

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**FERMENTE ZEYTİNLERDEN FARKLI BİYOJEN AMİN ÜRETİCİSİ
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER
TANIMLANMASI**

Gülsüm ATASOY

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2024**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

FERMENTE ZEYTİNLERDEN FARKLI BİYOJEN AMİN ÜRETİCİSİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER TANIMLANMASI

Gülsüm ATASOY

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rahmi Ertan ANLI

Ülkemizde fermente zeytin üretimi açısından önem taşıyan çeşitli illerdeki üreticilerden toplam 63 farklı zeytin örneği temin edilmiştir. Örneklerden toplam 119 adet bakteri izole edilmiştir. Bu izolatların 101 adedi laktik asit bakterisi (LAB) olarak doğrulanmıştır. İzolatların 30 adedi *Enterococcus* spp., 46 adedi *Lactococcus* spp. ve 25 adedi *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanmıştır. Histidin, tirozin, lizin, ornitin ve triptofan ilave edilmiş modifiye dekarboksilaz besiyerinde izolatların dekarboksilaz aktiviteleri test edilmiştir. Bu kapsamda, 66 LAB suşu tarafından en çok dekarboksile edilen aminoasit tirozin bulunmuştur. En az dekarboksile edilen aminoasitin ise histidin olduğu saptanmıştır. LAB suşları tarafından üretilen biyojen amin konsantrasyonu HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) cihazı ile kantitatif olarak belirlenmiştir. İzolatlar 0,448-257,939 mg/L ve 0.400-148,718 mg/L değerleri arasında sırasıyla tiramin ve putresin üretmiştir. Üretilen maksimum histamin miktarı ise 0,873 mg/L'dir. Triptamin ve kadaverin konsantrasyonları ise sırasıyla 0.374-25.183 mg/L ve 0.549-13.923 mg/L arasında değişkenlik göstermektedir. 20 LAB suşunun 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanımlaması yapılmıştır. İzolatların 14'ü (%70) *Enterococcus faecalis*, 3'ü (%15) *Enterococcus lactis* ve 3'ü *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır.

Temmuz 2024, 100 sayfa

Anahtar kelimeler: Biyojen amin, fermente zeytin, HPLC, laktik asit bakterisi, 16S rDNA

ABSTRACT

PhD Thesis

ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA PRODUCING BIOGEN AMINE FROM FERMENTED OLIVES

Gülsüm ATASOY

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

Supervisor: Prof. Dr. Rahmi Ertan ANLI

A total of 63 different olive samples were obtained from producers in various provinces that are important for fermented olive production in our country. A total of 119 bacteria were isolated from the samples. 101 of these isolates were confirmed as lactic acid bacteria (LAB). These isolates were identified as follow; 30 *Enterococcus* spp., 46 *Lactococcus* spp. and 25 *Lactobacillus* spp. Decarboxylase activities of the isolates were tested using modified decarboxylase medium supplemented with histidine, tyrosine, lysine, ornithine and tryptophan. In this context, the most decarboxylated amino acid by 66 LAB strains was tyrosine. It was determined that the least decarboxylated amino acid was histidine. The concentration of biogenic amines produced by LAB strains was determined quantitatively with the HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) device. The isolates produced tyramine and putrescine at values between 0.448-257.939 mg/L and 0.400-148.718 mg/L, respectively. The maximum amount of histamine produced is 0.873 mg/L. Tryptamine and cadaverine concentrations vary between 0.374-25.183 mg/L and 0.549-13.923 mg/L, respectively. By 16S rDNA sequence analysis, 20 LAB strains were identified at the species level and 14 of them (70%) were identified as *Enterococcus faecalis*, 3 of them (15%) *Enterococcus lactis* and 3 (15%) as *Enterococcus faecium*.

July 2024, 100 pages

Key Words: Biogenic amine, fermented olive, HPLC, lactic acid bacteria, 16S rDNA

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Rahmi Ertan ANLI'ya, çalışmalarım süresince maddi manevi desteklerini esirgemeyen, değerli görüşleriyle tezimin şekillenmesinde katkıda bulunan Ankara Üniversitesi Gıda mühendisliği Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA'ya ve kromatografi analizlerinin yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Öğr. Gör. Ozan HALİŞÇELİK'e,

Laboratuvar çalışmalarımın daha verimli ve keyifli geçmesini sağlayan, yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Dr. Esra ŞENTÜRK'e, Dr. Simge AKTOP'a, Gıda Yük. Müh. Burcu ÇOBAN'a, Gıda Yük. Müh. Elif ÇAKMAK'a, Gıda Yük. Müh. Elif ÇAPAR'a, Gıda Yük. Müh. Gamze ERGEZEN'e, Gıda Yük. Müh. Seda SEYİRT'e,

Çalışmalarım süresince bir çok fedakarlık göstererek beni destekleyen, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan biricik ailem başta annem Şerife ATASOY'a, babam Recep ATASOY'a, kardeşlerim Yusuf ATASOY, Mustafa Kemal ATASOY'a, çocukluğumdan itibaren derslerimle ilgilenen, doktora başlamam için beni cesaretlendiren ve kayıt olmaya dahi beraber gittiğim Kırıkkale Üniversitesi Keskin Meslek Yüksekokulu Dr. Öğretim Üyesi amcam Ali ATASOY'a, senelerdir her zaman yanımda olan dostlarım Hilal YILMAZ ve Beyza Nur TOPRAK'a ve son olarak, 2023 yılında yollarımızın kesiştiği sevgili müstakbel eşim Melih ÖZÇELİK'e en derin duygularla teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında, 100/2000 YÖK Doktora Burs Programı ve TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2211-A Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında, desteklerinden dolayı Yüksek Öğretim Kurumu (YÖK) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim. Ayrıca, 21L0443014 numaralı 'Fermente Zeytinlerden Farklı Biyojen Amin Üreticisi Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Moleküler Tanımlanması' isimli Lisansüstü Tez Projesi (Doktora)'nin gerçekleştirilmesinde katkılarından dolayı, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne de teşekkür ederim.

Gülsüm ATASOY
Ankara, Temmuz 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Biyojen Aminler ve Genel Özellikleri.....	4
2.1.1 Histamin	7
2.1.2 Tiramin	8
2.1.3 Putresin ve kadaverin	9
2.1.4 Triptamin	10
2.2 Gıdalarda Biyojen Amin Oluşumu.....	11
2.2.1 Biyojen amin oluşumuna etki eden çevresel faktörler.....	11
2.3 Amino Asit Dekarboksilaz Üreticisi Mikroorganizmalar	13
2.3.1 Enterokoklar.....	14
2.3.2 Laktobasiller	15
2.3.3 Laktokoklar	15
2.4 Fermente Zeytin	16
2.4.1 Fermente zeytinlerle ilişkili mikrobiyota	17
2.4.2 Fermente zeytinde biyojen amin.....	17
2.5 Biyojen Aminlerin Tayinini İçeren Teknikler	18
2.5.1 Biyojen aminlerin doğrudan tespit teknolojisi	18
2.5.2 Biyojen aminlerin tespiti için moleküler teknolojiler	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	22
3.1 Materyal	22
3.1.1 Gıda örnekleri	22
3.1.2 Kimyasallar ve besiyerleri.....	22
3.2 Yöntem	23

3.2.1 LAB izolasyonu	23
3.2.2 İzolatlarının morfolojik yolla ön tanımlamasının yapılması.....	24
3.2.2.1 Gram boyama	24
3.2.2.2 Katalaz testi	24
3.2.3 LAB suşlarının aminoasit dekarboksilaz aktivitesinin belirlenmesi.....	25
3.2.3.1 Stok kültürlerin hazırlanması.....	26
3.2.4 LAB izolatlarının biyojen amin üretim miktarlarının HPLC metodu ile belirlenmesi	27
3.2.4.1 HPLC cihazı.....	27
3.2.4.2 Biyojen amin standart çözeltilerin hazırlanması	28
3.2.4.3 Mobil faz	29
3.2.4.4 Örnek hazırlama ve türevlendirme	29
3.2.5 Bazı LAB suşlarının 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde moleküler tanısı.....	30
3.2.5.1 DNA izolasyonu	30
3.2.5.2 16S rDNA gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması	31
3.2.5.3 PZR ürünlerinin saflaştırılması (PZR clean-up).....	32
3.2.5.4 16S rDNA gen bölgelerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ...	32
3.2.5.5 PZR ürünlerinin dizilenmesi.....	33
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	34
4.1 LAB Suşlarının İzolasyonu ve Biyokimyasal Tanımlanması	34
4.2 LAB İzolatlarının Aminoasit Dekarboksilaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	39
4.3 LAB Suşları Tarafından Üretilen Biyojen Amin Miktarının Saptanması	45
4.3.1 Biyojen aminlerin kalibrasyon grafikleri	45
4.3.2 Biyojen amin miktarlarının saptanması	47
4.4 LAB Suşlarının 16S rDNA Dizi Analizi İle Moleküler Düzeyde Tanımlanması.....	52
5. SONUÇ.....	59
KAYNAKLAR	62
EKLER.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	99

SİMGELER DİZİNİ

pH	: Asitlik Derecesi
B	: Beta
>	: Büyük
dk	: Dakika
°	: Derece
FL	: Floresan
g	: Gram
G (-)	: Gram-Negatif
G (+)	: Gram-Pozitif
kb	: Kilobaz
kg	: Kilogram
<	: Küçük
L	: Litre
µL	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
ppm	: Parts Per Million
M	: Molar
mA	: Miliamper
Nm	: Nanometre
N	: Normal
psi	: Pounds Per Square Inch
°C	: Santigrad Derece
spp.	: Species
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
vd.	: Ve Diğerleri
%	: Yüzde

Kısaltmalar

ATCC	: American Type Culture Collection
BLAST	: Basic Local Alingment Search Tool
BA	: Biyojen Amin
BAI	: Biyojenik Amin İndeksi
CAD	: Kadaverin
CE	: Kapiler Elektroforez
DAD	: Diode Array Dedektörü
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DAO	: Diamin Oksidaz

EFSA	: European Food Safety Authority
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAO	: Food and Agriculture Organization of United Nations
FDA	: Food and Drug Administration
GC	: Gas Chromatography
GRAS	: Generally Recognized as Safe
HIS	: Histamin
HMT	: Histamin-N-metiltransferaz
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IEC	: Ion Exchange Chromatography
KOB	: Koloni Oluşturma Birimi
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LC	: Liquid Chromatography
MAO	: Monoamin Oksidaz
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PUT	: Putresin
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
NaCl	: Sodyum Klorür
Rpm	: Revolutions Per Minute
RT-PCR	: Real Time PCR
S	: Siyah Zeytin
TLC	: Thin Layer Chromatography
TRP	: Triptamin
TYR	: Tiramin
Y	: Yeşil Zeytin
w/v	: Hacimde Ağırlıkça Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Biyojen amin üreticisi izolatların, aminoasit içeren dekarboksilaz broth besiyerinde kontrol grubuna göre renk değişimi	26
Şekil 3.2 HPLC cihazı.....	27
Şekil 4.1 Aminoasit dekarboksilaz testi	39
Şekil 4.2 Dekarboksilaz sıvı besiyerinde LAB suşlarının biyojen amin üretim sayısı ...	42
Şekil 4.3 Tiramin kalibrasyon grafiği	45
Şekil 4.4 Kadaverin kalibrasyon grafiği.....	46
Şekil 4.5 Putresin kalibrasyon grafiği	46
Şekil 4.6 Triptamin kalibrasyon grafiği	47
Şekil 4.7 48BM nolu LAB izolatının kromatogramı	50
Şekil 4.8 LAB suşları tarafından üretilen biyojen aminlerin konsantrasyona göre sayıca dağılımı.....	51
Şekil 4.9 PZR ile çoğaltılan LAB suşlarının 16S rDNA fragmentleri.....	52
Şekil 4.10 Enterokok suşlarının tür düzeyinde yüzdelik dağılımı	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 HPLC cihazının özellikleri ve kromatografik koşullar	28
Çizelge 3.2 PZR için kullanılan mastermix bilgileri.....	31
Çizelge 3.3 PZR reaksiyonu için kullanılan primer bilgileri	31
Çizelge 3.4 PZR için kullanılan reaksiyon koşulları.....	32
Çizelge 3.5 PZR clean-up reaksiyonu koşulları	32
Çizelge 4.1 KAA, M-17 ve MRS Agar'dan izole edilen LAB izolatlarının biyokimyasal test sonuçları	35
Çizelge 4.2 Fermente zeytin örneklerinden izole edilen LAB izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri	40
Çizelge 4.3 Fermente zeytin örneklerinden izole edilen LAB izolatlarının oluşturdukları hedef biyojen aminlerin konsantrasyonları.....	48
Çizelge 4.4 LAB suşlarının 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre tür düzeyinde tanımlanması	54
Çizelge 4.5 Tanımlanan LAB suşlarının ürettikleri biyojen amin konsantrasyonları.....	55

