alınarak, 90 mL'lik steril fizyolojik su (0.85% NaCl) içerisinde homojen hale getirilmiştir. Homojen hale getirilen sıvıdan, 0.1 mL'lik seyreltmeler alınarak MRS ve M17 agarına yayılmıştır. MRS agarda gelişen bakteriler 37°C'ye, M17 agarda gelişen

bakteriler ise 30°C'ye konulup 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Abosereh *et al.* 2015). Hücre ve koloni morfolojisi açısından farklı olduğu düşünülen her bir izolat alınarak MRS ve M17 agarlara çizgi ekimleri yapılmıştır. Ekimleri yapılan örnekler gelişim gösterdikleri sıcaklıklarda (30°C ve 37°C) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gelişen bakterilerin uzun süreli korunması için, 2-3 öze dolusu mikroorganizma alınarak %15'lik gliserol ile takviye edilmiş MRS ve M17 brot sıvı besiyerine konulmuştur. Son olarak stok kültürler kullanılıncaya kadar –86 °C'de muhafaza edilmiştir (Adıgüzel, 2008; Abosereh *et al.* 2015).

Laktik asit bakteri izolatlarının fenotipik karakterizasyonu

İzolasyon aşamasında elde edilen tüm izolatların LAB olup olmadığını belirlemek için 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, oksidaz ve katalaz enzim varlıklarına bakılmıştır**.**

Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Gram boyama

Bakteri kültürü, steril bir öze ile alınarak bir lam üzerine yayılıp 1 dakika boyunca kristal viyole ile muamele edilir. Kristal viyole ile muamelede hem Gram pozitif hemde Gram negatif bakteriler, mor renk oluştururlar. Ardından preparattaki fazla boya, distile su ile uzaklaştırılır ve preparatın fiksasyonu için lugol eklenerek 1 dakika boyunca inkübe edilir. Daha sonra preparat, %96'lık etanol ile yıkanır. Bu esnada Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakası kalın olduğundan dolayı, mor rengini korurken; Gram negatif bakterilerin ise dış zarı ince peptidoglikandan oluştuğu için bozulur. Son olarak safranin ile 20 saniye muamele edilir ve bu işlemin ardından yıkama yapılarak preparatlar kurumaya bırakılır. Mikroskop altında mor renkli olan hücrelerin Gram pozitif, pembe-kırmızı renkli hücrelerin ise Gram negatif bakteriler olduğu değerlendirilmektedir (Adıgüzel, 2008).

KOH testi

İzolatların Gram özelliklerini doğrulamak için ek olarak KOH testi yapılmıştır. Bakteriler %3'lük KOH ile muamele edilmiştir. Gram negatif bakterilerin duvarları ince olduğu için çekirdek ve sitoplazma bu işlem sırasında dışarı çıkmakta ve sümüksü bir yapı oluşturmaktadır. Ancak Gram pozitif bakterilerin hücre yapılarını bozamadığı için böyle bir oluşum gözlenemez. KOH testi için, M17 ve MRS'de büyütülen 1-2 günlük kültürlerden bir öze bakteri örneği alınarak, KOH solüsyonu ile 5 ve 8 saniye arasında muamele edilir. Öze

preparat üstüne hareket ettirilip, Gram pozitif bakterilerin herhangi birinde uzama oluşmadığı gözlenirken, Gram negatif bakterilerde ise uzayan bir yapının oluştuğu gözlenmiştir (Baltaci, 2016).

Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Katalaz testi

Test için, canlandırılan suşlardan 1 öze dolusu alınarak, %5'lik H_2O_2 damlatılan lam üzerine yerleştirilir ve yavaşça karıştırılır. Ardından kabarcık oluşturan bakteriler katalaz enzimi yönünden pozitif olurken oluşturmayan bakteriler ise, katalaz enzimi yönünden negatif kabul edilmiştir (Choi *et al.* 2011).

Oksidaz testi

Oksidaz testi ile bakterilerdeki elektron taşınmasında görev alan sitokrom c proteininin, taşıyıp taşımadığı kontrol edilmektedir. Sitokrom c proteini, mitokondride bulunan ve solunumla ilgili bir transmembran proteinidir (Arslan, 2017). Oksidaz testi için Kovács reaktifi kullanılmıştır ve bunun için kitte bulunan diskin üzerine su damlatılarak diskin yüzeyine bir miktar bakteri alınmıştır. Oksidaz pozitif bakterilerde mavi ve mor renk oluşumu gözlenirken, negatif bakterilerde herhangi bir renk oluşumu gözlenmemiştir (Choi *et al.* 2011).

Moleküler ve Biyokimyasal bir Yaklaşım Kullanarak BA Üreten LAB'ların Seçimi

Moleküler yaklaşım

PCR işlemi ile var olan LAB'daki BA'ların (histamin, kadaverin, tiramin ve putresin) oluşumundan sorumlu genlerin (sırasıyla *hdcA*, *cadA*, *tdcA* ve *odc*) varlığını tespit etmek için kullanılmıştır. *Lb. plantarum* ATCC 14917 ve *Enterococcus faecium* DSM20477 bakterileri, sırasıyla *hdcA* ve *tdcA* genleri için pozitif kontrol olarak kullanılırken, *Lb. paracasei subsp. tolerans* LMG9191 bakterisi için, *odc* ve *cadA* genleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Her hedef gen için PCR primerleri, (Macrogen Şirketi; Hollanda) tedarik edilmiş ve PCR için ortam koşulları ve beklenen amplikon boyutları **Tablo 6**'da gösterilmiştir.

Tablo 6. BA Oluşumu ve Degradasyonunda Yer Alan Genleri Amplifiye Etmek İçin Kullanılan PCR Primerleri ve PCR Koşulları

Enzim	Hedef gen	Primer adı	Sekans dizisi (5'-3')	Referanslar	Amplifikasyon boyu	Amplifikasyon programı
Histidin dekarboksilaz	*hdcA*	hdc1 hdc2	TTGACCGTATCTCAGTGAGTCCATACGGTCATACGAAACAATACCATC	(Fernández *et al.* 2006)	174	95°C'de 2 dk; 35 döngü olacak şekilde 95°C'de 35 sn, 52°C'de 40 sn ve 72°C'de 30sn;72°C'de 5 dk
Lizin dekarboksilaz	*cadA*	CadAf CadAr	GCTGGGTTCACTGCTGGATGGCGTAATGTAGCTCATCA	(De Filippis *et al.* 2013)	220	95°C'de 2 dk; 35 döngü olacak şekilde 95°C'de 35 sn, 54°C'de 30 sn ve 72°C'de 30sn;72°C'de 5 dk
Lizin dekarboksilaz	*ldc*	Cad2f Cad2r	CAYRTNCCNGGNCAYAAGGDATNCCNGGNGGRTA	(Landete *et al.* 2007)	1185	95°C'de 2 dk; 35 döngü olacak şekilde 95°C'de 35 sn, 52°C'de 30 sn ve 72°C'de 60sn;72°C'de 5 dk
Tirozin dekarboksilaz	*tdcA*	TDC1 TDC2	AACTATCGTATGGATATCAACGTAGTCAACCATATTGAAATCTGG	(Fernández *et al.* 2004)	700	95°C'de 2 dk; 35 döngü olacak şekilde 95°C'de 30 sn, 50°C'de 35 sn ve 72°C'de 60sn;72°C'de 5 dk
Ornitin dekarboksilaz	*odc*	ODC1 ODC2	NCAYAARCAACAAGYNGGGRTANGGNTNNGCACCTTC	(Coton *et al.* 2010)	830	95°C'de 2 dk; 35 döngü olacak şekilde 95°C'de 35 sn, 54°C'de 45 sn ve 72°C'de 60sn;72°C'de 5 dk
Çoklu Bakır oksidaz	*sufI*	BC3f BC3r	GAGGCTGGGGAAACGCAACTCTTGGCAATGGCAGGCTGGC	(Guarcello *et al.* 2015)	380	95°C'de 2 dk; 35 döngü olacak şekilde 95°C'de 35 sn, 58°C'de 45 sn ve 72°C'de 60sn;72°C'de 5 dk

Biyokimyasal yaklaşım

HPLC sistemi ve kromatografik koşullar

Yöntem geliştirme ve doğrulama çalışmaları, 1260 serisi Agilent HPLC ekipmanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kromatografik sistemin ekipmanına bir UV dedektörü (G71144A), otomatik enjektör (G7129A) ve dörtlü pompa (G7111A) dahil edilmiştir. Ayrıştırmalar, 25 °C'de gerçekleştirilen Ace C18 (250×4.60 mm ID, 5µm) analitik kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Standart ve örnekler, 25:75 (v/v) oranında 50 mM asetat tampon çözeltisi (pH 5) ve asetonitrilden oluşan mobil faz ile bir kademeli izokratik elüsyon kullanılarak elüe edilmiştir. Akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlanmıştır ve örnek enjeksiyonun hacmi 10 µL olup, tespiti 254 nm'de gerçekleştirilmiştir (Gezginc *et al.* 2013).

Standart stok çözeltisi ve çalışma çözeltisinin hazırlanması

Histamin, tiramin, kadaverin ve putresin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, ABD) gibi tüm standart kimyasallar analitik dereceye sahiptir. BA'lerin bireysel standart stok çözeltileri metanol içinde 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltilerini metanolde 1 mL'ye son hacme kadar seyreltmek suretiyle 0.1 ila 100 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Standartların ve özütlerin türevlendirilmesi

BA'nin türevlendirilmesi dansil klorür ile gerçekleştirilmiştir. Yukarıda tarif edildiği gibi hazırlanan ekstrakt veya standart çözeltinin 0,1 mL'lik bir kısmı 0,25 mL 10 mM dansil klorür ile karıştırılmıştır. Daha sonra 0,65 mL borat tamponu (pH 9.5) eklenmiştir. Karışım, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant 0,2 µm gözenekli filtreler (Millipore Co., Bedford, MA, ABD) kullanılarak süzüldü. Elde edilen nihai konsantrasyonlar, 0.01, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 µg/mL'dir. Ayrıca, standart çözeltiden 0.15, 4.0 ve 8.0 µg/mL konsantrasyonlarında üç kalite kontrol numunesi hazırlanmış ve filtrelenen süpernatant HPLC ile analiz edilene kadar 4°C'de tutulmuştur.

İzolatların hazırlanması

LAB suşları MRS broth içinde 37°C'de ve M17 broth içinde 30°C'de 24, 48 ve 72 saat kültüre edilmiştir. LAB suşlarını içeren MRS ve M17 kültürler alınarak 10 mL'lik kaplara aktarılmıştır. Ardından üzerlerine %6'lık 4 mL trikloroasetik asit eklenmiştir. Hücreler daha sonra 10 dakika, 3000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süzülmüştür. Son olarak her bir bakteriyel süpernatanttan 5 mL toplanarak HPLC analizine hazır hale getirilmiştir (Gezginc *et al.* 2013).