1. GİRİŞ

Biyojen aminler (BA), genellikle gıdalardaki bazı amino asitlerin istenmeyen mikrobiyel dekarboksilasyon aktivitesi ile üretilen, aynı zamanda vücutta birikebilen, biyolojik olarak aktif, düşük moleküler ağırlıklı, nitrojen içeren bileşiklerdir (Zaman vd. 2011; Linares vd. 2016). Çoğunlukla enzimatik amino asit dekarboksilasyonu ile oluşmalarının yanı sıra, keton ve aldehitlerin indirgeyici aminasyonu yoluyla da gıdalarda meydana gelirler (Park vd. 2019). Fermantasyon sürecinde mikroorganizmaların etkisiyle, bu gıdalar önemli miktarda biyojen amin içerebilirler (Ishimaru vd. 2019). Laktik asit bakterileri (LAB) fermente gıdalarda biyojen aminlerin ana üreticileridir. Özellikle *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ve *Leuconostoc* cinsleri yüksek dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip suşlara sahiptirler (Simon Sarkadi, 2019; Emer vd. 2021).

Biyojen aminler, genellikle yüksek proteinli doğal fermente gıdalarda zararlı bileşikler sınıfına dahildirler. Dolayısıyla, bireysel hassasiyete bağlı olarak kişiler üzerinde çeşitli toksik etkilere neden olabilirler (Li ve Lu, 2020). Bu bileşikler, genellikle balık ve balıkçılık ürünleri (fermente sardalya vb.), fermente meyve ve sebzeler (fermente zeytin, soya sosu ve lahana turşusu vb.), peynir, fermente sosis ve alkollü içeceklerde bulunurlar (Durak-Dados vd. 2020; Li ve Lu, 2020; Vasconcelos vd. 2021; Visciano ve Schirone, 2022). Fermente gıdalarda en yaygın bulunan biyojen aminler; kadaverin, putresin, tiramin, histamin, triptamin, β -feniletilamin, agmatin, spermin ve spermidindir (Biji vd. 2016). Protein içeren herhangi bir gıda grubunda bulunan bu bileşiklerin seviyesi aynı zamanda, hijyenik kalitenin de bir belirtecidir (Durak-Dados vd. 2020). Dolayısıyla, yüksek seviyede gıdalarda bulunması düşük kalite ile ilişkilidir ve ürünlerde çok sayıda istenmeyen bakterinin varlığını, hatta ham maddelerin işlenmesi sırasında hijyen gerekliliklerine yeterince uyulmadığını gösterir (Durak-Dados vd. 2020; Vasconcelos vd. 2021).

Akdeniz ülkelerinde sofralık zeytin, en çok tüketilen fermente ürünlerden biridir. Fermente zeytin, biyoaktif içeriği ve besin değeri nedeniyle fonksiyonel bir gıda olarak kabul edilir (Panebianco ve Caridi, 2021). Son yıllarda, fermente zeytin tüketimi ile ilgili beslenme ve güvenlik konuları hem bilim camiasının hem de, tüketicilerin ilgisini çekmektedir (Tofalo vd. 2012). Laktik asit ve diğer organik asitleri üretebilen homo- ve hetero-fermentatif LAB, zeytindeki en önemli bakteri grubudur (Bleve vd. 2015). Bu bakteri grubunun bazı üyeleri, farklı gıda maddelerinin fermantasyon süreçleri sırasında, dekarboksilaz aktivitesi yoluyla serbest amino asitleri biyojen aminlere dönüştürebilirler. Diğer yandan, laktik asit bakterileri fermente gıdaların lezzetini, dokusunu, besin değerini arttırmasının yanı sıra, biyolojik olarak korunmasını da sağlarlar (Özogul ve Hamed, 2018). Genellikle, bu bakteri grubunun fermente gıdalarda insan sağlığı açısından tehlikeli olabilecek seviyede tiramin ve histamin oluşturduğu farklı çalışmalar ile belirlenmiştir (Simon Sarkadi, 2019).

Son yıllarda, çeşitli gıdalarda biyojen amin içeriğinin ölçülmesine yönelik teknikler büyük ilgi görmüştür (Ishimaru vd. 2019). Gıdalardaki bu toksik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayini için; gaz, iyon değiştirme, ince tabaka kromatografisi, özellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi çeşitli analitik yöntemler kullanılmaktadır. Biyosensörler ve enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) dahil olmak üzere immünojenik testler, nispeten daha modern araçlar olarak kullanılmaya başlanmıştır (Simon Sarkadi, 2019). Bunlar arasında, özellikle HPLC yöntemleri, yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip olduğundan gıdalardaki çoklu biyojen amin içeriklerini belirlemek için oldukça kullanışlıdır. Biyojen amin analizi için sıklıkla kullanılan yöntemler; türevlendirme reaksiyonlarına, bir ayırma işlemine ve son olarak floresan (FL) veya ultraviyole (UV) saptamaya dayanır (Ishimaru vd. 2019). Bununla birlikte, moleküler belirleme yöntemleri olarak 16S rDNA dizi analizi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve eş zamanlı PCR (RT-PCR) kullanılmaktadır (Aktop, 2022).

Bu çalışma kapsamında;

1. Ülkemizde Mersin, Antalya, Bursa, Muğla ve Kocaeli illerindeki üreticilerden temin edilen fermente zeytin örneklerinden (siyah ve/veya yeşil zeytin) muhtemel LAB izolasyonu ve biyokimyasal ön tanımlamasının yapılması,
2. Fermente zeytinlerden izole edilecek olan LAB suşlarının histamin, tiramin, triptamin, putresin ve kadaverin üreticisi olup olmadığının tespit edilmesi,
3. Üretici LAB suşları tarafından üretilen biyojen amin miktarlarının HPLC yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmesi,
4. Son olarak, bazı LAB suşlarının 16S rDNA dizi analizi ile moleküler olarak tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyojen Aminler ve Genel Özellikleri

Biyojen aminler (BA) balık, peynir, sosis ve işlenmiş etin yanı sıra; fermente edilmiş sebze/meyve ve içecek gibi birçok gıdada yüksek konsantrasyonlarda bulunan organik bileşiklerdir (Costantini vd. 2019). Bu bileşikler, endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılırlar. Eksojen poliaminler, mikroorganizmaların aracılık ettiği dekarboksilasyon ile sentezlenirler. Endojen poliaminler ise normal bitki/hayvanların hücresel metabolizması ile oluşur (Vinci ve Maddaloni, 2020).

Biyojen aminler; bireylerin vücut sıcaklığının düzenlenmesinde, sinir sisteminde, bağışıklık tepkisinde, kardiyovasküler sistemde (kan basıncında), düzenleyici genlerin ifadesinde, hücre büyümesi ve farklılaşmasında, gastrik salgılarda ve son olarak, enflamatuar süreçler olmak üzere çeşitli biyolojik işlevlere sahiptirler (Vasconcelos vd. 2021). Buna karşın, bu bileşiklerin insan vücudunda fazla miktarda birikmesi sonucu olumsuz etkilerini göz önünde bulundurularak, gıda sistemlerine göre farklı şekilde ele alınmalıdır (Li ve Lu, 2020; Vinci ve Maddaloni, 2020).

Biyojen aminler ökaryotik hücrelerin çeşitli fizyolojik işlevlerini yerine getirdiğinden, gıda tüketimi ile vücuda alımı çok doğaldır (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014). Üründeki biyojen amin konsantrasyonu çok yüksek olduğunda veya bireydeki detoksifikasyon sistemi bozulduğunda, bu bazik bileşikler insan sağlığı sorunlarından sorumlu toksik metabolitler haline gelirler (Linares, 2012). Fermente ürünlerde normal miktarlarda bulunan bu bazik aminler (neredeyse <100 mg/Kg veya mg/L) sağlıklı bireylerin bağırsak mukozasında bulunan üç farklı enzim tarafından hızla detoksifiye edilir (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014; Pleva vd. 2012). Bu enzimler; tercihen oksitlenen amino gruplarının sayısına bağlı olarak monoamin oksidazlar (MAO), diamin oksidazlar (DAO) ve histamin-N-metiltransferaz (HMT)'dir (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014; Vinci ve Maddaloni, 2020).

Mikrobiyel fermentasyon ürünleri yüksek miktarda biyojen amin içerirler (Sarkadi, 2019). Fermente ürünlerde bulunan en yaygın biyojen aminler: histamin (HIS), triptamin (TRP), kadaverin (CAD), tiramin (TYR), putresin (PUT), β -fenilettilamin (PHE), spermidin (SPD) ve spermindir (SPM). Spermin ve spermidin poliamin, diğer aminler ise mono-amin (PHE ve TYR) veya di-amin (HIS, TRP, PUT ve CAD) olarak sınıflandırılırlar. Kimyasal yapılarına göre ise; aromatik aminler (TRP ve PHE), yağ aminleri (PUT, CAD, SPM ve SPD) ve siklik aminler (TYR ve HIS) olmak üzere üçe ayrılırlar (Li ve Lu, 2020). Histamin ve tiramin, fizyolojik olarak en önemli biyojenik aminlerdir (Simon Sarkadi, 2019). Putresin ve kadaverin ise, temel olarak mikrobiyel gelişim ve bozulma göstergeleri olarak incelenirler. Bu sebeple, fermente gıdalarda biyojen aminlerin tespit edilmesinin, gıda tazeliği ve kalitesinin sağlanması üzerine önemli etkisi bulunur (Vasconcelos vd. 2021).

Biyojen amin bakımından karşılaşılabilecek en önemli risk, kontrolsüz mikrobiyel aktivitenin bir sonucu olarak fermente gıdalarda yüksek konsantrasyonlarda birikebilmeleri, detoksifikasyon mekanizmalarının kapasitesini aşması ve tüketiciler üzerinde toksik etki göstermeleridir (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014). Bireysel toksisite birkaç biyojen amin kombinasyonu ile arttığından, insan organizması için kabul edilebilir günlük dozu hesaplamak neredeyse imkansızdır. Aşırı miktarda vücuda alımın neden olduğu semptomlar, yalnızca histamin ve diğer aminlere karşı duyarlılığı daha fazla olan kişilerde ortaya çıkmaz. Bu semptomlar, gıda zehirlenmesine çok benzemekle birlikte belirtilerin süresi tüketiciler için az ya da çok ciddi sonuçlarla 8 ila 12 saat arasında değişebilir. Ancak, bu semptomlar hızla kaybolurlar. Bu nedenle, onları diğer hastalıklardan ayırt etmek oldukça zordur (Vinci ve Maddaloni, 2020).

Histamin; baş ağrısı, hipotansiyon ve sindirim sorunlarına yol açma kabiliyeti nedeniyle üzerinde en çok çalışılan biyojen amindir. Tiramin ise sıklıkla migren ve hipertansiyon ile ilişkilendirilir. Öte yandan, putresin ve kadaverin daha düşük farmakolojik aktiviteye sahiptir. Ancak, bu di-aminler amin oksidazlarla etkileşime girerek histamin ve tiraminin toksik etkilerini artırabilir (Ordóñez vd. 2016). Buna karşın, kadaverin ve putresin hem bitkisel hem de hayvansal gıdalarda düşük miktarlarda sentezlenebildikleri için bazı gıdalarda endojen amin olarak kabul edilirler (Toro-Funes vd. 2015).

Di-amin ve poli-aminler, gıdaların tazeliğinin ve kalitesinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Mietz ve Karmas (1977) balık depolama sırasında kadaverin, putresin ve histamindeki artışlara; spermin ve spermidinde ki düşüslere dayalı bir kalite indeksi (BAI: Biyojenik Amin İndeksi) öneren ilk kişilerdir. Bu indeks, aşağıdaki denklem ile ifade edilmiştir (Simon Sarkadi, 2019).

$$BAI = \frac{\text{histamin} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) + \text{putresin} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) + \text{kadaverin} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right)}{1 + \text{spermidin} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) + \text{spermin} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right)}$$

BAI'ne göre; etin tazelik kalitesi şu şekilde değerlendirilmektedir:

- BAI < 5 ise yüksek kaliteli taze et,
- BAI'nın 5 - 20 arasında olması, ilk bozulma belirtileriyle birlikte kabul edilebilir kalitede et,
- BAI 20-50 olan etler düşük kaliteli et,
- BAI > 50 olan etler ise bozuk et olarak adlandırılmaktadır (Wunderlichová vd. 2014).

Mietz ve Karmas (1977)'a göre, balık için olması gereken BAI değeri 10'dur. Bu değer ile mikrobiyolojik kalite veya organoleptik kabul edilebilirlik arasında pozitif bir ilişki bulunduğundan, indeksin 10'u aşması bir tür kalite kaybı olarak kabul edilir (Simon Sarkadi, 2019; Biji vd. 2016). Biyojen aminlerin kalite indeksi olarak kullanılabilirliği, ürünün doğasına da bağlıdır. Tüm bozulma mikroorganizmaları serbest amino asitleri dekarboksile etmez ve aynı tür içinde bile tüm suşlar aynı dekarboksilasyon kapasitesini göstermez. Bu nedenle, düşük bir biyojen amin konsantrasyonu, iyi bir mikrobiyel kaliteye sahip bir ürünü temsil etmeyebilir (Biji vd. 2016).

Fermente gıdalarda işleme ve depolama sırasında biyojen amin oluşumu üzerine: a) substrat amino asitlerin mevcudiyeti, b) uygun metabolik yola sahip mikroorganizmaların varlığı (>6 log KOB/g) ve c) çevre koşulları olmak üzere üç faktör etkilidir (Linares, 2012; Akyol vd. 2015; Gardini vd. 2016). Serbest amino asitler, gıdalarda doğrudan

doğruya bulunabileceği gibi işleme veya depolama sırasında proteoliz ile serbest hale gelerek de ortaya çıkabilirler. Dekarboksilaz aktivitesine sahip mikroorganizmalar, bir gıdanın ilişkili florasının bir parçası olabilir veya gıdanın işlenmesinden önce ya da sonrasında kontaminasyon yoluyla bulaşabilirler (Simon Sarkadi, 2019).

Biyojen amin sentezi, genellikle Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler ile bazı mayalar (*Debaryomyces hansenii* ve *Pichia jadinii* vb.) ile ilişkilendirilmiştir. Ancak bu türlerin fermente gıdalarda bulunması, daha genel bir gıda güvenliği sorunudur. Dolayısıyla, fermente edilmemiş gıdalarda biyojen amin mikrobiyel bozulmanın bir göstergesi olarak kullanılır. Buna karşın, fermente gıdalar söz konusu olduğunda Gram-negatif bakteriler fermantasyon sürecinin doğal yapısından dolayı sıklıkla inhibe edilirler. Ancak, Gram-pozitif bakteriler ve özellikle laktik asit bakterileri (LAB), biyojen amin üretiminden sorumlu olarak ortaya çıkarlar (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014). Aslında, biyojen amin üretebilen laktik asit bakterileri (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Lactobacillus*) bu gıdaların normal mikrobiyotasıdır (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014; Ordóñez vd. 2016; Suzzi ve Gardini, 2003). Bununla birlikte, birçok durumda biyojen amin sentezleme kapasitesi belirli tür ve cinsler arasında daha yaygın olarak dağılan, suşa özgü bir özelliktir (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014).

2.1.1 Histamin

Balık etindeki yüksek histamin seviyeleri, trikarboksilik asidin ara maddelerine dönüştürülebilen serbest histidin aminoasidinin varlığı ile açıklanır (Vasconcelos vd. 2021). Histamin esas olarak şarap, peynir gibi çeşitli fermente ürünlerde LAB tarafından oluşturulur (Lee vd. 2016; Gardini vd. 2016).

Uskumru, ton balığı, palamut, sardalya, lüfer gibi Scombroideae familyasına ait balık türleri uygun şekilde işlenmediğinde veya depolanmadığında ‘Scombroid zehirlenmesi’ meydana gelir (Biji vd. 2016; Lee vd. 2016; Vasconcelos vd. 2021). Semptomlar arasında; aritmi, baş ağrısı, ishal, astım, burun konjonktiviti, ürtiker, kaşıntı ve kızarma gibi alerjik belirtiler yer alır (Pessione ve Cirrincione, 2016). Bu belirtiler, genellikle tüketimden birkaç saat sonra başlar ve 12 saatten birkaç güne kadar sürer. Semptomların

şiddeti, alınan toksinin konsantrasyonuna ve kişinin histamine duyarlılığına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Scambrotoksin, sıklıkla *Salmonella* enfeksiyonu ya da gıda alerjisi ile karıştırılmaktadır (Biji vd. 2016).

Histamin, mide-bağırsak sisteminde bulunan birçok reseptör üzerinde etkili olan güçlü bir hipotansif bileşiktir (Pessione ve Cirrincione, 2016). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından yasal olarak maksimum limitleri belirlenen tek amindir. Scambroid benzeri balıklarda maksimum limiti 200 mg/Kg ve balık ürünlerinde 400 mg/Kg olarak belirlenmiştir (Linares vd. 2016). Bununla birlikte, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA- Food and Drug Administration) Scambridae, Clupeidae, Engraulidae, Scambresosidae ve diğer balık türlerinde maksimum histamin seviyesini 50 mg/Kg olarak belirlemiştir (Park vd. 2019; Ding ve Li, 2024). Güney Kore ve Çin gibi bazı Asya ülkelerinde deniz ürünlerindeki biyojen amin içeriğine ilişkin kısıtlamalar ise sırasıyla; 200 mg/Kg ve 200-400 mg/Kg'dır (Park vd. 2019).

Bireylerde bir öğünde 8–100 mg aralığında veya üzerinde histamin alımının zehirlenmelere neden olabileceği belirlenmiştir (Biji vd. 2016). Ayrıca, bazı araştırmalar 75 mg saf oral histaminin herhangi bir hastalığa sahip olmayan kadınların yarısında semptomları tetiklediğini ve yaklaşık 1000 mg/Kg histaminin kesinlikle ciddi zehirlenmeye neden olduğunu göstermiştir (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014). Günümüzde maalesef çoğu araştırma öncelikle deniz ve balık ürünlerine odaklandığından, diğer fermente ürünlerde bulunan biyojen aminlerin izlenmesine yönelik düzenleyici bir mevzuat halen bulunmamaktadır (Park vd. 2019).

2.1.2 Tiramin

Tiramin, tirozin amino asidinin mikrobiyel enzimatik dekarboksilasyonu ile sentezlenir. Histamin ile birlikte, bireyler üzerinde en çok toksik özellik gösteren biyojen aminlerden biridir (Teepoo vd. 2019).

Tiramin, fermente gıda ürünlerinin çoğunun üretimi sırasında aktif olarak bulunan laktobasil, laktokok ve enterokok dahil olmak üzere çeşitli LAB ve bazı stafilokoklar tarafından sentezlenir (Torriani vd. 2008). Başta, *Lactobacillus buchneri*, *Lb. plantarum*, *Lb. alimentarius*, *Lb. bavaricus*, *Lb. sakei*, *Lb. farciminis* ve *Lb. curvatus* türleri tiramini kantitatif olarak üretirler. Bununla birlikte, enterokoklar söz konusu olduğunda bu cinse ait birçok suşun da tirozin aminoasidini dekarboksile ettiği belirlenmiştir (Suzzi ve Gardini, 2003).

1960'lı yıllarda bir İngiliz eczacı, monoamin oksidazlı (MOI)-ilaç kullanan eşinin peynir tüketiminden sonra şiddetli baş ağrısı çektiğini tespit etmiş ve tiramini 'peynir etkisi olarak tanımladığı durumdan sorumlu' tutmuştur. Bu nedenle, bu durum ilk olarak peynir tüketimi ile ilişkilendirildiği için "peynir reaksiyonu" olarak literatüre geçmiştir (Zhang vd. 2019; Vasconcelos vd. 2021; Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014). Bu etki migren, nörolojik bozukluklar, baş ağrısı, solunum bozuklukları ve hipertansiyon gibi birçok semptomlara neden olur (Zhang vd. 2019; Vasconcelos vd. 2021). Peynirin yanı sıra; et ürünleri, dana karaciğeri, salamura ringa balığı, tavuk, soya sosu, havyar ve miso gibi diğer yiyeceklerde de tiraminin neden olduğu zehirlenme vakaları görülmüştür (Durak-Dados vd. 2020).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından, gıdalarda yüksek seviyelerde bulunan tiramin (600 mg/Kg) ve 6 mg/Kg konsantrasyonun monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri ile tedavi edilen hastalar için toksik etki gösterdiği açıklamıştır (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014; Teepoo vd. 2019). Bu toksik etki, hassas olan kişilerde bağırsaktaki detoksifiye etme kapasitesinin azalması nedeniyle daha şiddetli olarak görülmektedir (Linares vd. 2016).

2.1.3 Putresin ve kadaverin

Fermente ürünlerde, ornitin ve lizin aminoasitlerinin mikrobiyel dekarboksilasyonu ile sırasıyla putresin ve kadaverin oluşur (Özogul ve Hamed, 2018). Bu enzim aktivitesine sahip suşlar genellikle *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae* ve *Staphylococcus* cinslerine

aittir (Mohedano vd. 2015). Kadaverin, gıdalarda di-amin ve poli-amin oluşumlarından sorumludur (Erdag vd. 2018).

Putresin ve kadaverin, DAO (di-amin oksidaz) inhibitörleri olarak rol oynarlar. Bu nedenle, bazı biyojen aminlerin (histamin ve triptamin) toksisitesini arttırıcı etki olarak hareket ederler (Özogul ve Hamed, 2018; Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014). Buna karşın, genellikle insan sağlığı üzerine herhangi bir olumsuz etkiye sahip değildirler. Ancak, nitrit ile reaksiyona girerek kanserojen nitrozamin oluşturabilirler (Biji vd. 2016).

Fermente gıdalarda kadaverin ve putresinin yüksek seviyeleri (50-100 mg/L), gıdanın organoleptik özellikleri üzerinde kötü bir etkiye sahip olmaktadır. Bu durumda, özellikle şarap üreticileri etkilenen şarapların çeşitli özelliklerini kaybettiğini ve bunun şarapta etimsi ve/veya kokuşmuş, metalik bir aroma oluşumuna neden olabileceğini belirtmişlerdir (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014).