BA-Degrede edici LAB'nin seçimi

Çoklu bakır oksidaz'ların (MCO'ların) tespiti

MCO'lar, hem fenolik hem de fenolik olmayan maddeler dahil olmak üzere çeşitli aromatik bileşikleri oksitleyebilen enzimlerdir. Bu süreçte dioksijeni suya indirgerler. Bazı LAB'nin fermente gıdalarda BA'ları degrede edebilen MCO'lar ürettiği bulunmuştur (Komori & Higuchi, 2015; L. Li *et al.* 2018). Bu nedenle **Tablo 1'de** BA üretmediği varsayılan LAB suşlarının, MCO'ların üretiminden sorumlu *sufI* geninin varlığını tespit etmek için PCR kullanılmıştır. Ek olarak yine **Tablo 1'de,** MCO primerini (Macrogen Company; Hollanda), ortam koşullarını ve hedeflenen gen için beklenen amplifikasyon boyutunu göstermektedir.

HPLC kullanarak BA degrede eden LAB'nin seçimi

MCO için pozitif varsayılan LAB suşları, 5 g/L NaCl, 3 g/L tripton, 3 g/L maya ekstraktı, 1 g/L glukoz, 1 g/L Tween- 80, 0.25 g/L $\cdot 7H_2O$, 0.038 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.08 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ve her hedeflenen BA'nın, 0.01 g/L'sini (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, ABD) içeren, pH 6 olan diamin oksidaz besiyeri (DOA) kullanarak bir model sistem oluşturulmuştur (Dapkevicius *et al.* 2000). Bu model sistem ile LAB suşlarının, BA'ları (histamin, tiramin, kadaverin ve putresin) degrede etme yetenekleri açısından değerlendirilmiştir. Örnekler 0. saat (kontrol) ve 24. saatte, 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından BA'ların degradasyonu, HPLC analizi ile doğrulanmıştır.

Farklı koşulların BA'ların bozunması üzerindeki etkisi

LAB'nin BA'ları parçalama yeteneğini farklı koşullar etkileyebilir (Dapkevicius *et al.* 2000). Var olan LAB suşları, pH'nın 1 birim aralıklarla (4.5 – 8.5) ve sıcaklığın 5 birim aralıklarla (27 - 42°C) seçildiği farklı faktörlerde, BA'ları (histamin, tiramin, kadaverin ve putresin) degrede etme yetenekleri açısından değerlendirilmiştir. Örnekler, DOA besiyerinde 24 saat kültürlendikten sonra alınmıştır.

Seçilen izolatların moleküler yöntemlerle tanılanması

Genomik DNA izolasyonu

DNA izolasyonu ve saflaştırılması, BA degrede eden suşlar için yapılmıştır. Öncelikle saf olarak elde edilen izolat, MRS ve M17 agara çizgi ekimleri yapılmış ve (30°C ve 37°C) 24 saat inkübe edilmiştir. Gelişim gösteren izolatlardan alınmış ve Wizard Genomic DNA Purification Kiti (A2360) kullanılarak izolasyon gerçekleştirilmiştir (Promega; USA).

İzolasyon aşamaları

MRS Broth besiyeri içerisinde gelişen hücreler, tüplere alınarak santrifüj ile çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası ependorfun dibinde biriken hücrelere 480 µL, pH'ı 8 olan 50 mM EDTA ilave edilerek çözdürülmüştür. Daha sonra üzerine 120 µL ve 10 mg/mL lizozim enzimi eklenerek karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Karıştırma işleminden sonra 37 °C'de 60 dakik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından karışım, 13.000 rpm'de 120 sn santrifüj edilmiş ve süpernatant çıkartılmıştır. Pelet üzerine 600 µL Nüklei Lizis Solüsyonu eklenerek, dikkatli bir şekilde pipetajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan karışım, 80 °C sıcaklıkta 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından soğumaya bırakılmış ve üzerine 3 µL RNaseA eklenerek, birkaç kez alt-üst edilmiştir. Alt-üst işleminden sonra tüpler, 37 °C'de yarım saat inkübe edilmiştir. Örnekler etüvden çıkartılarak, oda sıcaklığına gelmesi sağlanıldı. Daha sonra üzerine 200 µL Protein Presipitasyon Solüsyonu eklenmiş ve 20 sn vortexleme işlemi gerçekleştirilip elde edilen karışım 5 dk buza konulmuştur. Ardından 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant alınarak içerisinde 600 µL izopropanol bulunan yeni tüplere aktarılmıştır. Tüpler, DNA peleti görülünceye kadar yavaşça alt-üst edilmiştir. Pelet oluşumu görülen tüpler, 13.000 rpm'de 2 dk santrifüjlenip, süpernatantları dökülmüştür. Süpernatantı uzaklaştırılan tüplere, 600 µl %70'lik EtOH eklenmiş ve 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant atılmış ve EtOH'ın uzaklaşması için 15 dk kurumaya bırakılmıştır. Son olarak, tüplere 100 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenmiş ve 65 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüpler, kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Adıgüzel, 2008). Ek olarak DNA örneğinin konsantrasyonunu ve saflığını ölçmek için NanoDrop 2000 ultra-mikrospektrofotometresi kullanılmıştır (Thermo Fisher Scientific; USA).

16S rRNA PCR işlemi ve PCR döngüsü

16S rRNA bölgesi bakterilerde çok korunaklı bir bölgedir ve dizi analiz karakterizasyonu çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. İzolata ait 16S rRNA gen bölgesi, laboratuvar ortamında, evrensel primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Bu doğrultuda reaksiyon tüpü totalde 30 µL'dir ve reaksiyon ortamının hazırlanışı **Tablo 7**'de belirtilmiştir. PCR karışımı hazırlandıktan sonra reaksiyon tüplerine karışımdan eklenir ve PCR cihazına uygun şekilde konulur. **Tablo 7**'de belirtilen PCR döngü basamakları cihaza girilir ve 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması sağlanmış olunur (Adıgüzel, 2008).

Tablo 7. PCR'ın Hazılanışı ve PCR Döngüsü

Reaksiyon Ortamı	
$MgCl_2$	1,8 µL
dH_2O	12,1 µL
dNTP	0,6 µL
10X PCR tamponu	3 µL
DMSO	1,2 µL
(5 µM) evrensel primer 27F (5'-AGAGAGTTGATCCTGGCTCA-3')	3 µL
(5 µM) evrensel primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')	3 µL
Taq DNA polimeraz	0,3 µL
İzole edilmiş DNA	5 µL

PCR Koşulları	
Ön denatürasyon	95°C'de 5 dk
Denatürasyon	94°C'de 1 dk (33 tekrar)
Bağlanma	50°C'de 1 dk (33 tekrar)
Uzama	72°C'de 1 dk (33 tekrar)
Son uzama	72°C'de 8 dk

16S rRNA PCR elektroforez işlemi

PCR işlemi ile çoğalan gen bölgesini doğrulamak için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bu amaçla 1 g agaroz tartılıp, 100 mL 1X TAE ile karıştırılmıştır ve tamamen eriyene kadar mikrodalgada bırakılmıştır. Ardından mikrodalgadan çıkarılan karışım, bir süre soğumaya bırakılmış ve soğuduktan sonra 3,5 µL etidyum bromür (EtBr) eklenmiştir. EtBr eklenen karışım, hafifçe karıştırılmıştır ve içinde tarağın takılı olduğu elektroforez küvetine yavaşça dökülmüştür. Jel dondurulduktan sonra tarak dikkatlice çıkarılmış ve jel, 1X TAE içeren bir elektroforez kabına yerleştirilmiştir. Ardından ilk kuyucuğa 4 µL markır yüklenmiş ve diğer kuyucuklara 6X boyası ve PCR ürünü karışımından oluşan numuneler yüklenmiştir. Elektroforez jel sisteminin pozitif (+) ve negatif (-) kutup noktaları dikkatli bir şekilde uygun bölmelere takıldıktan sonra numuneler, 90 V'da 50 dk süreyle yürümeye bırakılmıştır. Son olarak DNA bantları bir jel görüntüleme sistemi ile görselleştirilip, bilgisayarda analiz edilmiştir (Baltacı, 2016).

DNA dizi analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik ağaç çizimi

İzolatların 16S rRNA dizileri, NCBI veritabanı (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) ve EzBioCloud'da (https://www.ezbiocloud.net) BLAST araç programı kullanılarak analiz edildi ve tanımlandı. MEGA11 yazılımında komşu-birleştirme yöntemi kullanılarak, izole edilen

suşlar ile en yakın akrabaları arasındaki evrimsel ilişkiyi analiz etmek için bir filogenetik ağaç oluşturuldu (Adiguzel *et al.* 2020).

Ev yapımı beyaz peynirde bulunan BA'ların konsantrasyonlarının belirlenmesi

Labaratuvar ortamına getirilen peynir örneklerinin her birinden 25 g alınarak, 125 mL %5'lik Trikloroasetik asit (TCA) ile 3 dakika boyunca karıştırıldı. Elde edilen karışım, Whatman No. 1 filtre kağı kullanılarak süzüldü ve süzüntüden 10 mL alınarak bir cam tüp içinde bulunan (4 g NaCl ve 1 ml %50 NaOH) karışım ile karıştırıldı. Daha sonra karışım, 3000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj işlemine tabi tutuldu ve süpernatant kısmı alındı. Süpernatantın üzerine 5 mL n-bütanol/kloroform (1:1) eklendi ve her ekstraksiyondan elde edilen üst tabaka toplanarak bir ayırma hunisine aktarıldı. Son olarak üzerine 5 mL heptan eklenerek 3'er kez 1 mL 0,2 M HCL eklendi ve faz oluşumu gözlendi. Oluşan fazlar, cam Stoppard tüpünde toplanarak HPLC analizi için kullanıma hazır hale getirilmiştir (Farag *et al.* 2019).