2.1.4 Triptamin

Triptamin, triptofan amino asidinin mikrobiyel dekarboksilasyonu yoluyla oluşan, düşük molekül ağırlıklı (160.2 g/mol) biyojenik bir amindir (Costa vd. 2016; Del Rio vd. 2020). Yüksek dekarboksilaz aktivitesine sahip bazı *Lactobacillus* suşları ve *Micrococcus* cinsine ait bazı türler tarafından sentezlendiği belirlenmiştir (Mohedano vd. 2015).

Triptamin, histamini detoksifiye eden diamin oksidazı (DAO) inhibe ederek, histamin toksisitesini arttırır. Dolayısıyla, histamin açısından zengin fermente ürünlerde yüksek konsantrasyonda triptamin bulunması intoksikasyon riskini artırır. Potansiyel sağlık risklerine rağmen, gıda güvenliği kuruluşlarının triptamin için yasal sınırlar belirlemesine olanak tanıyacak çok az çalışma yapılmıştır. Bu nedenle, mevcut sınırların düzenlenmesi konusunda hukuki bir boşluk yer almaktadır (Del Rio vd. 2020).

2.2 Gıdalarda Biyojen Amin Oluşumu

Fermente ürünlerde biriken biyojen amin içeriği, hayvan ve bitki hücrelerinde doğal olarak oluşan endojen enzimlerin aktivitesiyle veya fermantasyon, işleme, depolama ve dağıtım sırasında amino asitlerin mikrobiyel dekarboksilasyonu olmak üzere iki biyokimyasal yolla katalize edilir (Durak-Dados vd. 2020; Gardini vd. 2016).

Özetle, bu bazik bileşiklerinin oluşumu:

- Dekarboksilasyon,
- Transaminasyon,
- İndirgeyici aminasyon ve
- Belirli öncü amino bileşiklerinin bozunması/indirgemesi olmak üzere dört enzimatik reaksiyon yoluyla gerçekleşebileceğinden, biyojen aminler ‘biyolojik olarak aktif’ moleküller olarak tanımlanırlar (Guo vd. 2015; Erdag vd. 2018).

Dekarboksilasyon mekanizması yoluyla biyojen amin üretimi için temel olarak iki yol bulunur. Bunlardan biri piridoksal fosfata bağımlı reaksiyon, diğeri ise piridoksal olmayan fosfata bağımlı reaksiyondur. Amino asit dekarboksilaz, esas olarak amino asitlerden birinci yolla biyojen aminler üretir (Liu vd. 2024). Spesifik bir dekarboksilaz enzimi; ana bileşen genleri, ters taşıma proteaz geni ve karşılık gelen amino asit-tRNA sentetaz olan bazı operonlar tarafından düzenlenir (Li ve Lu, 2020).

2.2.1 Biyojen amin oluşumuna etki eden çevresel faktörler

Gıdalarda mikrobiyel aktiviteleri; pH, tuz konsantrasyonu ve sıcaklık olmak üzere çeşitli çevresel faktörler etkiler. Dekarboksilaz enzimlerinin aktivitesi de bu parametrelere bağlıdır. Bu iki farklı durum için çevresel faktörlerin optimal değerleri farklı olabilir ve gıdadaki nihai biyojen amin miktarı, bu çifte etkinin bir sonucudur. Diğer bir deyişle,

amino-biogenetik bakterilerin gelişmesi biyojen amin üretimi için gerekli ancak yeterli olmayan bir koşuldur (Gardini vd. 2016).

Serbest amino asitlerin ve dekarboksilaz pozitif mikroorganizmaların mevcudiyeti, gıda ürünlerinde biyojen aminlerin oluşumunu doğrudan etkiler (Liu vd. 2024). Bunların yanı sıra, gıdalarda biyojen oluşumunu etkileyen diğer faktörler ise; substratların mevcudiyeti (amino asitler), atmosferik koşullar, NaCl içeriği ve fermente edilebilen karbonhidratların varlığı olarak belirtilmiştir (Durak-Dados vd. 2020; Akan ve Demirağ, 2018).

Fermente gıdalarda, biyojen amin oluşumu üzerine etkili olan en önemli faktörlerden biri sıcaklıktır. Düşük sıcaklıklarda hem mikrobiyel gelişim hem de enzim aktivitesinin azalması, biyojen amin sentezini sınırlar. Buna karşın, ortam sıcaklığının artması ile gıdada biyojen amin birikimi artar (Akan ve Demirağ, 2018). Mikroorganizmaların amino asit dekarboksilasyonu 20 °C ile 37 °C sıcaklık arasında hızlı gerçekleşir ancak, bu enzimler 40 °C'nin üzerinde aktivite gösteremezler (Fong vd. 2020; Akan ve Demirağ, 2018). Ayrıca, ortam sıcaklığının 5 °C'den düşük olması biyojen amin üretimini önemli ölçüde azaltır (Sahu vd. 2015).

Bargossi vd. (2015), *Enterococcus faecalis*'in tirozin dekarboksilaz aktivitesinin 30 ile 37°C arasındaki bir sıcaklıkta optimum aktiviteye sahip olduğunu belirlemiştir. Bununla birlikte, Santos (1996) *Enterobacter cloacae*'nin putresin biyosentezini 24 saatlik inkübasyondan sonra 20°C sıcaklıkta saptamıştır. Bu bağlamda, biyojen amin sentezi için optimum sıcaklık değerlerinin bakteri türlerine göre değişiklik gösterdiği ortaya çıkmıştır (Akan ve Demirağ, 2018).

Asitlik (pH), biyojen amin sentezini etkileyen bir diğer önemli faktörlerden biridir (Durak-Dados vd. 2020). Çünkü, pH gıdalarda mikrobiyel gelişimini engellediği gibi, enzim üretimi veya aktivitesini de durdurabilir (Akan ve Demirağ, 2018). Dekarboksilaz enzim aktivitesi, asidik koşullarda daha yüksektir (Durak-Dados vd. 2020).

Mikroorganizmaların amino asit dekarboksilasyonu, 20 °C ile 37 °C arasındaki sıcaklıklarda ve pH 4.0 ile 5.5 arasında değişen asit ortamlarında daha hızlı gerçekleşir (Fong vd. 2020; Sahu vd. 2015). Düşük ortam pH'ı daha yüksek biyojen amin içeriği ile ilişkilirken; düşük sıcaklıklar hem bakteri gelişimini, hem de dekarboksilaz aktivitesini azaltığı belirlenmiştir (Sahu vd. 2015).

Gıdalarda fermentasyon pH'nın düşmesine ve dolayısıyla, laktik asit bakteri grubunun dekarboksilaz aktivitesinin artmasına sebep olmaktadır. Ortamdaki % 3.0 (w/v)'ten fazla glukoz konsantrasyonunun dekarboksilaz enzim aktivitesini engellediği ancak, ortamdaki % 2.0 - 0.5 (w/v) arasındaki şeker konsantrasyonlarının amin oluşumu için optimum olduğu bildirilmiştir (Akan ve Demirağ, 2018). Buna karşın, artan tuz konsantrasyonları dekarboksile edici mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini azaltır (Gardini vd. 2016).

Sonuç olarak, fermente gıdalarda ortam sıcaklığının 20-37 °C arasında değişmesi, ortam pH'ının 4-5.5 değerleri arasında olması ve gıdanın bir gramında $>10^6$ amin oluşmasını sağlayan mikroorganizma olması, biyojen amin sentezini pozitif yönde etkiler (Akyol vd. 2015; Sahu vd. 2015). Buna karşın, ortamdaki tuz miktarı %5'ten yüksek ise amin oluşumunu negatif yönde etkiler (Akyol vd. 2015).

2.3 Amino Asit Dekarboksilaz Üreticisi Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar arasında, amino asit dekarboksilaz aktivitesine sahip olma yeteneği yaygın bir özellik değildir. Ancak, gıda teknolojisinde kullanılan bakteri suşlarının bir çoğunda bu yetenek mevcuttur (Durak-Dados vd. 2020). Biyojen amin sentezi; maya, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerle sıklıkla ilişkilendirilmektedir (Akan ve Demirağ, 2018). Bu nedenle, çeşitli maya türleri ve *Morganella moorganii*, *Escherichia coli* vb. Gram-negatif bakterilerinde üretici olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, fermente gıdalar söz konusu olduğunda bu bakteri grubu fermentasyon sürecinin kendisi nedeniyle sıklıkla inhibe edilir (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014). Bununla birlikte, özellikle laktik asit bakterileri (LAB) en verimli tiramin, histamin, putresin ve kadaverin üreticileri olarak kabul edilmektedir (Barbieri vd. 2019).

LAB; gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyan, hava toleranslı, kok veya çubuk şekilli organizmalardır. Aside karşı toleranslıdır ancak, gelişmeleri için amino asit, vitamin, nükleik asit ve mineral gibi bileşenlere ihtiyaç duyarlar. Bu bakteri grubu, hem glikoliz yoluyla esas olarak laktik asit üreten homo-fermentörleri; hem de laktik asit dışında etanol, karbondioksit ve asetik asit gibi önemli miktarlarda fermantasyon ürünleri veren hetero-fermentörlere sahiptir (Özogul ve Hamed, 2018). Genellikle güvenli kabul edilen mikroorganizma grubu olmasına karşın, biyojen amin gibi toksik bileşik üretme kapasitesine de sahiptirler. Özellikle, fermente gıdalarda starter kültür olmayan LAB, biyojen aminleri gıdalarda biriktirebilir. Laktobasil, enterokok, laktokok, streptokok ve pediokok cinsleri bu bileşiklerin yüksek seviyelere ulaşmasına neden olabilir (Barbieri vd. 2019).

2.3.1 Enterokoklar

Enterococcus cinsi, laktik asit bakterilerinin en tartışmalı grubudur (Moreno vd. 2006). Bu cins, Nitelikli Güvenlik Karinesi (Qualified Presumption of Safety -QPS) listesi için önerilmemesi ve GRAS statüsüne sahip olmaması sebebiyle, insan tüketimi için henüz güvenli olarak sınıflandırılmamıştır. Ancak, bu cinse ait türlerinin çoğu, bir dizi virülans faktörü ve antibiyotik direncine sahiptir (Barbieri vd. 2019).

Enterokoklar genellikle 10 ila 45 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişme gösterirler ancak, optimum 35 °C sıcaklıkta gelişirler. Ayrıca, 60 °C'de yarım saat ısıtılarak hayatta kalabilirler ve pH 9,6'da %6,5 NaCl varlığında olağanüstü ekolojik uyum sağlarlar (Moreno vd. 2006). Diğer yandan, bazı suşları probiyotik özellikler göstermesinin yanı sıra, bozulmaya neden olan bakteriler üzerinde geniş kapsamlı etkinliğe sahip bakteriyosinleri biyosentezleme yeteneklerine de sahiptir (Barbieri vd. 2019; Moreno vd. 2006).

Fermente gıdalardaki enterokok varlığı, genellikle tiramin ve putresin üretimi ile ilişkilendirilmiştir (Jiménez vd. 2013; Barbieri vd. 2019). Çiğ keçi sütünden izole edilen enterokok suşları, substrat olarak kullanılan tirozin ve fenilalanin aminoasitleri ile dekarboksilaz aktivitesi göstermiştir (Perin vd. 2017). Buna karşın, Kalhotka vd. (2012)

keçi sütündeki *Enterococcus faecium*, *E. durans* ve *E. mundtii* türlerinin sıcaklık ve inkübasyon süresine bağlı olarak tirozini dekarboksile ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan bir başka örnekte ise, Landeta vd. (2013) İspanyol kuru kürlenmiş sosislerinden izole edilen *Enterococcus faecium* suşlarının %79'unun tiramin sentezlediğini rapor etmişlerdir.

2.3.2 Laktobasiller

Laktobasiller, karbonhidrat fermantasyonunun ana metabolik son ürünü olarak laktik asit üreten katalaz negatif, Gram pozitif mikroorganizmalardır. Bu cinsin en temsili türlerinin gıda fermantasyonunda uygulanmaları bilinmektedir ve spesifik türlerinin probiyotik özelliklere sahip olduğu kabul edilmiştir (Pot vd. 2014).

Laktobasiller, farklı fermente gıdalarda güçlü biyojen amin üreticileri olarak tespit edilmiştir (Spano vd. 2010; Hugas vd. 1993). Hugas vd. (1993) fermente kuru sosislerden çoğunluğu *Lactobacillus sake* olmak üzere sırasıyla *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* türlerini biyojen amin üreticisi olarak tanımlamışlardır. Benzer bir sonuç, Bover-Cid vd. (2001) tarafından etten izole edilen *Lactobacillus curvatus*, *Lb. sakei* ve *Lb. plantarum*'da gözlemlenmiştir. Tiramin, özellikle *Lactobacillus curvatus* olmak üzere, bu bakteriler tarafından üretilen temel amindir. Ancak, bu cinse ait diğer türlerin de feniletilamin, triptamin, putresin ve kadaverin ürettiği saptanmıştır (Hugas vd. 1993).

2.3.3 Laktokoklar

Laktokoklar, süt endüstrisinde yer alan en önemli laktik asit bakterileri arasındadır. Çünkü, birçok fermente süt ürününün üretiminde kritik bir role sahiptir. Starter kültür olmalarının yanı sıra, gıda endüstrisinde biyo-koruyucu kültürler olarak da önerilmişlerdir (Barbieri vd. 2019).

Genel olarak güvenli (GRAS) statüsüne sahip olmalarına rağmen, bazı *Lactococcus lactis* suşlarının amino-biyojenik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Geleneksel

peynirlerden ve endüstriyel koleksiyonlardan elde edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* suşlarının putresin sentezlediği tespit edilmiştir (Ladero vd. 2011). Buna karşın, Ertürkmen ve Öner (2015) 7 adet beyaz peynir örneğinden izole ettikleri *Lc. lactis* spp. *lactis* ve *Lc. lactis* spp. *cremoris* izolatlarının histamin, triptamin, kadaverin ve putresin biyojen aminlerinin hiçbirini sentezleyemediklerini belirlemişlerdir.

2.4 Fermente Zeytin

Zeytin; acı tadı, düşük karbonhidrat içeriği (%2,5-6 w/w) ve yüksek yağ içeriği (%10-15 w/w) ile karakterize edilen sert çekirdekli bir meyvedir. Sahip olduğu acı tat, başta yırtıcı hayvanlara karşı savunma rolü oynayan oleuropein olmak üzere fenolik bileşiklerin varlığından kaynaklanmaktadır. Bir takım fizikokimyasal ve mikrobiyolojik dönüşümlerden sonra, söz konusu sert çekirdekli meyveler duyuşal açıdan çekici hale gelirler (Portilha-Cunha vd. 2020). Dolayısıyla, zeytin meyvesini lezzetli hale getirmek için salamura/, fermantasyon gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Medina-Pradas ve Arroyo-López, 2015).

Sofralık zeytin üretimi, doğal mikroorganizmaların varlığı nedeniyle spontan olarak başlar. Fermantasyon sürecindeki mikrobiyel ekosistem ise oldukça karmaşık ve değişkendir. Fermantasyon dinamiği, iç ve dış faktörlere ek olarak yerli mikrobiyotanın kendisi tarafından belirlenir ve son ürünün kalitesi değişkenliğini korur (Portilha-Cunha vd. 2020). Fermente sofralık zeytinlerin uzun bir mikrobiyel güvenlik geçmişı olmasına rağmen, biyojen aminler gibi biyolojik tehlikeler oluşabilirler (Medina-Pradas ve Arroyo-López, 2015).

Sofralık zeytin: 'Uygun zeytin çeşitlerinden elde edilen, doğal acılığını gidermek için işlenen ve tüketime kadar salamuralı ve/veya salamurasız muhafaza edilen ürün' olarak tanımlanmaktadır (Medina-Pradas ve Arroyo-López, 2015). Dünya Zeytin Çeşitleri Kataloęu, yaklaşık 2500 zeytin çeşidi olduğunu bildirmektedir. Ancak, bunların sadece %10'u ticari olarak kabul edilebilir ve seçilen kullanımları (sofralık, yağlık veya her ikisi) farklı parametreler tarafından belirlenir. Beş büyük üretici ülkede kullanılan başlıca

sofralık zeytin çeşitleri, İspanya için Gordal, Manzanilla ve Hojiblanca; Mısır için Aggezi Shami, Hamed ve Toffahi; Türkiye için Gemlik, Memecik ve Memeli; Yunanistan için Konservolia, Chalkidiki ve Kalamon; Cezayir için Azeraj ve Sigoise'dir (Conte vd. 2020).

2.4.1 Fermente zeytinlerle ilişkili mikrobiyota

Zeytin fermantasyonunun birincil amacı, koruma etkisi elde etmek ve işlenmiş zeytinin organoleptik özelliklerini iyi yönde geliştirmektir. Laktik asit ve diğer organik asitleri üretebilen homo ve hetero-fermentatif laktik asit bakterileri, fermente zeytindeki en önemli bakteri grubudur. *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* gibi homo-fermentatif ve *Leuconostoc* ve *Lactobacillus*'un bazı üyeleri gibi hetero-fermentatif laktik asit bakterileri, zeytinde yaygın olarak tespit edilen cinslerdir (Bleve vd. 2015).

Fermantasyon sırasında laktik asit bakterilerinin rolü ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Yapılan çalışmaların çoğu, zeytin örneklerinden izole edilen ana cinsin *Lactobacillus* olduğunu ve genellikle *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus pentosus* türlerinin baskın olduğunu göstermiştir (Perpetuini vd. 2020; Hurtado vd. 2012). Buna karşın, zeytin çeşidi, işleme yöntemleri ve coğrafi kökene bağlı olarak diğer cinsler de fermantasyon sırasında önemli bir rol oynayabilir (Hurtado vd. 2012).

2.4.2 Fermente zeytinde biyojen amin

Fermente ürünlerde, bazı laktik asit bakterileri (LAB) asidik ortama karşı bir hayatta kalma mekanizması olarak biyojen amin üretirler (Visciano ve Schirone, 2022; Emer vd. 2021). Bakteriyel dekarboksilaz aktivitesine sahip bu mikroorganizmaların etkisiyle, sofralık zeytinlerde biyojen amin gibi bir biyolojik tehlike oluşabilir. Ancak, fermantasyon sonunda *Codex alimentarius* Standardı 66–1981'e göre; 'fermente ürün, sağlığa zararlı olacak miktarlarda mikroorganizma ve parazitlerden arındırılmış olmalı ve mikrobiyel kaynaklı, sağlık için tehlikeli olan madde içermemelidir' (Medina-Pradas ve Arroyo-López, 2015).

Zeytinde biyojen amin, ilk olarak yeşil sofralık zeytinlerdeki “zapatera” bozulması ile tanımlanmıştır (Hornero-Mendez ve Garrido-Fernandez, 1997). Daha sonra yapılan çalışmalar ile fermente zeytinde biyojen amin keşfi ilerlemiştir. İlk olarak, Iñigo ve Abad (1983) yeşil sofralık zeytinlerde 0.5 ila 2.0 ppm arasında çok düşük histamin konsantrasyonları saptamışlardır (Hornero-Mendez ve Garrido-Fernandez, 1997). Daha sonra, Garcia-Garcia vd. (2000) yeşil zeytinlerde, salamura dönemi boyunca biyojen amin konsantrasyonunun arttığını ve putresinin (maksimum 70.7 mg/Kg) en yüksek konsantrasyona sahip biyojen amin olduğu belirlemiştir. Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada ise, zeytin çeşitlerinde tiramin ve histamin tespit edilmemiş ancak, düşük konsantrasyonlarda da olsa kadaverin ve putresin saptanmıştır (Tufariello vd. 2019).

2.5 Biyojen Aminlerin Tayinini İçeren Teknikler

2.5.1 Biyojen aminlerin doğrudan tespit teknolojisi

Biyojen aminler, gıdaların kalite ve tazeliklerini bilmek, üretim süreçlerini izlemek ve esas olarak, gıda güvenliğinin kontrolü için önem arz ederler. Fermente ürünlerde biyojen amin tayini, karmaşık matrislerde düşük konsantrasyonlarda bulunmaları ve kimyasal yapılarının çeşitliliği nedeniyle kolay değildir (Ordóñez vd. 2016). Biyojen aminlerin kalitatif ve kantitatif tayini için; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC); sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS); ince tabaka kromatografisi (TLC), iyon değiştirme kromatografisi (IEC); gaz kromatografisi (GC) dahil olmak üzere çeşitli kromatografik yöntemler kullanılır (Simon Sarkadi, 2019; Anlı vd. 2004). Bununla birlikte, spektrofotometri ve kapiler elektroforez (CE) gibi çeşitli analitik yöntemler de kullanılmaktadır. Biyosensörler ve enzime bağlı immünosorbent testleri (ELISA) dahil olmak üzere immünolojik testler ise fermente gıdalarda biyojen aminlerin tespiti için nispeten daha modern araçlardır (Simon Sarkadi, 2019).

Biyojen aminlerin tespiti için kullanılan yöntemler; hassasiyet, seçicilik ve numune hazırlama kolaylığı, ayırma hızı ve analiz maliyeti açısından farklılık gösterirler (Simon Sarkadi, 2019). Mevcut yöntemler arasında HPLC, biyojen amin tayini için sıklıkla kullanılan tekniktir (Simon Sarkadi, 2019; Anlı vd. 2004). HPLC; mobil faz, sabit faz ve

numune arasındaki etkileşimin türüne bağlı olarak normal faz, ters faz kromatografisi veya iyon eşleştirmeli ters faz kromatografisi olmak üzere çeşitli ayırma mekanizmalarına sahiptir (Simon Sarkadi, 2019).

Biyojen aminlerin belirlenebilmesi için kimyasal bir türevlendirme işlemi gerekir. Çünkü, bu bileşikler görünür veya ultraviyole dalga boyu aralıklarında yeterli absorpsiyon özelliklerine sahip değildir. Türevlendirme işlemi, biyojen aminin polaritesini azaltmakta ve böylece, ters faz modu ve C18 kolonları ile ayırma daha da güçlenmektedir (Ordóñez vd. 2016). Türevlendirme yöntemlerine göre, kolon öncesi ve sonrası türevlendirme olarak ikiye ayrılırlar. Kolon öncesi türevlendirme, numunelerin enjeksiyondan önce işlenmesini ifade eder. Böylece ultraviyole veya floresans ile tespit edilebilecek gruplarla birleştirilebilirler. Kolon sonrası türevlendirme ise, numunelerin kromatografik kolonlar kullanılarak ayrılmasını ve ardından belirli koşullar altında türev reaktifleri ile reaksiyona sokulmasını ifade eder. Üretilen türev ürünleri, bir dedektör yardımıyla tespit edilir. Türevlendirme yöntemleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, kolon öncesi türevlendirme daha uygun ve ekonomiktir (Ding ve Li, 2024).

Benzoil klorür, dansil klorür, o-ftalaldehit, 6-aminokinolil-Nhidroksisüksinimidil karbamat, 4-kloro-3,5- dinitrobenzotriflorür veya dietil etoksümetilenmalonat türevlendirme reaktifi olarak kullanılır. Bu reaktifler arasında, yaygın olarak tercih edileni ise dansil klorür (DNS-Cl)'dür (Ordóñez vd. 2016). Bu bileşik, özellikle ultraviyole (UV) ve floresan (FL) görünür spektroskopisi ile tespit sistemlerinde kararlı türevler üretir (Anlı vd. 2004; Ordóñez vd. 2016). Yaygın olarak kullanılan diğer bir türevlendirme reaktifi ise, nispeten ucuz olması ve türevlerinin stabil olması gibi sayısız avantaja sahip olan, benzoil klorürdür (Ordóñez vd. 2016).