İstatistiksel analiz

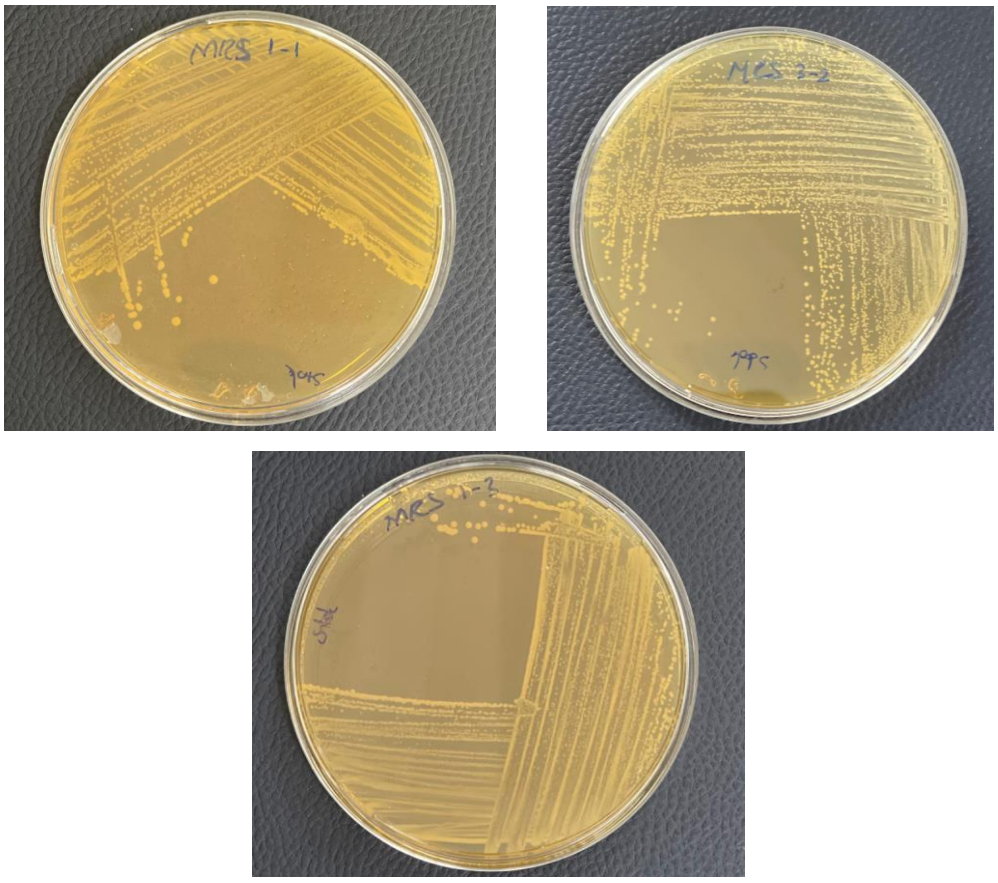
Ortalama ve standart sapma değerleri Excel 2016 ve GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak belirlendi ve her deney üç kez tekrarlandı. Ortalama değer ve ortalamanın standart hatası (SEM), SEM'i temsil eden hata çubuklarıyla birlikte sunuldu. İki suş arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olup olmadığını belirlemek için Microsoft Excel ve GraphPad Prism 8 kullanılarak bir varyans analizi (ANOVA) testi yapıldı. P-değerinin <0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Akkaya *et al.* 2025).

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bakteri İzolasyonu

Örneklerin toplanması ve laktik asit bakteri (LAB) izolasyonu

Tez çalışmasında kullanılan 20 adet ev yapımı beyaz peynir örneği, Erzurum ili ve çevre ilçelerinden temin edilmiştir. Erzurum ili ve ilçelerinden toplanan 20 adet ev yapımı beyaz peynir örneklerinden, 500 adet bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir **(Şekil 9)** ve izolatlar kullanılıncaya kadar -86°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 9. Ev yapımı beyaz peynir örneklerinden izole edilen bazı LAB'lerin petri görüntüleri

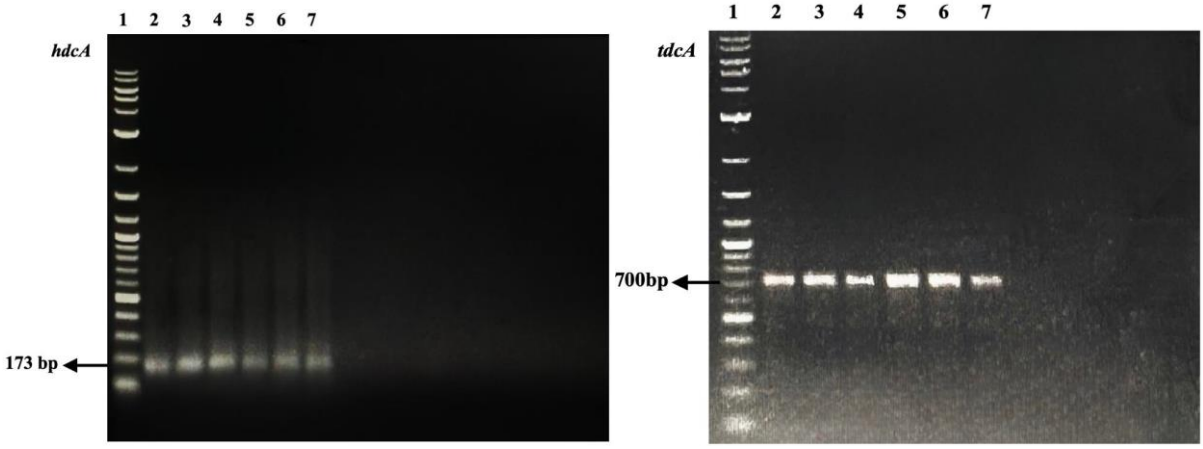
Laktik asit bakteri izolatlarının fenotipik karakterizasyonunun belirlenmesi

Ev yapımı beyaz peynir örneklerinden izole edilen 500 adet izolatın, laktik asit bakterisi (LAB) olup olmadığını tespit etmek için fenotipik olarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak koloni morfolojisine bakılarak tipik LAB görünümüne sahip olan suşlar seçilmiştir. Daha sonra bu izolatların LAB olma ihtimallerini güçlendirmek amacıyla; Gram,

oksidaz ve katalaz testleri yapılmıştır. Uygulanan bu testler neticesinde; 500 izolat arasıdan sadece 265 tanesinin gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif olduğu tespit edilmiştir.

Moleküler yaklaşım (PCR) kullanılarak BA üretmeyen LAB'nin seçimi

Ev yapımı beyaz peynir örneklerinden izole edilen 265 adet LAB suşunun, BA üretiminden sorumlu enzimlerin genlerini hedefleyen primerler kullanılarak, PCR ile taraması yapılmıştır. İzolatların yaklaşık %72'si *hdcA* ve *tdcA* genleri için amplikon gösterirken, *cadA, ldc* ve *odc* genleri için bant görülmemiştir. Amplikon gösteren bazı izolatların görüntüleri, **Şekil 10**'da verilmiştir. Tespit edilen genler için amplikon göstermeyen izolatlar çalışmanın sonraki aşamalarında yapılacak analizler için seçilmiştir. Ladero ve arkadaşları, BA üretimi ile ilişkili LAB'lerinin tespitine yönelik *hdcA, tdcA, cadA, ldc* ve *odc* genlerini kullanarak yaptıkları araştırmaya paralel olarak, sırasıyla bizim çalışmamızda da *hdcA* ve *tdcA* genleri için 173 bç, 700 bç bant profili gözlemlenmiştir (Ladero *et al.* 2015).

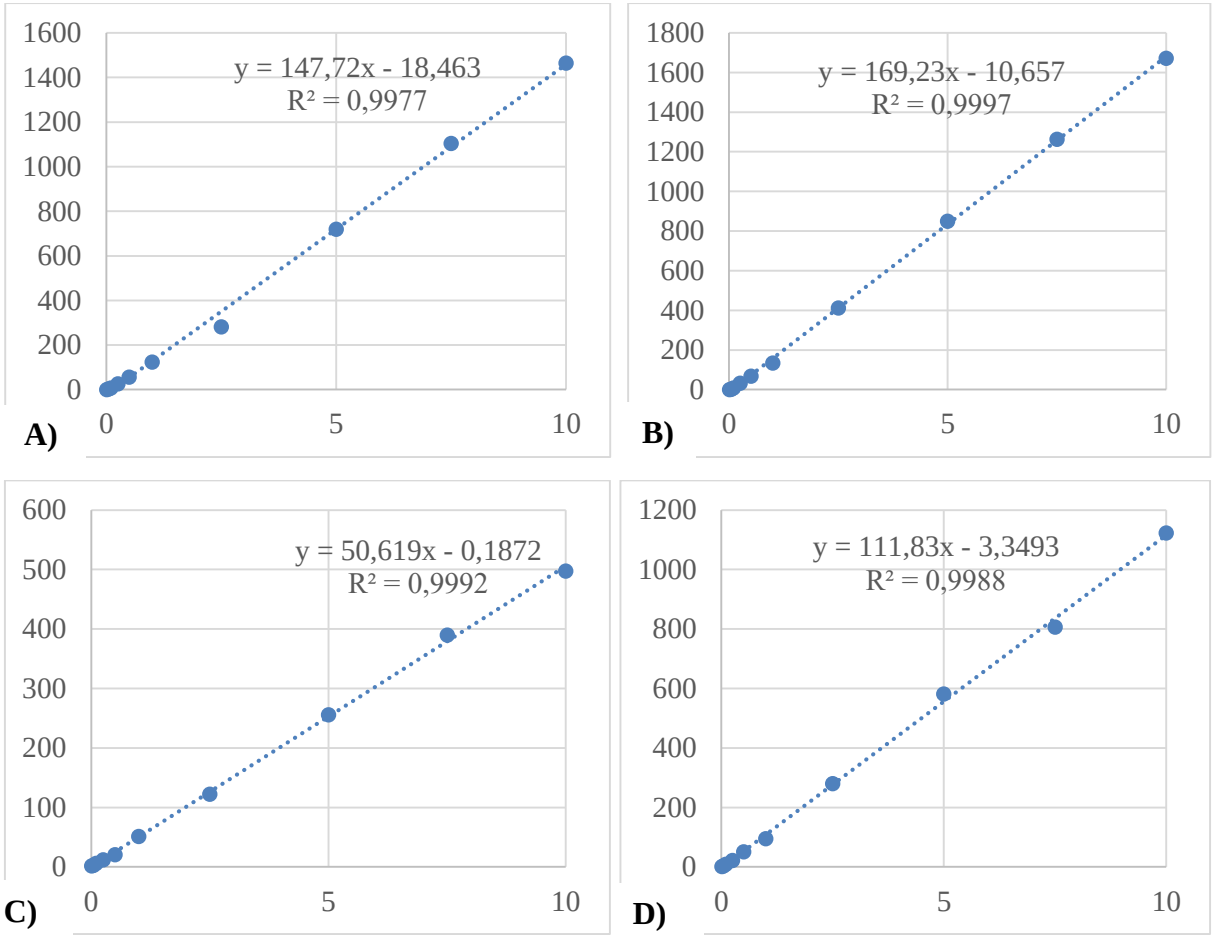


Şekil 10. Histamin ve tiramin üretiminden sorumlu *hdcA* ve *tdcA* genleri için PCR amplifikasyon sonuçları gösterilmiştir. Sırasıyla; **1.**kuyucuk: DNA markır (0.1-10.0 kb), **2.**kuyucuk: pozitif kontrol, **3.** kuyucuk: LAB A4 suşu, **4.**kuyucuk: LAB A11 suşu, **5.**kuyucuk: LAB A27 suşu, **6.**kuyucuk: LAB A142 suşu, **7.**kuyucuk: LAB A180 suşu.