Kromatografiye alternatif olarak geliştirilen elektrokimyasal biyosensör yöntemi ise ilginç bir alternatiftir çünkü, özel bir enstrümantasyon gerektirmez. Ayrıca, numune temizleme ve türevlendirme prosedürlerine ihtiyaç duymadıklarından daha az zaman alırlar (Ordóñez vd. 2016). Ekonomik, basit ve hızlı bir alternatif sunan, hassas ve sağlam cihazlardır (Vasconcelos vd. 2021). Bu tekniğin diğer önemli bir avantajı da yerinde analiz için kullanılmasıdır (Ordóñez vd. 2016). İmmünoanaliz (IA) yöntemi, antikor ve

antijenin spesifik immün reaksiyonlarına dayanan hızlı analitik bir yöntemdir (Ding ve Li, 2024). ELISA testi ise, yüksek duyarlılık, hassasiyet ve standardizasyon potansiyeli yüksek bir tekniktir. Ancak, az sayıda numune için zaman alıcı ve pahalı olabilir (Ordóñez vd. 2016).

2.5.2 Biyojen aminlerin tespiti için moleküler teknolojiler

Moleküler teknikler, biyojen amin üreten bakterilerin varlığını analiz etmek için kolay, güvenilir ve hızlı yöntemler sunarlar. Dolayısıyla, gıda kaynaklı bakterilerin tespiti ve tanımlanmasına yönelik moleküler yöntemler, geleneksel kültür yöntemlere karşı daha önemli bir alternatiftir (Landete vd. 2007).

Moleküler yöntemler, fermente ürünlerde biyojen amin üreten bakterilerin varlığına ve miktarına dayanmaktadır. Fermente gıdalarda üretici bakterilerin varlığı, genellikle biyojen aminlerin varlığını basit ve hızlı bir şekilde gösterir. Buna karşın, biyojen amin üreten bakteri sayısı fermente gıdanın biyojen amin içeriğiyle mutlak orantılı değildir. Dolayısıyla, biyojen aminlerin tespiti için yalnızca dolaylı bir araç olarak kullanılabilirler (Ding ve Li, 2024).

Fermente ürünlerde, biyojen amin üreten bakterilerin bulunup bulunmadığı genellikle seçici bir kültür ortamı kullanılarak belirlenir. Bu seçici kültür ortamına, bromokresol purple (kültür ortamında bir asit-baz göstergesi) katılarak tarama yapılır. Ancak, bakteriler tarafından üretilen diğer alkali metabolitler test sonuçlarını doğrudan etkileyebilir ve hatalı pozitif sonuçlar üretebilir. Bu nedenle, seçici ortam bileşiminin ayarlanması, yanlış pozitif olasılığının azaltılmasına yardımcı olur. Ek olarak, biyojen aminlerin varlığı, amin üreten bakterilerdeki amino asit dekarboksilaz geninin tespit edilmesiyle de kolayca kanıtlanabilir (Ding ve Li, 2024).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), amin üreten bakterilerin tespitinde sıklıkla kullanılan moleküler yöntemdir (Ding ve Li, 2024). Bu yöntem, sonuç almayı hızlandırır ve bakterilerin gelişmesini önlemek için kontrol önlemlerinin alınmasını sağlar (Landete vd.

2007). Buna karşın, tek bir PZR testi yalnızca tek bir biyojen amin üreten bakteriyi tespit edebilir. Dolayısıyla, birden fazla amin üreten bakterileri aynı anda tespit etmek için çoklu-multipleks PZR teknolojisi kullanır (Ding ve Li, 2024). Bu yöntem ile putresin, kadaverin, tiramin ve histamin sentezleyen gıda kaynaklı bakterilerin eş zamanlı tespiti sağlanır (Mohedano vd. 2015).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Gıda örnekleri

Tez çalışması kapsamında, farklı illerdeki çeşitli yerel pazarlarda satışa sunulan ve geleneksel yolla üretimi yapılmış fermente yeşil ve siyah zeytin örnekleri çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Zeytin numuneleri, steril örnekleme kaplarına alınmış ve soğuk zinciri korunarak Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarları'na ulaştırılmıştır. Temin edilen örneklere depolama işlemi uygulanmamıştır.

Bu bağlamda, Ağustos 2021-Haziran 2022 tarihleri arasında doğal fermantasyonla üretilen 44 çeşit yeşil ve 19 çeşit siyah zeytin çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Örneklerin 6'sı Mersin, 12'si Bursa, 16'sı Antalya, 22'si Kocaeli ve 7'si ise Muğla ilinden getirilmiştir.

3.1.2 Kimyasallar ve besiyerleri

LAB'ın izolasyonu ve gelişimi için; Kanamisin Eskulin Azide Agar (Merck, Almanya), MRS Agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE) (Merck, Almanya), M-17 Agar (Merck, Almanya) ve Triptik Soy Agar (Merck, Almanya) besiyerleri kullanılmıştır.

Kullanılan sıvı besiyerleri ise; BHI Broth (Brain Heart Infusion) (Merck, Almanya), MRS Broth (Merck, Almanya), M-17 Broth (Merck, Almanya) ve Triptik Soy Broth (Merck, Almanya)'dır.

L-Histidine, L-Lysine, L-Omithine monohydrochloride, L-Typtophan ve L-Tyrosine aminoasitleri Sigma Aldrich'den sağlanmıştır.

L-Histidine Reagent Plus, $\geq 99\%$ (TLC) (Sigma Aldrich), L-Lysine $\geq 98\%$ (TLC) (Sigma Aldrich), L-Ornithine monohydrochloride $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich), L-Tyrosine Reagent Grade, $\geq 98\%$ (HPLC) (Sigma Aldrich), L-Typtophan Reagent Grade, $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich) ise biyojen aminlerin standart \mathcal{C} ozeltilerinin hazırlanması için kullanılmıştır.

Amonyum asetat ve perklorik asit (%70'lik) Supelco'dan; asetonitril, bromocresol purple, dansil klorür, maya ekstraktı, sodyum bikarbonat ise Sigma Aldrich'den sağlanmıştır. Ayrıca, D(+)-Glukoz, etanol, gliserol, Gram-boyama seti, hidrojen peroksit, hidrojen klorür, pepton, sodyum hidroksit, sodyum klorür kimyasalları ise Merck (Darmstadt, Almanya)'dan sağlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 LAB izolasyonu

Aseptik koşullar altında laboratuvara getirilen yeşil ve siyah zeytin örnekleri, herhangi bir depolama süreci olmaksızın aynı gün içinde analiz edilmiştir. İlk olarak, zeytin örneklerinden çekirdekler uzaklaştırılmıştır. Meyve kısmından 10 gram tartılıp, üzerine 90 mL %0,85'lik NaCl \mathcal{C} ozeltisi eklenmiş ve stomacher yardımıyla homojenize edilmiştir. Daha sonra, örneklerin seri dilüsyonları (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) %0,85'lik NaCl \mathcal{C} ozeltisi kullanılarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan dilüsyonların her birinden 100'er μ L alınmış ve MRS Agar'a yayma plak yöntemine göre ekim yapılmıştır. 18-48 saat, 35-37°C'de inkübasyona bırakılan petri kutusundaki mat düzgün kenarlı, krem renkli koloniler muhtemel laktobasil olarak değerlendirilmiştir. Saf kültür elde etmek amacıyla, laktobasil morfolojisi gösteren koloniler nokta ekim yöntemine göre tekrar aynı katı besiyerine aktarılmıştır. Bu aşamada, petriler 24 saat süreyle 35-37°C'de tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra

inkübasyon sonunda seçilen koloniler, MRS broth ortamına aktarılmış ve saf kültür elde edilmiştir (Ertürkmen ve Öner, 2015; Akoğlu vd. 2017).

Ortamda bulunabilecek olan diğer LAB suşlarını da gözden kaçırmamak adına, *Enterococcus* spp. suşlarının izolasyonu için Kanamisin Eskulin Azid Agar (KAA) ve *Lactococcus* spp. suşları için ise M-17 Agar besiyerlerine yayma plak yöntemine göre ekim yapılmıştır. Sırasıyla, 18-24 saat 37°C sıcaklıkta (Karaalioğlu vd. 2019) ve 18-48 saat 30°C'de (Büyükyörük ve Soyutemiz, 2010) inkübasyona bırakılan petrilerde gelişen koloniler, muhtemel enterekok ve laktokok olarak değerlendirilmiştir. Ardından gelişen koloniler, nokta ekim yöntemine göre Triptik Soy Agar ve M-17 Agar'a saf kültür elde etmek amacıyla aktarılmıştır (Büyükyörük ve Soyutemiz, 2010).

3.2.2 İzolatlarının morfolojik yolla ön tanımlamasının yapılması

Saflık kontrolleri yapılan LAB izolatlarının; Gram reaksiyonu, mikroskopik görünümü ve katalaz aktiviteleri incelenmiştir (Ertürkmen ve Öner, 2015).

3.2.2.1 Gram boyama

İnkübasyon süresi sonunda, tipik LAB özelliği (muntazam olmayan bir yapı, mat, küçük ve krem renginde) gösteren koloniler seçilerek gram boyama yapılmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. Gram (+), basil veya kok morfolojisine sahip suşlar LAB üyesi olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000).

3.2.2.2 Katalaz testi

MRS (De Man, Rogosa ve Sharpe) Agar, Triptik Soy Agar ve M-17 Agar besiyerlerinde inkübe edilerek saflaştırılan kolonilerden, lam üzerine tek bir koloni aktarılmıştır. 1 damla H₂O₂ (hidrojen peroksit) çözeltisi koloni üzerine damlatılarak kabarcık çıkışının olup olmadığı gözlenmiştir. Kabarcık oluşturan suşlar katalaz (+), oluşturmamayanlar ise katalaz

(-) olarak değerlendirilmiştir. Katalaz (-) ve Gram (+) izolatlar, LAB olarak doğrulanmıştır (Norris vd. 1981).

3.2.3 LAB suşlarının aminoasit dekarboksilaz aktivitesinin belirlenmesi

Laktik asit bakterisi (LAB) olarak tanımlanan suşların biyojen amin üreticisi olup olmadığı dekarboksilaz testi ile belirlenmiştir. Çalışma kapsamında, fermente zeytindeki laktokok, laktobasil ve enterokok suşları tarafından yaygın olarak üretilen tiramin, triptamin, histamin, kadaverin ve putresin hedef biyojen amin olarak saptanacaktır. Bu amaçla, aminoasit dekarboksilaz testi ayrı ayrı broth ortamlarında uygulanmıştır. Bu test, Bover-Cid ve Holzapfel (1999) tarafından geliştirilmiştir ve prekürsor amino asitlerin 1 g/L nihai konsantrasyonunu içeren dekarboksilaz broth tarama ortamı üzerinde yapılmıştır. Kadaverin için lizin, histamin için histidin, putresin için ornitin, tiramin için tirozin ve triptamin için triptofan aminoasitleri prekürsor aminoasit olarak kullanılmıştır (Bover-Cid ve Holzapfel, 1999).

Dekarboksilaz broth besiyerinin hazırlanışı

Temel Besiyeri İçeriği:

- Bromocresol purple: 0,02 g
- Dekstroz: 1 g
- Maya ekstraktı: 3 g
- Pepton: 5 g
- Prekürsor amino asit: 5 g
- Destile su: 1000 mL

*Kullanılan prekürsor amino asitler: L-tirozin, L-lizin, L-ornitin, L-histidin, L-triptofan

Amino asit öncüleri ilave edilmeden, temel besiyeri içerikten hazırlanmıştır. Daha sonra, hazırlanan temel besiyeri ortamına prekürsor amino asitlerden ayrı ayrı eklenerek karıştırılmıştır. Son olarak, 1N NaOH veya 1N HCl kullanılarak besiyeri pH'ı 6.78-6.82 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen sıvı besiyerleri, eşit hacimlerde (10 mL) deney tüplerine dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır (Yüceer, 2015).