HPLC kullanarak BA üreten LAB'lerin seçimi

BA'nın doğrusalitesi ve eğrileri

Hedef BA bileşikleri için kalibrasyon eğrileri **Şekil 11**'de gösterilmiştir. Oluşturulan eğriler, bileşik konsantrasyonuna karşılık gelen tepe alanı tepkimesine karşı grafiğe dökerek oluşturulmuştur. 0.01, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 µg/mL hedef BA içeren standart çözeltiler hazırlanıp, her birinden 10 µL HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. Doğrusallık, en küçük karelerin regresyon yöntemi kullanılarak doğrusal regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Regresyon denklemleri, kalibrasyon grafikleri ile y eksenindeki eğim ve kesme noktası için standart sapmalarla türetilmiştir **(Tablo 8).**



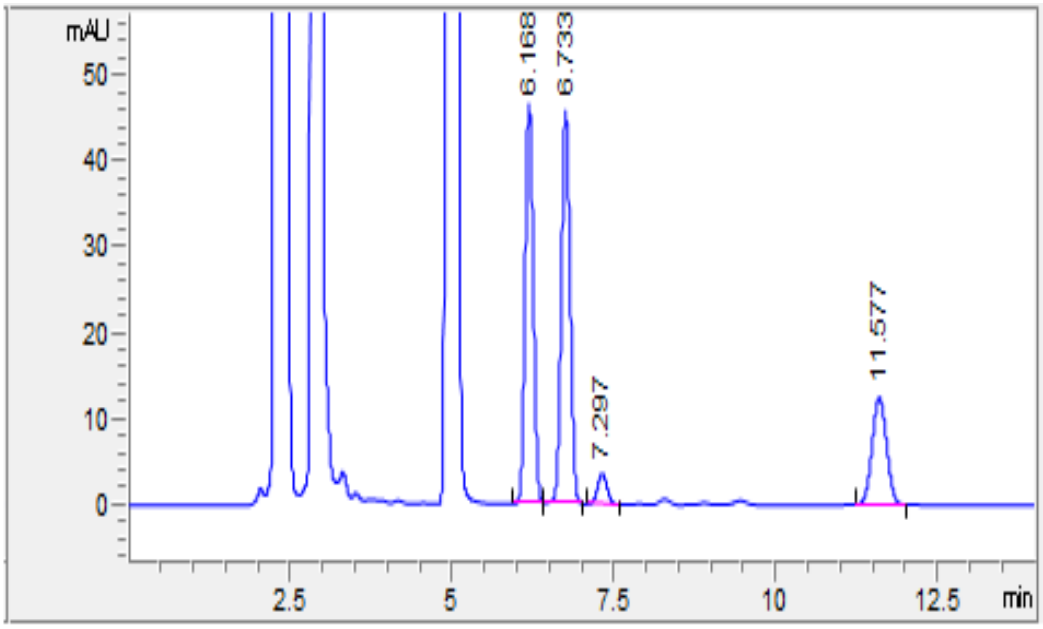
Şekil 11. A) Putrasin için kalibrasyon eğrisi, **B)** Kadaverin için kalibrasyon eğrisi, **C)** Histamin için kalibrasyon eğrisi, **D)** Tiramin için kalibrasyon eğrisi

Tablo 8. HPLC Yöntemiyle BA'ların Doğrusalitesi

Parametreler	Putresin	Kadaverin	Histamin	Tiramin
Aralık (µg/mL)	0.01-10	0.01-10	0.01-10	0.01-10
Doğrusal regresyon	$X = \frac{Y + 18.463}{147.72}$	$X = \frac{Y + 10.657}{169.23}$	$X = \frac{Y + 0.1872}{50.619}$	$X = \frac{Y + 3.3493}{111.8}$
Regresyon doğrusunun kesişiminin standart sapması	0.128	0.056	0.062	0.048
Regresyon doğrusunun eğiminin standart sapması	0,1827	0.059	0.2497	0.075
Korelasyon katsayısı	0.9977	0.9997	0.9992	0.9984

Ayrıca, bir analizinin toplam çalışma süresi yaklaşık 14 dakika olup, entegratör zayıflatma ölçüsü 10 olarak belirlenmiştir. Mobil faz, çeşitli çözücü karışımları ile yapılan

birden fazla deneyin ardından seçilmiştir. Zirve özellikleri (simetri, kuyruk), tutma süresi (Rt), maliyet ve hazırlama kolaylığı, mobil fazı seçerken dikkate alınmıştır. Önerilen yöntemin standart bir BA analizine uygulanmasıyla elde edilen temsilci bir kromatogram aşağıda, **Şekil 12**'de gösterilmiştir.



Şekil 12. BA'ların kromatogramı (putresin Rt: 6.16 dk, kadaverin Rt: 6.73 dk, histamin Rt: 7.29 dk, tiramin Rt: 11.57 dk)

LAB'nin BA'ları üretme yeteneği

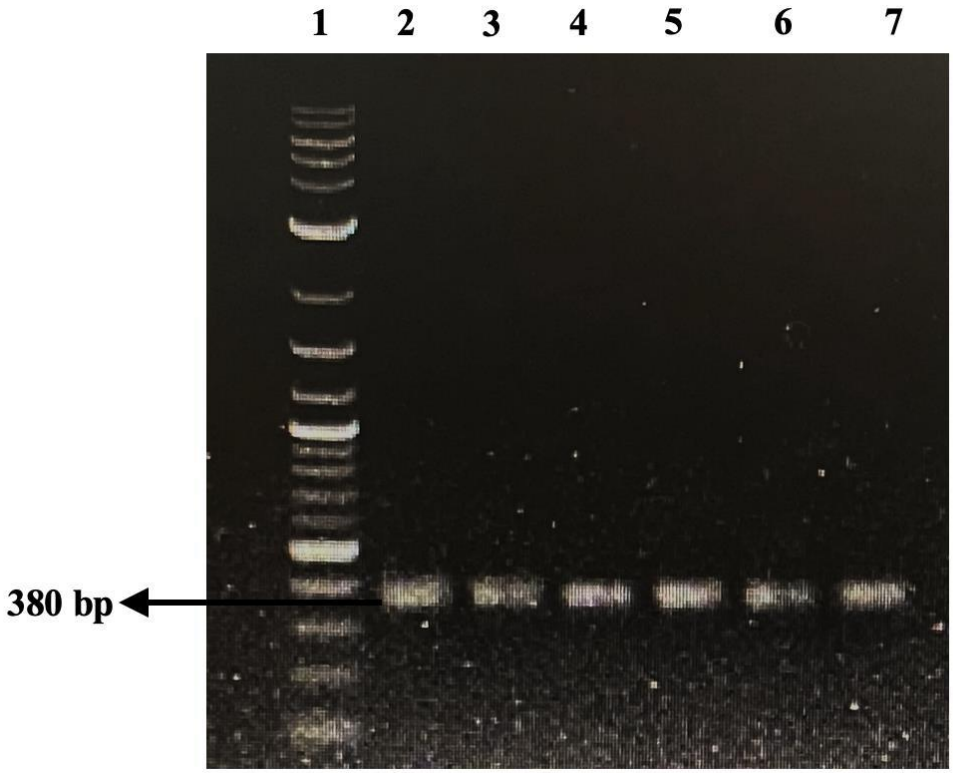
Tüm varsayılan LAB suşlarının BA üretim kapasiteleri HPLC analizi ile doğrulanmıştır ve elde edilen sonuçlar, tüm izolatların yalnızca yaklaşık %72'sinin BA üretme yeteneği gösterdiği genetik verilerle tespit edilmiştir. Test sonucunda, histamin ve tiramin üretim yeteneği sadece *hdcA* ve *tdcA* genlerine sahip suşlarda tespit edilmişken, kadaverin ve putresin için herhangi bir üretim belirlenmemiştir. Ayrıca daha fazla analiz için BA üretmeyen izolatlar seçilerek çalışmanın sonraki aşamalarına devam edilmiştir.

BA-Degrede edici LAB suşlarının seçimi

Çoklu bakır oksidaz'ların (MCO'ların) tespiti

MCO'ların bakterilerdeki spesifik rolleri tam olarak anlaşılamamıştır (Sharma *et al.* 2007; Kudanga *et al.* 2009). Bununla birlikte, MCO'ların, BA'ların parçalanmasında katkıda bulunduğu bilinmektedir (Callejón *et al.* 2014; Grembecka, 2015). Yapılan iki farklı araştırma sonucunda, kullandıkları bazı LAB'lerin, MCO üretebildiği tespit edilmiştir (Komori & Higuchi, 2015; L. Li *et al.* 2018). Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında, yaptığımız PCR işlemi sonucu BA üretmeyen tüm izolatlar kullanılarak, MCO üretiminden sorumlu *sufI* geninin varlığı tespit edilmiş ve suşların yaklaşık %12'si *sufI* geni için amplikon göstermiştir. Şekil

5’de, sadece MCO üretebilen izolatların bazıları gösterilmiş ve çalışmanın sonraki aşamalarında bu izolatlar kullanılmıştır.



Sekil 13. MCO üretiminden sorumlu *sufI* genleri için PCR amplifikasyon görüntüsü. Sırasıyla: **1.**kuyucuk: DNA markır (0.1-10.0 kb), **2.**kuyucuk: LAB A6 suşu; **3.**kuyucuk: LAB A7 suşu, **4.**kuyucuk: LAB A76 suşu, **5.**kuyucuk: LAB A81 suşu, **6.**kuyucuk: LAB A170 suşu, **7.**kuyucuk: LAB A121 suşu.