MRS (De Man, Rogosa ve Sharpe) broth, M-17 broth ve Triptik Soy broth ortamında geliştirilen ön kültürün bir kısmı (0.1 mL; $OD_{600\text{ nm}} = 0.50$) farklı aminoasit öncüllerini içeren sıvı besiyeri ortamlarına aşılanmıştır. Aerobik koşullar altında kültürler, M-17 broth için 30°C’de; MRS broth ve Triptik Soy broth için 35-37°C’de 4-5 gün inkübe edilerek renk değişimleri gözlenmiştir (Mete vd. 2017).



Şekil 3.1 Biyojen amin üreticisi izolatların, aminoasit içeren dekarboksilaz broth besiyerinde kontrol grubuna göre renk değişimi

Aminoasit içermeyen kontrol tüpündeki ortam, sarı renktir. Her bir öncül aminoasit içeren tüpteki ortamın sarımsı-yeşilden mora dönüşmesi biyojen amin oluşumu bakımından pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1). Buna karşın, ortam renginin sarı kalması negatif reaksiyonu ifade eder (Bover-Cid ve Holzapfel, 1999).

3.2.3.1 Stok kültürlerin hazırlanması

Biyojen amin üreticisi olarak tanımlanan saf kültürler, %20 gliserol içeren MRS broth, M-17 broth, Triptik Soy broth ve/veya BHI broth ortamında süspansiyon edilmiştir. Stok kültürler, 1.5 mL’lik eppendorf tüplere aktarılarak -18°C’de saklanmıştır.

3.2.4 LAB izolatlarının biyojen amin üretim miktarlarının HPLC metodu ile belirlenmesi

LAB'ın ürettiği triptamin, tiramin, kadaverin, putresin ve histamin konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla HPLC analizi Eerola vd. (1993) tarafından önerilen yöntem ile yapılmıştır. Analiz için ilk olarak, aktiveştirilen stok kültürlerin 10 mL Triptik Soy broth, MRS (De Man, Rogosa ve Sharpe) broth veya M-17 broth içerisinde 5 gün süreyle inkübe edilerek biyojen amin sentezlenmesi beklenmiştir.

3.2.4.1 HPLC cihazı

Çalışmada, faydalanılan HPLC cihazın özellikleri ve kromatografi çalışma koşulları Çizelge 3.1' de verilmiştir.



Şekil 3.2 HPLC cihazı

Çizelge 3.1 HPLC cihazının özellikleri ve kromatografik koşullar

HPLC	HITACHI LACHROM ELITE (Tokyo, JAPONYA)
Kolon	C 18 (Inertsil ODS-3,5 µm (250×4.6 mm))
Kolon fırını	L-2300 Column Oven
Kolon fırını sıcaklığı	40 °C
Degasser	Otomatik vakum
Dedektör tipi	DAD (Diode Array Detector)
Dalga boyu	210 nm
Akış hızı	1.3 mL/dakika
Mobil faz	Çözücü faz A: Amonyum asetat Çözücü faz B: Asetonitril (%90-%50 16 dakika, %90-%10 16-22 dakika, %50 post run 22-30 dakika)
Enjeksiyon miktarı	20 µL
Süre	35 dakika

3.2.4.2 Biyojen amin standart çözeltilerin hazırlanması

Biyojen amin standart çözeltileri analizin yapıldığı gün hazırlanmıştır. Stok çözeltiler 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu nedenle, histamin dihidroklorürden 41,43 mg; putresin dihidroklorürden 45,72 mg; kadaverin dihidroklorürden 42,87 mg; tiramin hidroklorürden 31,65 mg ve triptamin hidroklorürden 30,69 mg tartıldıktan sonra saf su içerisinde çözündürülerek 25 mL'ye tamamlanmıştır (Eerola vd. 1993).

Çalışma çözeltisi 1: her biyojen aminin stok çözeltisinden 1 mL alındıktan sonra, distile su ile 10 mL'ye tamamlanarak elde edilmiştir. Bu çözeltinin konsantrasyonu, her bir amin için 100 ppm (100 µg/mL)'dir (Eerola vd. 1993).

Çalışma çözeltisi 2: her bir biyojen amin için hazırlanan Çalışma Çözeltisi 1'den 1 mL alınarak, saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak elde edilmiştir. Elde edilen çözelti konsantrasyonu 10 ppm (10 µg/mL)'dir (Eerola vd. 1993).

3.2.4.3 Mobil faz

Mobil faz A: 7,708 g amonyum asetat distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Çözelti, filtre ve vakum süzme aparatı kullanılarak süzülmüştür.

Mobil faz B: Asetonitril çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, vakum süzme aparatı ve 0,45 µm filtre kullanılarak süzülmüştür.

0,1 mol/L Amonyum Asetat : Asetonitril karışımı (1:1, v:v): Asetonitril ve amonyum asetat eşit hacimlerde olacak şekilde karıştırılarak hazırlanmıştır.

HPLC analizi sırasında aşağıdaki kimyasal çözeltiler hazırlanmıştır;

- **NaHCO₃ (Doymuş sodyum bikarbonat) çözeltisi :** 20 g NaHCO₃, 60 mL destile su ile karıştırılmış ve su banyosunda ısıtılarak doymuş çözelti elde edilmiştir.
- **NaOH (Sodyum hidroksit) çözeltisi :** 8,0 g NaOH 100 mL'lik ölçülü balona aktarılmıştır. Balondaki işaret çizgisine kadar destile su eklenmiştir.
- **NH₃ (Amonyak) çözeltisi :** %25'lik NH₃ çözeltisi hazırlanmıştır.
- **Dansil klorür çözeltisi:** 200 mg dansil klorür, 20 mL aseton içerisinde çözülmüştür.
- **HCIO (Perklorik asit) çözeltisi (%70-72) :** 40 mL HCIO, 1000 mL'lik bir ölçülü balonda işaret çizgisine kadar destile suyla seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.2.4.4 Örnek hazırlama ve türevlendirme

Çalışmada numune olarak, 10 mL'lik brothlara 30°C'de 4-5 gün süreyle inoküle edilmiş toplam 72 adet LAB izolatu kullanılmıştır. İnkübasyon süresi içinde suşların hedef biyojen aminleri üretmesi beklenmiştir. Besiyerinde gelişen kültürlerden 5'er mL alınıp 15 mL'lik kapaklı santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Üzerlerine 10'ar mL perklorik asit ilave edilerek, 3 dakika boyunca ultra turrax homojenizatörde homojenize edilmiştir. Bu homojenat, 3000 devirde ve 4°C'de soğutmalı santrifüjde 10 dk boyunca santrifüj

edilmiştir. Üstteki berrak kısım, Whatman 2 nolu filtre ile 25 mL'lik balon jöjeye aktarılmıştır. Ardından, santrifüj tüpüne 0,4 M perklorik asit çözeltisinden 10 mL eklenerek vortekste 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. Aynı işlem basamakları, sırasıyla tekrar uygulanmıştır. Son olarak, süzüntü perklorik asit ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Böylece, numune hazırlama işlemi sona ermiş ve türevlendirme aşamasına geçilmiştir (Eerola vd. 1993).

Türevlendirme aşamasında ilk olarak, 0,5 mL numune 5 mL'lik balon jöjelere aktarılmıştır. Ardından, numune üzerine sırasıyla 150 µL doymuş sodyum bikarbonat (NaHCO₃) çözeltisi, 100 µL 2 N NaOH (sodyum hidroksit) çözeltisi ve 1 mL dansil klorür karışımından eklenerek vortekslenmiştir. Elde edilen karışım, 40°C'deki etüvde 45 dakika bekletilmiştir. Daha sonra, numunelerin oda sıcaklığına gelmesi için karanlık bir ortamda 10 dakika tutulmuştur. Dansil klorürü nötralize etmek amacıyla çözelti üzerine 50 µL amonyak (NH₃) çözeltisinden eklenerek 15 saniye boyunca çalkalanmıştır. Oda sıcaklığına gelen çözelti, amonyum asetat : asetonitril karışımı ile balon jöjedeki hacim çizgisine kadar tamamlanmıştır. Karışım, filtreden geçirilerek HPLC viallerine alınmış ve okuma yapılmıştır (Eerola vd. 1993).

3.2.5 Bazı LAB suşlarının 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde moleküler tanısı

HPLC cihazı yardımıyla yüksek konsantrasyonda biyojen amin üreticisi olduğu belirlenen bazı LAB suşları, 16S rDNA analizlerine tabi tutularak tür düzeyinde tanımlanmıştır.

3.2.5.1 DNA izolasyonu

- MRS (De Man, Rogosa ve Sharpe) broth, Triptik Soy broth ve M-17 brothta gelişen LAB suşlarının genomik DNA izolasyonu için Cell SV mini kiti (Marka: Gene All, Katalog No: 106-101) kullanılmıştır. Öncelikle, bakteri örneği 1.5 mL mikrosantrifüj tüplerine alındıktan sonra, üzerine 180 µL (30 mg/mL) lizozim enzim solüsyonu eklenerek 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir.

- Ardından, sırasıyla 200 µL BL buffer ve 20 µL Proteinaz K solüsyonu ilave edilerek 56°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, sıcaklık 70°C’ye çıkarılarak 30 dk daha inkübe edilmiştir.
- Karışım üzerine 200 µL absolut etanol eklendikten sonra, karışım kolona aktarılmıştır. 8000 rpm’de 1 dakika karışım santrifüj edilmiştir.
- Kolon üzerine önce 600 µL Buffer BW eklenerek 8000 rpm’de, 30 saniye; sonra 700 µL Buffer TW eklenerek 30 saniye daha santrifüj edilmiştir.
- Son olarak, kolon üzerine herhangi bir solüsyon ekmeden 14000 rpm’de, 1 dakika daha santrifüj edilmiştir.
- Kolon, yeni bir 1.5 mL mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır ve üzerine 200 µL Buffer AE eklenerek tekrar 14000 rpm’de, 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen DNA örneği -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.5.2 16S rDNA gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması

DNA izolasyonunun sonrasında PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) aşamasına geçilmiştir. Bu reaksiyon için; PCR 2X Master kiti (Marka: WizPure™, Katalog No: W1401) ve Applied Biosystems™ ProFlex Termalcykler cihazı kullanılmıştır.

PZR için kullanılan mastermix bilgileri, primerler ve reaksiyon koşulları sırasıyla Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4’de belirtilmiştir.

Çizelge 1.2 PZR için kullanılan mastermix bilgileri

MasterMix Bileşenleri	Hacim
Geri Primer	0.5 µL
İleri Primer	0.5 µL
Genomik DNA	2 µL
Distile Su	7 µL
PCR 2X MasterMix Kiti	10 µL

Çizelge 3.3 PZR reaksiyonu için kullanılan primer bilgileri

Primer Adı	Primer Dizisi
907R	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

Hazırlanan toplam 20 µL hacmindeki PZR karışımı, steril PZR tüplerine (0,2 mL) aktarılmıştır. Kullanılan reaksiyon koşulları Çizelge 3.4’te belirtilmiştir.

Çizelge 3.4 PZR için kullanılan reaksiyon koşulları

PZR Reaksiyonu Koşulları			
Adımlar	Sıcaklık (°C)	Zaman	Devir
Denatürasyon	95	5 dk	1
Çift zincirin açılması	95	30 sn	30
Primerlerin bağlanması	52		
Zincir uzaması	72		
Son uzama	72	5 dk	1

3.2.5.3 PZR ürünlerinin saflaştırılması (PZR clean-up)

Elde edilen PZR ürünlerinin saflaştırılmasında, ExoSAP-IT Express PCR Clean-up Reagents Kiti (Thermo, Katalog No: 75001.200.UL) kullanılmıştır. Clean-up için kullanılan mastermix bileşenleri: PZR ürünü (10 µL) ve ExoSAP-IT (2 µL)’dir. Reaksiyon koşulları Çizelge 3.5’te belirtilmiştir.