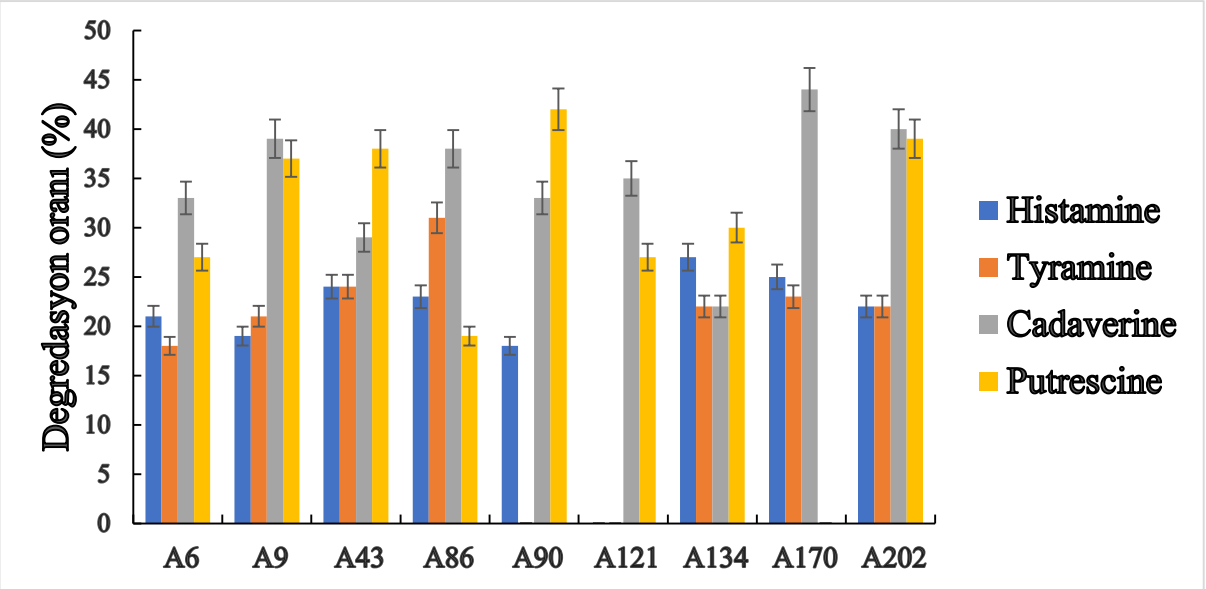
HPLC kullanılarak BA-degrede edici LAB seçimi

MCO açısından pozitif olan tüm LAB suşları, HPLC kullanılarak BA'ları degrede etme yetenekleri açısından analiz edilmiştir. MCO pozitif ve BA üretmeyen 9 suş, BA'ları degrede etme yeteneğini göstermiştir. **Şekil 14**’de, BA’ları degrede etme oranının, %18 ile %44 arasında değiştiği gösterilmiştir. Ayrıca dokuz bakteri suşunun tamamının (A90, A121 ve A170 suşları hariç), test edilen tüm BA'ları parçalama yeteneğine sahip olduğu da yine **Şekil 14**’de gösterilmiştir. Hariç tutulan A90 suşunun, tiramin karşısında; A121 suşunun, histamin ve tiramin karşısında ve A170 suşunun ise, putresin karşısında hiçbirn degradasyon yeteneği göstermediği tespit edilmiştir.

Çalışmanın devamında, A134 suşunun histamini % 27, A86 suşunun tiramini %31, A170 suşunun kadaverini % 44 ve A90 suşunun putresini % 42 oranında parçaladığı görülmüştür **(Tablo 9)**.

Tablo 9. Diamin Oksidaz Test Sıvısında 0. saat (kontrol) ve 24. Saat Sonrası BA Konsantrasyonu

	Kontrol (0 h) mg/L	Histamin (24 h) mg/L	Tiramin (24 h) mg/L	Kadaverin (24 h) mg/L	Putresin (24 h) mg/L
LAB A6	10	7.912 ± 0.02	8.198 ± 0.24	6.711 ± 0.17	7.31 ± 0.37
LAB A9	10	8.111 ± 0.10	7.899 ± 0.14	6.119 ± 0.35	6.297 ± 0.04
LAB A43	10	7.617 ± 0.08	7.596 ± 0.09	7.099 ± 0.21	6.202 ± 0.09
LAB A86	10	7.721 ± 0.20	6.914 ± 0.11	6.213 ± 0.03	8.112 ± 0.04
LAB A90	10	8.199 ± 0.47	10 ± 0.54	6.704 ± 0.49	5.813 ± 0.42
LAB A121	10	10 ± 0.14	10 ± 0.43	6.521 ± 0.47	7.318 ± 0.05
LAB A134	10	7.298 ± 0.33	7.815 ± 0.03	7.79 ± 0.23	7.006 ± 0.14
LAB A170	10	7.496 ± 0.48	7.709 ± 0.07	5.643 ± 0.44	10 ± 0.18
LAB A202	10	7.799 ± 0.52	7.776 ± 0.04	6.009 ± 0.06	6.149 ± 0.09



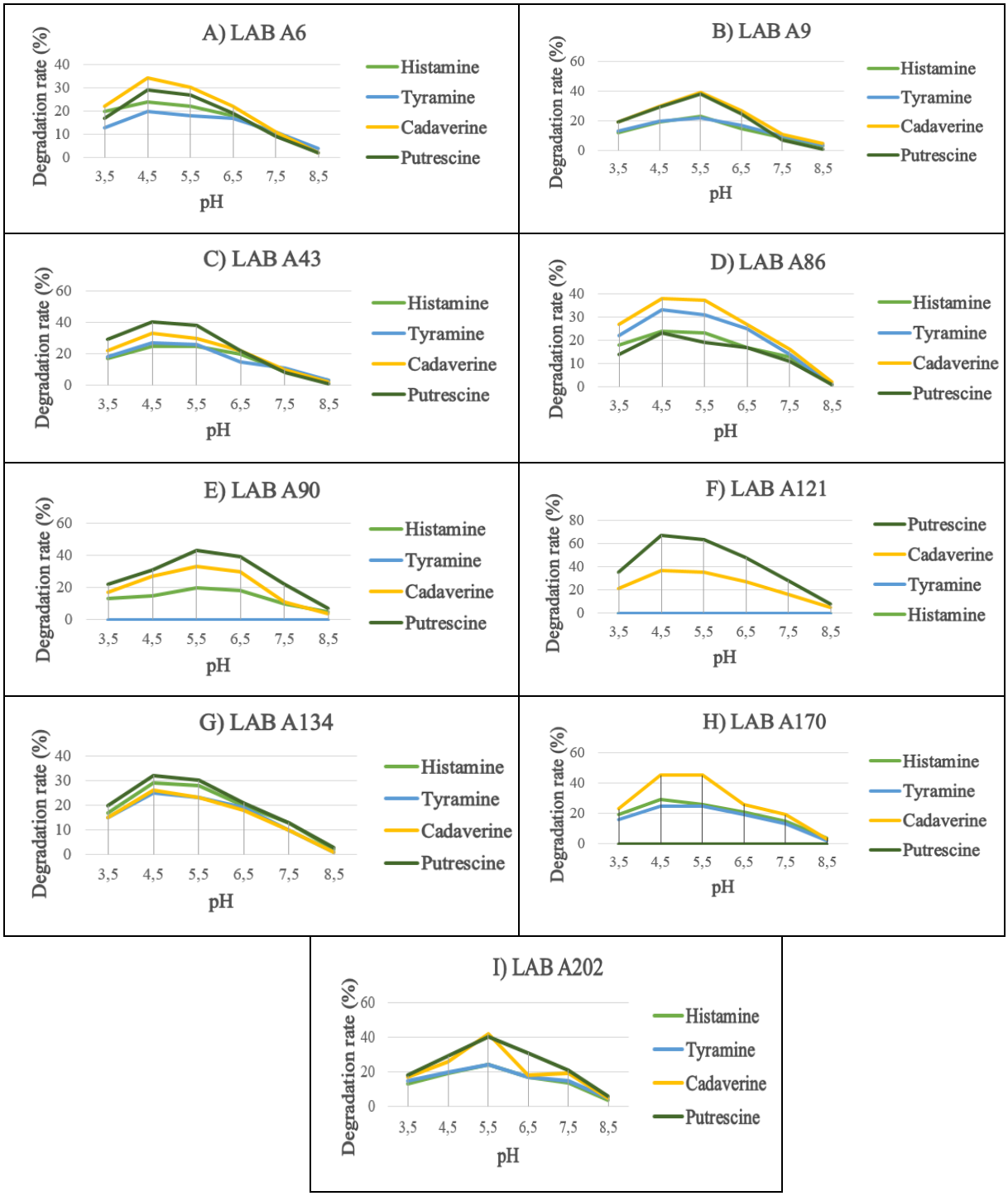
Şekil 14. LAB suşlarınının 30°C'de ve 24 saat inkübasyondan sonra test edilen BA'ları (histamin, tiramin, kadaverin ve putresin) degrede etme oranları gösterilmiştir.

BA'ların degrede edilmesinde pH ve sıcaklığın etkisi

BA'ların degrede edilmesinde pH'nın etkisi

Her bir suş için BA'ları degrede etmede pH'ın etkisi değerlendirilmiştir. Tüm varsayılan LAB suşları, pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 ve 8.5 değer aralıklarında değerlendirilmiştir ve **Şekil 15**'de gösterilmiştir. A6, A43, A86, A121, A134 ve A170 suşları için optimum pH'ın 4.5; A9, A90 ve A202 suşları için ise optimum pH'ın 5.5 olduğu gözlenmiştir. Diğer pH değerlerinde (3,5, 6,5, 7,5 ve 8,5) ise herhangi bir degradasyon gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak LAB suşlarının optimum pH'da BA degradasyon aralığının, 4.5-5.5 olduğu çalışma sonunda anlaşılmıştır. Dapkevicius ve arkadaşlarının çalışmasında, histaminin en yüksek degradasyon oranının pH

4.5’de olduğu bildirilmiştir (Dapkevicius *et al.* 2000). Bu durum, her ne kadar Dapkevicius'un çalışması sadece histamin ile ilgili olsa da, elde edilen sonuçların mevcut bulgularla örtüştüğünü göstermektedir.

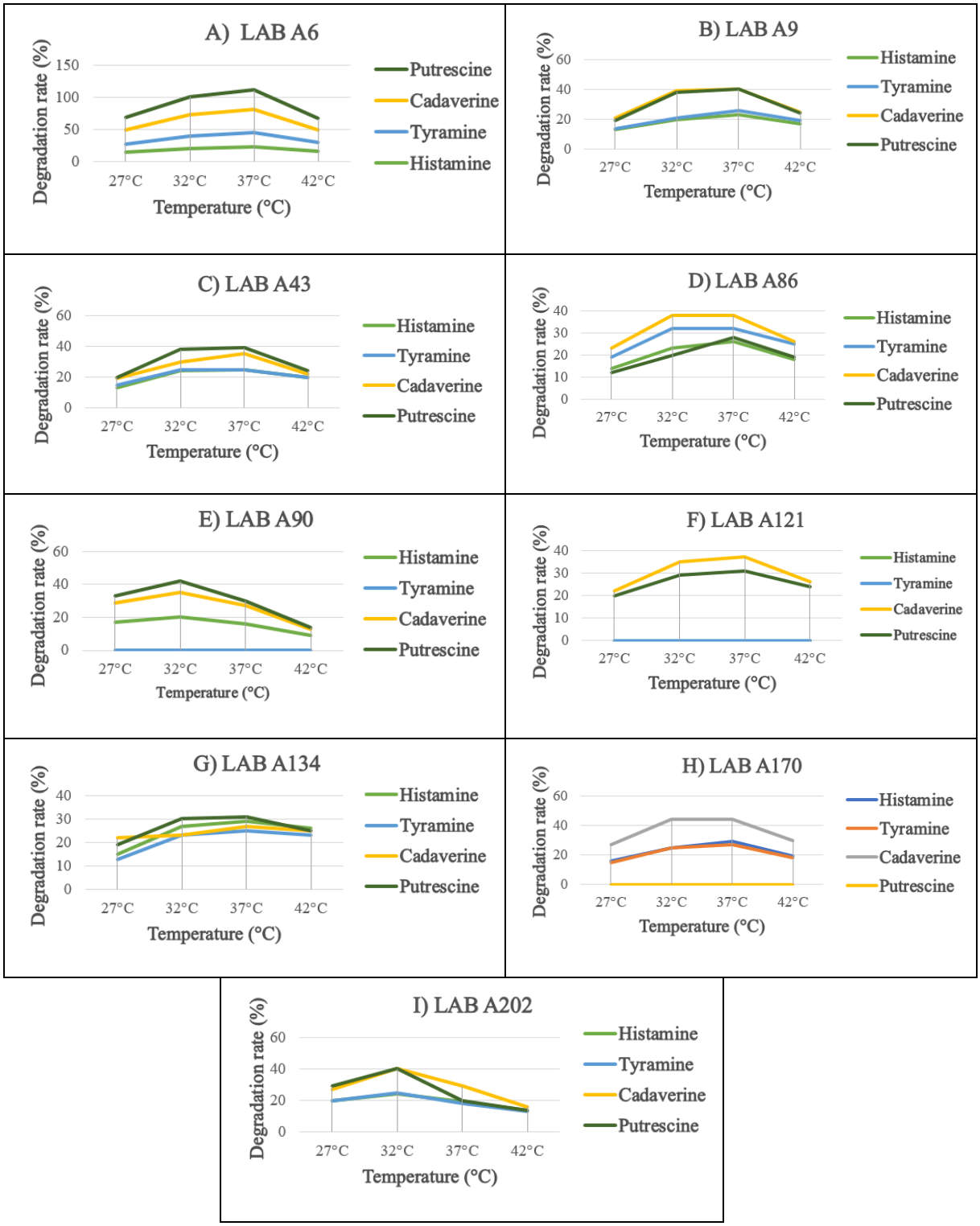


Şekil 15. Mevcut LAB suşlarının, farklı pH değerlerinde BA’ları degrede etme yüzdeleri

BA’ların degradasyonunda sıcaklığın etkisi

Her bir suş için BA’ların degradasyonunda sıcaklığın etkisi değerlendirilmiş ve **Şekil 16**’da gösterilmiştir. A6, A9, A43, A86, A121, A134, A170 için optimum sıcaklığın 37°C, A90

ve A202 için ise 30°C'de olduğu gözlemlenmiştir. Diğer sıcaklık aralıklarında (27°C ve 42°C) ise herhangi bir degradasyon gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak mevcut LAB suşlarının BA degradasyonu için optimum sıcaklık aralığının, 32-37°C olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 16. Mevcut LAB suşlarının, farklı sıcaklık değerlerinde BA'ları degrede etme yüzdeleri

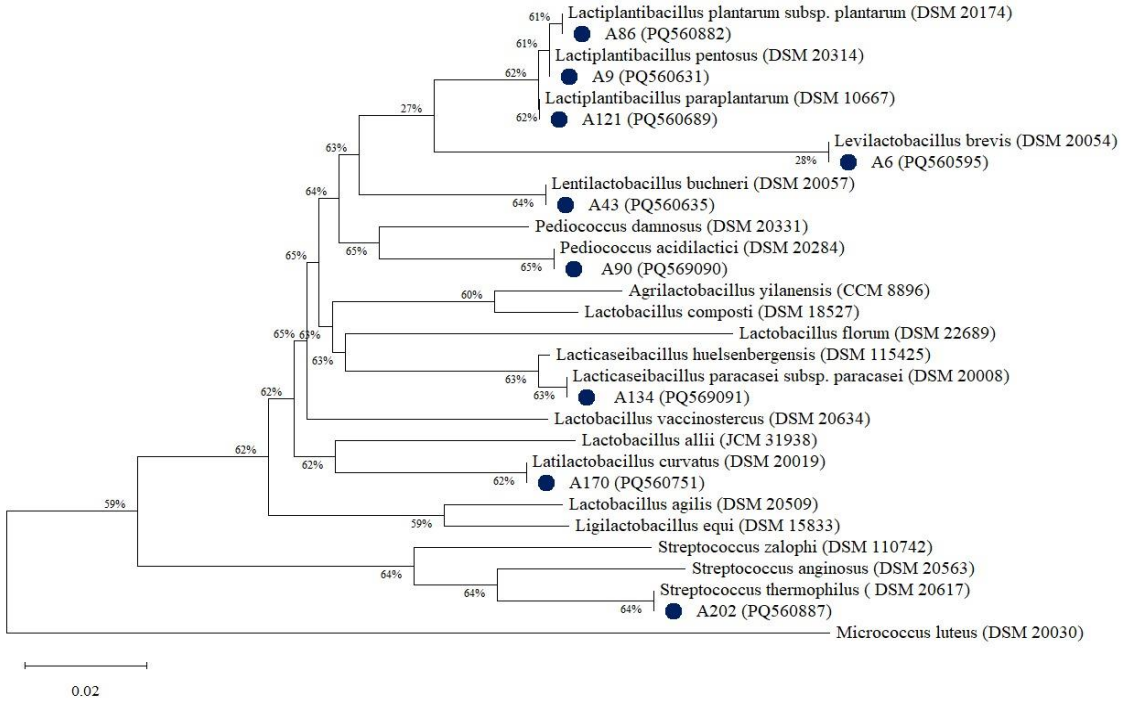
16S rRNA sekans analizi ve filogenetik ağaç modeli

Test izolatlarının sekans analizleri gerçekleştirilmiş ve 16S rRNA dizileri belirlenmiştir. Elde edilen sekans verileri, GenBank® veritabanında bulunan diğer diziler ile kıyaslanmıştır. Kıyaslama sonucunda izolatların tür ismi ve benzerlik oranları belirlenmiş ve verileri GenBank®'a girilerek her birinin accession numarası alınmıştır. Dokuz suşun sırasıyla *Levilactobacillus brevis* A6 (PQ560595), *Lactiplantibacillus pentosus* A9 (PQ560631), *Lentilactobacillus buchneri* A43 (PQ560631), *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* A86 (PQ560635), *Pediococcus acidilactici* A90 (PQ569090), *Lactiplantibacillus paraplantarum* A121 (PQ560689), *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* A134 (PQ569091), *Latilactobacillus curvatus* A170 (PQ560751) ve *Streptococcus thermophilus* A202 (PQ560887) olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar **Table 10**'da ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 10. BA-degrede Eden LAB Suşlarının 16S rRNA Benzerlik Yüzdeleri ve GenBank Numaraları

Strain kodu	Bakteri ismi	Her bir suş ile 16S rRNA benzerliği (%)	GenBank numarası
A6	*Levilactobacillus brevis*	% 99,8	PQ560595
A9	*Lactiplantibacillus pentosus*	% 99,8	PQ560631
A43	*Lentilactobacillus buchneri*	% 100	PQ560635
A86	*Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum*	% 100	PQ560882
A90	*Pediococcus acidilactici*	% 100	PQ569090
A121	*Lactiplantibacillus paraplantarum*	% 99,9	PQ560689
A134	*Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*	% 100	PQ569091
A170	*Latilactobacillus curvatus*	% 99,5	PQ560751
A202	*Streptococcus thermophilus*	% 100	PQ560887

Sekans analizi belirlenen bakterilerin filogenetik olarak benzerliklerinin tespit edilmesi amacıyla filogenetik ağaç tasarımı yapılmıştır ve **Şekil 17**'de gösterilmiştir.



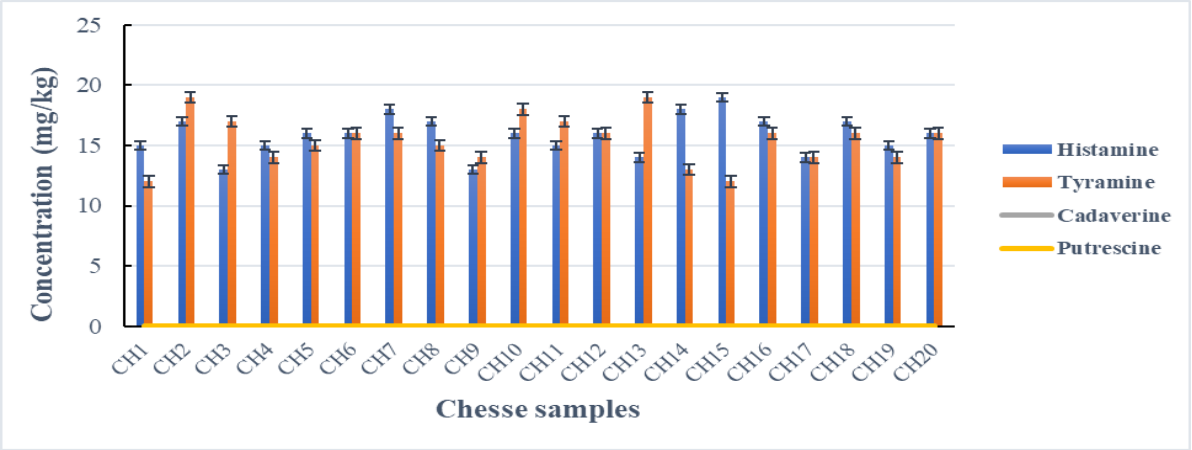
Şekil 17. 16s rRNA gen dizileri temel alınarak oluşturulan LAB suşlarının, birkaç yakın akraba arasındaki ilişkileri gösteren filogenetik ağaç şeması. Ölçek çubuğu, 0.02'lik bir sapmayı temsil etmektedir

Aminleri parçalama yeteneği, gıdaları fermente eden mikroorganizmalarda görülen histamin ve tiramin oksidaz aktiviteleri ile ilişkilidir. Özellikle *Lactobacillus* ve *Pediococcus* türleri, bu enzim aktivitesine sahip olmasıyla bilinir. Yapılan çalışmalar, bu mikroorganizmaların biyojen aminleri etkili bir şekilde parçalayabildiğini göstermektedir (Leuschner *et al.* 1998). Guarcello ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *Lb. brevis, Lb. paraplantarum, Lb. paracasei* ve *S. thermophilus'un* BA'ları parçalayabildiğini bildirilmiştir (Guarcello *et al.* 2015). Lee ve arkadaşlarının çalışmasında, *Lb. brevis, Lb. pentosus* ve *Lb. plantarum'un* BA'ları parçalayabildiğini rapor etmiştir (J. Lee *et al.* 2021). Ayrıca *Lb. curvatus* ve *P. acidilactici'nin* de BA parçalama kabiliyetine sahip olduğu bildirilmiştir (Dapkevicius *et al.* 2000; C. Li *et al.* 2024). Yapılan bu çalışmada, literatür verilerine paralel bir şekilde tespit edilen türlerin BA degredasyonu yaptığı tespit edilmiştir.

Ev yapımı beyaz peynirdeki BA konsantrasyonu

Toplanan 20 peynir örneğindeki BA'ların konsantrasyonu **Şekil 18**'de sunulmuştur. Kadaverin ve tiramin varlığı tespit edilmezken, histamin ve tiramin konsantrasyonu (12-19 mg/kg) arasında bulunmuştur. Valsamaki ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre, peynirdeki BA'nın güvenlik sınırının 100 mg/kg olduğu rapor edilmiş (Valsamaki *et al.* 2000) ve mevcut çalışmada, 20 ev yapımı beyaz peynirde de güvenlik sınırının altında BA konsantrasyonu tespit edilmiştir. Guarcello ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir

çalışmada, peynir örneklerinde ki BA miktarının 30 mg/kg olduğunu gözlemlenmiştir. Literatür verileriyle mukayese edildiğinde, çalışmamızda kullandığımız peynir örneklerinde ki BA konsantrasyonunun oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Guarcello *et al.* 2015).



Şekil 18. Ev yapımı beyaz peynirlerde histamin, tiramin, kadaverin ve putresin konsantrasyonları

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ilk olarak mikrobiyal yoğunluğu fazla olduğu düşünülen ev yapımı beyaz peynir örneklerinden, laktik asit bakterinin (LAB) izolasyonu gerçekleştirilmiştir (265 izolat). Çalışmanın devamında, izole edilen LAB'nin biyojen amin (BA) üretme ve degrede etme potansiyelleri incelenmiştir. Mevcut durumda PCR tabanlı yöntemler, BA üretiminde rol oynayan genleri tespit etmede sıklıkla kullanıldığından, izole edilen 265 izolata, BA'lerin (histamin, kadaverin, tiramin ve putresin) oluşumundan sorumlu genlerin (*hdcA*, *cadA*, *tdcA* ve *odc*) tespitine olanak sağlayan spesifik primerlerle, tarama yapılmıştır. PCR taraması sonucunda, izolatların yaklaşık %72'sinin *hdcA* ve *tdcA* genleri için amplikon gösterdiği, *cadA*, *ldc* ve *odc* genleri için ise, amplikon göstermediği görülmüştür. HPLC analiz sonucunda da tüm izolatların yalnızca yaklaşık %72'sinin BA üretme yeteneği gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca histamin ve tiramin üretim yeteneği sadece *hdcA* ve *tdcA* genlerine sahip suşlarda tespit edilmişken, kadaverin ve putresin için herhangi bir üretim belirlenmemiştir. Mevcut çalışmada HPLC analizinden elde edilen sonuçların, genetik verilerle tutarlı olduğunu göstermektedir ve kullanılan genetik yaklaşımın güvenilirliğini doğrulamaktadır. BA üreten izolatlar belirlendikten sonra PCR işlemi sonucunda BA üretmeyen tüm izolatlar kullanılarak, çoklu bakır oksidazların (MCO) üretiminden sorumlu *sufI* geninin varlığı tespit edilmiştir. Test edilen izolatların yaklaşık %12'sinin *sufI* geni için amplikon gösterdiği sonucuna varılmıştır. PCR işleminin ardından MCO açısından pozitif olan tüm LAB suşları, HPLC kullanılarak, BA'leri degrede etme yetenekleri açısından analiz edilmiştir. BA üretmeyen ve MCO üreten 9 suşun, BA'leri degrede etme (%18 ile %44 arasında değişen değerler) yeteneğini gösterdiği HPLC analizi ile doğrulanmıştır. Daha sonra bu 9 suş için BA degrede etmede, pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmış ve optimum pH'nın 5.5, sıcaklık aralığının ise, 32-37°C olduğu görülmüştür. Son olarak 265 izolat arasından seçilen 9 suşun identifikasyonu işlemi yapılmıştır. Tanılama sonucunda: A6 kodlu izolatın, %99,8 oranında *Levilactobacillus brevis*'e; A9'un, %99,8 *Lactiplantibacillus pentosus*'a; A43'ün, %100 *Lentilactobacillus buchneri*'ye; A86'nın, %100 *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum*'a; A90'un, %100 *Pediococcus acidilactici*'e; A121'in, %99,9 *Lactiplantibacillus paraplantarum*'a; A134'ün, %100 *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*'ye; A170'in, %99,5 *Latilactobacillus curvatus*'a ve A202 kodlu izolatın ise, %100 oranında *Streptococcus thermophilus*'a benzediği tespit edilmiştir.

Elde edilen veriler sonucunda; identifikasyonu yapılan 9 izolatın, BA'ları degrede etme potansiyelinin yüksek olduğu görülmüştür. İzolatların hem gen, hem de HPLC analiz sonucunun kantitatif olarak belirlenen yüzde hesaplarına bakıldığında, özellikle gıdalarda oluşan ve insan sağlığını tehdit eden BA gruplarını degrede ediyor olması, gıda güvenliği ve kalitesi açısından bu suşların oldukça değerli olduğunu göstermektedir. Geleneksel peynirlerde BA'ların varlığına ilişkin endişeler göz önüne alındığında, bu çalışma ile seçilen suşların starter kültür olarak kullanılabileceği, fakat bunun kesin kararının verilebilmesi için ek analizlere ihtiyaç duyulduğu aşikardır. Bu suşların optimum pH ve sıcaklık koşullarında etkinliğinin artırılması, gıda güvenliği ve kalitesi açısından oldukça önemlidir. BA degredasyonunda rol oynayan genetik ve enzimatik mekanizmaların araştırılması, bu süreçleri kontrol altına alacak, yeni yöntemlerin gelişiminin önünü açacaktır.

KAYNAKÇA

Abosereh, N. A., Ghani, S. A. El, Gomaa, R. S., & Fouad, M. T. (2015). Molecular Identification of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Egyptian Traditional Fermented Dairy Products. *Biotechnology(Faisalabad)*, *15*(1–2), 35–43. https://doi.org/10.3923/biotech.2016.35.43

Adiguzel, A., Ay, H., Baltaci, M. O., Akbulut, S., Albayrak, S., & Omeroglu, M. A. (2020). Genome-based classification of Calidifontibacillus erzurumensis gen. nov., sp. nov., isolated from a hot spring in Turkey, with reclassification of Bacillus azotoformans as Calidifontibacillus azotoformans comb. nov. and Bacillus oryziterrae as Calidifontibacillus oryziterrae comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(12), 6418–6427. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004549

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

Akan, S., & Demirağ, M. K. (2018). Gıdalarda bulunan biyojen aminlerin önemi ve detoksifikasyon mekanizmaları. Food and Health, 4(3), 166-175.

Akkaya, S. N., Almansour, A., Altintas, R., Sisecioglu, M., & Adiguzel, A. (2025). Purification, characterization, optimization, and docking simulation of alkaline protease produced by Brevibacillus agri SAR25 using fish wastes as a substrate. Food Chemistry, 471, 142816. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.142816

Alvarez, M. A., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*, *39*(2), 146–155. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.007

Aygün O. Biyojen Aminler- Süt ve Süt Ürünlerindeki Varlığı ve Önemi.. Uludağ Üniv. J. Fac. Vet. Med. 2003; 22 (1-2-3): 91-95.

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.

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.

Burdychova, R., & Komprda, T. (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*, *276*(2), 149–155. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00922.x

Callejón, S., Sendra, R., Ferrer, S., & Pardo, I. (2014). Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(1), 185–198. https://doi.org/10.1007/s00253-013-4829-6

Callejón, S., Sendra, R., Ferrer, S., & Pardo, I. (2014). Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. Applied Microbiology and Biotechnology, 98, 185-198.

Choi, S. M., Park, M. H., Jung, T. S., Moon, K. H., Kim, K. M., & Kang, J. S. (2011). Characterization of Bacillus mojavensis KJS-3 for industrial applications. *Archives of Pharmacal Research*, *34*(2), 289–298. https://doi.org/10.1007/s12272-011-0215-z

Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., & Coton, E. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, *27*(8), 1078–1085. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.012

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.

Dapkevicius, M. L. N. E., Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., Houben, J. H., & Wymenga, W. (2000). Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, *57*(1–2), 107–114. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00238-5

De Colibus, L., Li, M., Binda, C., Lustig, A., Edmondson, D. E., & Mattevi, A. (2005). Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(36), 12684-12689.

De Filippis, F., Pennacchia, C., Di Pasqua, R., Fiore, A., Fogliano, V., Villani, F., & Ercolini, D. (2013). Decarboxylase gene expression and cadaverine and putrescine production by Serratia proteamaculans in vitro and in beef. *International Journal of Food Microbiology*, *165*(3), 332–338. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.021

Del Rio, B., Fernandez, M., Redruello, B., Ladero, V., & Alvarez, M. A. (2024). New insights into the toxicological effects of dietary biogenic amines. Food Chemistry, 435, 137558.

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

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

Düz, M., & fatih Fidan, A. (2016). Biogenic amines and effects. Kocatepe Veterinary Journal, 9(2), 114-121.

Emborg, J., & Dalgaard, P. (2008). Growth, inactivation and histamine formation of Morganella psychrotolerans and Morganella morganii—development and evaluation of predictive models. International Journal of Food Microbiology, 128(2), 234-243.

Ercan, S. Ş., Soysal, Ç., & Bozkurt, H. (2017). Gıdalarda bulunan biyojen aminlerin insan sağlığı üzerine etkileri. Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 3(2), 534-550.

Ercan, S. Ş., Soysal, Ç., & Bozkurt, H. (2017). Gıdalarda bulunan biyojen aminlerin insan sağlığı üzerine etkileri. Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 3(2), 534-550.

Es'haghi Gorji, M., Noori, N., Nabizadeh Nodehi, R., Jahed Khaniki, G., Rastkari, N., & Alimohammadi, M. (2014). The evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil effect on biogenic amines formation and microbiological profile in Gouda cheese. *Letters in Applied Microbiology*, *59*(6), 621–630. https://doi.org/10.1111/lam.12319

Farag, I., Amer, A., & Makarem, H. (2019). Biogenic Amines Pattern in Ras Cheese During Ripening Period. Alexandria Journal of Veterinary Sciences, 61(1), 93. https://doi.org/10.5455/ajvs.17254

Fernández, M., del Río, B., Linares, D. M., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2006). Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria: Use in Cheese Production. *Journal of Dairy Science*, *89*(10), 3763–3769. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72417-1

Fernández, M., Linares, D. M., & Alvarez, M. A. (2004). Sequencing of the Tyrosine Decarboxylase Cluster of Lactococcus lactis IPLA 655 and the Development of a PCR Method for Detecting Tyrosine Decarboxylating Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection*, *67*(11), 2521–2529. https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.11.2521

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.

Flasarová, R., Pachlová, V., Buňková, L., Menšíková, A., Georgová, N., Dráb, V., & Buňka, F. (2016). Biogenic amine production by Lactococcus lactis subsp. cremoris strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*, *194*, 68–75. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.069

Floris, G., & Agro, A. F. (2013). Amine oxidases.

Gezginc, Y., Akyol, I., Kuley, E., & Özogul, F. (2013). Biogenic amines formation in Streptococcus thermophilus isolated from home-made natural yogurt. *Food Chemistry*, *138*(1), 655–662. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.138

Givanoudi, S., Heyndrickx, M., Depuydt, T., Khorshid, M., Robbens, J., & Wagner, P. (2023). A review on bio-and chemosensors for the detection of biogenic amines in food safety applications: the status in 2022. Sensors, 23(2), 613.

Glória, M.B.A. (2005). Bioactive amines, H. Hui and L.L.Nollet, (Eds.), Handbook of Food Science, Technology and Engineering, Taylor & Francis, New York, Vol.1, pp. 13-32. ISBN:9781420027518

Gonzaga, V. E., Lescano, A. G., Huamán, A. A., Salmón-Mulanovich, G., & Blazes, D. L. (2009). Histamine Levels in Fish from Markets in Lima, Perú. *Journal of Food Protection*, *72*(5), 1112–1115. https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.1112

Grembecka, M. (2015). Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *European Food Research and Technology*, *241*(1), 1–14. https://doi.org/10.1007/s00217-015-2437-7

Guarcello, R., Diviccaro, A., Barbera, M., Giancippoli, E., Settanni, L., Minervini, F., Moschetti, G., & Gobbetti, M. (2015). A survey of the main technology, biochemical and microbiological features influencing the concentration of biogenic amines of twenty Apulian and Sicilian (Southern Italy) cheeses. *International Dairy Journal*, *43*, 61–69. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.11.007

Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, *5*(2), 42-49..

Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martin, M. C., Ladero, V., & 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. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002

Huang, C. H., Hsieh, C. Y., Lee, Y. C., Ou, T. Y., Chang, T. H., Lee, S. H., ... & Tsai, Y. H. (2022). Inhibitory effects of high-hydrostatic-pressure processing on growth and histamine formation of histamine-forming bacteria in yellowfin tuna meat during storage. Biology, 11(5), 702.

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.

Kim, J. H., Ahn, H. J., Jo, C., Park, H. J., Chung, Y. J., & Byun, M. W. (2004). Radiolysis of biogenic amines in model system by gamma irradiation. Food Control, 15(5), 405-408.

Kim, J. Y., Kim, D., Park, P., Kang, H. I., Ryu, E. K., & Kim, S. M. (2011). Effects of storage temperature and time on the biogenic amine content and microflora in Korean turbid rice wine, Makgeolli. Food Chemistry, 128(1), 87-92.

Komori, H., & Higuchi, Y. (2015). Structural insights into the O_2 reduction mechanism of multicopper oxidase. *Journal of Biochemistry*, *158*(4), 293–298. https://doi.org/10.1093/jb/mvv079

Kudanga, T., Nugroho Prasetyo, E., Sipilä, J., Eberl, A., Nyanhongo, G. S., & Guebitz, G. M. (2009). Coupling of aromatic amines onto syringylglycerol β-guaiacylether using Bacillus SF spore laccase: A model for functionalization of lignin-based materials. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *61*(3–4), 143–149. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.06.003

Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernandez, M., & A. Alvarez, M. (2010). Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition & Food Science*, *6*(2), 145–156. https://doi.org/10.2174/157340110791233256

Ladero, V., Fernández, M., & Alvarez, M. A. (2009). Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheeses. *International Dairy Journal*, *19*(12), 759–762. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.05.010

Landete, J. M., de las Rivas, B., Marcobal, A., & Muñoz, R. (2007). Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*, *117*(3), 258–269. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.001

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), 2570. https://doi.org/10.3390/microorganisms9122570

Lee, J.-I., & Kim, Y.-W. (2013). Characterization of amine oxidases from Arthrobacter aurescens and application for determination of biogenic amines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(4), 673–682. https://doi.org/10.1007/s11274-012-1223-y

Leuschner, R. G., Heidel, M., & Hammes, W. P. (1998). Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, *39*(1–2), 1–10. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00109-8

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, C., Wang, C., Deng, J., Wang, D., Huang, H., Zhao, Y., & Chen, S. (2024). Inhibition of Biogenic Amines in Fermented Tilapia Surimi by Collaborative Fermentation of Latilactobacillus sakei and Pediococcus acidilactici. *Foods*, *13*(20), 3297. https://doi.org/10.3390/foods13203297

Li, L., Wen, X., Wen, Z., Chen, S., Wang, L., & Wei, X. (2018). Evaluation of the Biogenic Amines Formation and Degradation Abilities of Lactobacillus curvatus From Chinese Bacon. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01015

Li, L., Wen, X., Wen, Z., Chen, S., Wang, L., & Wei, X. (2018). Evaluation of the biogenic amines formation and degradation abilities of Lactobacillus curvatus from Chinese bacon. Frontiers in Microbiology, 9, 1015.

Linares, D. M., Martín, M., Ladero, V., Alvarez, M. A., & Fernández, M. (2011). Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *51*(7), 691–703. https://doi.org/10.1080/10408398.2011.582813

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

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.

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.

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.

Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., & Meerdink, G. (2010). Control of biogenic amines in food—existing and emerging approaches. Journal of food science, 75(7), R139-R150.

Ni, X., Chen, J., Du, G., & Fang, F. (2022). Food-grade expression of multicopper oxidase with improved capability in degrading biogenic amines. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 1-11.

O'Sullivan, D. J., Fallico, V., O'Sullivan, O., McSweeney, P. L. H., Sheehan, J. J., Cotter, P. D., & Giblin, L. (2015). High-throughput DNA sequencing to survey bacterial histidine and tyrosine decarboxylases in raw milk cheeses. *BMC Microbiology*, *15*(1), 266. https://doi.org/10.1186/s12866-015-0596-0

Olmeda, I., Casino, P., Collins, R. E., Sendra, R., Callejon, S., Huesa, J., ... & Pardo, I. (2021). Structural analysis and biochemical properties of laccase enzymes from two Pediococcus species. Microbial Biotechnology, 14(3), 1026-1043.

Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. Food chemistry, 103(4), 1475-1486.

Ordóñez, A. I., Ibáñez, F. C., Torre, P., & Barcina, Y. (1997). Formation of Biogenic Amines in Idiazábal Ewe's-Milk Cheese: Effect of Ripening, Pasteurization, and Starter. *Journal of Food Protection*, *60*(11), 1371–1375. https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.11.1371

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.

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.

Rodriguez, M., Carneiro, C., Feijó, M., Júnior, C., Mano, S. (2014). Bioactive amines: Aspects of quality and safety in food. Food and Nutrition Science, 5(2), 138- 146.

Santos, M. H. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, *29*(2–3), 213–231. https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1

Sanz-Vicente, I., Rivero, I., Marcuello, L., Montano, M. P., de Marcos, S., & Galbán, J. (2023). Portable colorimetric enzymatic disposable biosensor for histamine and simultaneous histamine/tyramine determination using a smartphone. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 415(9), 1777-1786.

Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. (2011). *EFSA Journal*, *9*(10), 2393. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393

Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, *29*(7), 675–690. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(96)00066-X

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

Sharma, P., Goel, R., & Capalash, N. (2007). Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*(6), 823–832. https://doi.org/10.1007/s11274-006-9305-3

Stratton, J. E., Hutkins, R. W., & Taylor, S. L. (1991). Biogenic Amines in Cheese and other Fermented Foods: A Review. *Journal of Food Protection*, *54*(6), 460–470. https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.6.460

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.

Tailor SAN, Shulman KI, Walker SE, Moss J and Gardner D. Hypertensive Episode Associated with Phenelzine and Tap Beer-A Reanalysis of the Role of Pressor Amines in Beer. Journal of Clinical Psychopharmacology. 1994; 14(1): 5–14.

Taylor SL. Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. World Health Organization. 1985; WPH/FOS/85: 11, I-47.

Taylor SL. Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. World Health Organization. 1985; WPH/FOS/85: 11, I-47.

Tırıs, G., Yanıkoğlu, R. S., Ceylan, B., Egeli, D., Tekkeli, E. K., & Önal, A. (2023). A review of the currently developed analytical methods for the determination of biogenic amines in food products. Food Chemistry, 398, 133919.

Turna, N. S., Chung, R., & McIntyre, L. (2024). A review of biogenic amines in fermented foods: Occurrence and health effects. Heliyon.

Valsamaki, K., Michaelidou, A., & Polychroniadou, A. (2000). Biogenic amine production in Feta cheese. Food Chemistry, 71(2), 259–266. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00168-0

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.

Wunderlichová, L., Buňková, L., Koutný, M., Jančová, P., & Buňka, F. (2014). Formation, degradation, and detoxification of putrescine by foodborne bacteria: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13(5), 1012-1030

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı: **Doğum tarihi:** **Doğum Yeri:** **Uyruğu:** **Adres:** **Tel:** **E-mail:**	Ammar Rafiq Qasem ALMANSOUR
Eğitim	
Lise: **Lisans:** **Yüksek lisans:**	
Yabancı Dil Bilgisi	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	