Çizelge 3.5 PZR clean-up reaksiyonu koşulları

Adımlar	Sıcaklık (°C)	Zaman	Devir
İnkübasyon 1	37 °C	4 dakika	1
İnkübasyon 2	80 °C	1 dakika	1
Soğutma	4 °C	-	1

3.2.5.4 16S rDNA gen bölgelerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi

Öncelikle, polimeraz zincir reaksiyonunda amplifiye edilen gen bölgelerinin elektroforezi için %1 agaroz içeren jel hazırlanmıştır. Bu jeli hazırlanmak amacıyla, 1 g agaroz 100 mL 1X Tris-Asetat elektroforez tamponu (TEB) içine aktarılmıştır. Mikrodalga fırın ile jel içeriği tamamen çözünmüş ve jelin 45-50°C’ye kadar soğuması beklenmiştir. Daha sonra, jel ortamı elektroforez tankına aktarılmış ve jel içine elektroforez tarakları yerleştirilmiştir. Agarozun polimerize olması için oda sıcaklığında 30-40 dk beklenmiştir.

Hemen ardından, elektroforez tankına Tris-Asetat elektroforez tamponu eklenmiştir. Elektroforez tarakları iki ucundan nazikçe tutularak, jelden çekilerek alınmıştır. Agaroz jel üzerindeki ilk kuyucuğa 2 µL 1 kb'lık DNA ladder marker yüklenmiştir. Diğer kuyucuklara araştırılan örneklerden 10'ar µL DNA örneği ve 1 µL 6X DNA yükleme boyası karışımları yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, 40-45 dakika süreyle 110 V'luk elektrik akımında uygulanmıştır. Bu işlem, marker boyanın agaroz jel sistemini terk etmesi ile sonlandırılmıştır. Ortamdaki jeller 0,2 µg/mL etidyum bromür içeren Tris-Asetat elektroforez tamponu içerisine aktarılarak bir saat boyunca beklenmiştir. Boyanan DNA bantları 366 nm dalga boyundaki UV ışık altında translüminatör kullanılarak incelenmiştir. Son olarak, Kodak Gel Logic 200 Imaging System cihazıyla agaroz jeller fotoğraflanmıştır.

Tris-asetat tamponu (1X) (TEB) hazırlanması

EDTA	0,37 g
Sodyum Asetat	4,08 g
Tris	4,84 g
Destile Su	1000 mL
pH	8,0 ± 0,02

DNA ladder marker çözeltisinin hazırlanması

6X DNA yükleme boyası	1 µL
DNA ladder	1 µL
Deiyonize su	4 µL

3.2.5.5 PZR ürünlerinin dizilenmesi

16S rDNA gen bölgesine ait PZR ürünlerinin çift yönlü DNA dizi analizi, hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Dizi analiz sonuçları BLAST (Basic Local Alingment Search Tool/ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/web>) programına aktarılmıştır ve LAB suşları için NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında yer alan diziler ile benzerliği karşılaştırılmıştır. Benzerlik yüzdesi kontrol edilerek, aranan dizi sırasının hangi türe ait olabileceği tespit edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 LAB Suşlarının İzolasyonu ve Biyokimyasal Tanımlanması

Tez çalışması kapsamında Mersin, Bursa, Antalya, Kocaeli ve Muğla illerindeki çeşitli üreticilerden temin edilen 63 fermente zeytin numunesi izolasyon materyali olarak kullanılmıştır. Örneklerden toplam 119 izolat elde edilmiştir. Tipik LAB özelliği (krem renginde, mat, muntazam olmayan bir yapı, küçük) gösteren izolatlarla, eş zamanlı olarak Gram boyama ve katalaz testleri uygulanmıştır.

Zeytin örneklerinden izole edilen suşların 30'unda tipik *Enterococcus* spp., koloni morfolojisi, 46'sında tipik *Lactococcus* spp. koloni morfolojisi ve 25'inde tipik *Lactobacillus* spp., koloni morfolojisi tespit edilmiştir. Mikroskopik incelemede kokobasil veya kok morfolojisine sahip izolatlar, %20 steril gliserol içeren Brain Heart Infusion (BHI) broth ortamlarından eppendorf tüplerine alınarak -20 °C'de saklanmıştır.

- Muhtemel enterokok izolatlarına 'BA' kodu,
- Muhtemel laktokok izolatlarına 'BM' kodu ve
- Muhtemel laktobasil izolatlarına 'BR' kodu verilmiştir.

İzole edilen tüm LAB suşlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları Çizelge 4.1'de sırasıyla gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 KAA, M-17 ve MRS Agar'dan izole edilen LAB izolatlarının biyokimyasal test sonuçları

No	İzolat No	Gram Boyama	Katalaz Testi	Morfoloji	Zeytin Tipi
1	1BR	+	-	ÇUBUK	Y
2	1BM	+	-	KOK	
3	2BR	+	+	ÇUBUK	Y
4	2BM	+	-	ÇUBUK	
5	3BR	+	+	ÇUBUK	Y
6	3BM	+	-	KOK	
7	4BR	+	-	ÇUBUK	Y
8	4BM	+	-	KOK	
9	5BR	+	-	ÇUBUK	Y
10	5BM	+	-	KOK	
11	6BR	+	+	ÇUBUK	Y
12	6BM	+	-	KOK	
13	7BR	+	-	ÇUBUK	Y
14	7BM	+	+	ÇUBUK	
15	8BR	+	-	ÇUBUK	Y
16	8BM	+	-	KOK	
17	9BR	+	+	ÇUBUK	Y
18	9BM	+	+	KOK	
19	10BR	+	-	KOK	S
20	10BM	+	-	KOK	
21	11BR	+	-	KOK	Y
22	11BM	+	-	KOK	
23	12BR	+	-	KOK	S
24	12BM	+	-	KOK	
25	13BR	+	-	KOK	S
26	13BM	+	-	KOK	
27	13BA	+	-	KOK	S
28	14BR	+	-	ÇUBUK	Y
29	14BM	+	+	KOK	
30	14BA	+	-	KOK	
31	15BR	+	+	ÇUBUK	Y
32	15BM	+	-	ÇUBUK	
33	16BR	+	-	ÇUBUK	S
34	16BM	+	-	KOK	
35	17BR	+	-	ÇUBUK	Y
36	17BM	+	+	KOK	
37	18BR	+	-	ÇUBUK	Y
38	18BM	+	+	KOK	
39	19BR	+	-	KOK	S

Çizelge 4.1 KAA, M-17 ve MRS Agar'dan izole edilen LAB izolatlarının biyokimyasal test sonuçları (devam)

No	İzolat No	Gram Boyama	Katalaz Testi	Morfoloji	Zeytin Tipi
40	19BM	+	-	KOK	S
41	20BR	+	-	ÇUBUK	Y
42	20BM	+	-	KOK	
43	21BR	+	+	ÇUBUK	Y
44	21BM	+	-	ÇUBUK	
45	22BR	+	-	KOK	S
46	22BM	+	-	KOK	
47	23BR	+	-	ÇUBUK	Y
48	23BM	+	-	ÇUBUK	
49	24BR	+	+	ÇUBUK	Y
50	24BM	+	+	KOK	
51	25BR	+	-	KOK	Y
52	25BM	+	-	ÇUBUK	
53	26BR	+	-	KOK	S
54	26BM	+	-	KOK	S
55	26BA	+	-	KOK	
56	27BR	+	-	ÇUBUK	Y
57	27BM	+	-	KOK	
58	27BA	+	-	KOK	
59	28BR	+	-	KOK	Y
60	28BM	+	-	KOK	
61	28BA	+	-	KOK	
62	29BR	+	-	ÇUBUK	Y
63	29BM	+	-	ÇUBUK	
64	29BA	+	-	KOK	
65	30BR	+	-	ÇUBUK	Y
66	30BM	+	-	ÇUBUK	
67	30BA	+	-	KOK	
68	31BR	+	-	KOK	S
69	31BM	+	-	KOK	
70	32BR	+	-	KOK	Y
71	32BM	+	-	KOK	
72	33BR	+	-	KOK	S
73	33BM	+	+	KOK	
74	34BR	+	-	ÇUBUK	S
75	34BM	+	+	KOK	
76	35BR	+	-	ÇUBUK	Y
77	35BM	+	-	KOK	
78	36BR	+	-	KOK	S
79	36BM	+	+	KOK	

Çizelge 4.1 KAA, M-17 ve MRS Agar'dan izole edilen LAB izolatlarının biyokimyasal test sonuçları (devam)

No	İzolat No	Gram Boyama	Katalaz Testi	Morfoloji	Zeytin Tipi
80	36BA	+	-	KOK	S
81	37BR	+	-	ÇUBUK	Y
82	37BM	+	+	KOK	
83	37BA	+	-	KOK	
84	38BR	+	-	KOK	S
85	38BM	+	+	KOK	
86	39BR	+	+	ÇUBUK	S
87	39BM	+	-	KOK	
88	39BA	+	-	KOK	
89	40BR	+	-	KOK	Y
90	40BM	+	+	KOK	
91	40BA	+	-	KOK	
92	41BR	+	-	ÇUBUK	Y
93	41BM	+	-	KOK	
94	41BA	+	-	KOK	
95	42BR	+	-	KOK	S
96	42BM	+	-	KOK	
97	42BA	+	-	KOK	
98	43BR	+	-	ÇUBUK	Y
99	43BM	+	+	KOK	
100	44BR	+	-	KOK	Y
101	44BM	+	+	KOK	
102	45BR	+	+	ÇUBUK	Y
103	45BM	+	-	KOK	
104	46BR	+	-	KOK	S
105	46BM	+	-	ÇUBUK	
106	47BR	+	+	ÇUBUK	Y
107	47BM	+	-	KOK	
108	48BR	+	-	ÇUBUK	Y
109	48BM	+	-	KOK	
110	49BR	+	+	ÇUBUK	S
111	49BM	+	+	KOK	
112	50BR	+	-	KOK	Y
113	50BM	+	+	KOK	
114	51BR	+	-	KOK	Y
115	51BM	+	-	KOK	
116	51BA	+	-	KOK	
117	52BR	+	-	ÇUBUK	Y
118	52BM	+	-	KOK	
119	53BR	+	+	ÇUBUK	Y
120	53BM	+	-	KOK	
121	54BR	+	+	ÇUBUK	S

Çizelge 4.1 KAA, M-17 ve MRS Agar'dan izole edilen LAB izolatlarının biyokimyasal test sonuçları (devam)

No	İzolat No	Gram Boyama	Katalaz Testi	Morfoloji	Zeytin Tipi
122	54BM	+	+	KOK	S
123	55BR	+	+	ÇUBUK	Y
124	55BM	+	+	KOK	
125	56BR	+	+	KOK	S
126	56BM	+	+	ÇUBUK	
127	57BR	+	+	KOK	Y
128	57BM	+	-	KOK	
129	58BR	+	-	KOK	S
130	58BM	+	+	KOK	
131	59BR	+	-	KOK	Y
132	59BM	+	+	KOK	Y
133	60BR	+	-	KOK	Y
134	60BM	+	+	ÇUBUK	
135	61BR	+	-	KOK	Y
136	61BM	+	-	KOK	
137	62BR	+	-	KOK	Y
138	61BM	+	-	KOK	
139	63BR	+	-	KOK	Y
140	63BM	+	+	KOK	

*BR kodlu suşlar; MRS (De Man, Rogosa ve Sharpe Agar), BM kodlu suşlar; M-17 Agardan ve BA kodlu suşlar KAA (Kanamisin Eskulin Azid Agar) Agardan izole edilmiştir.

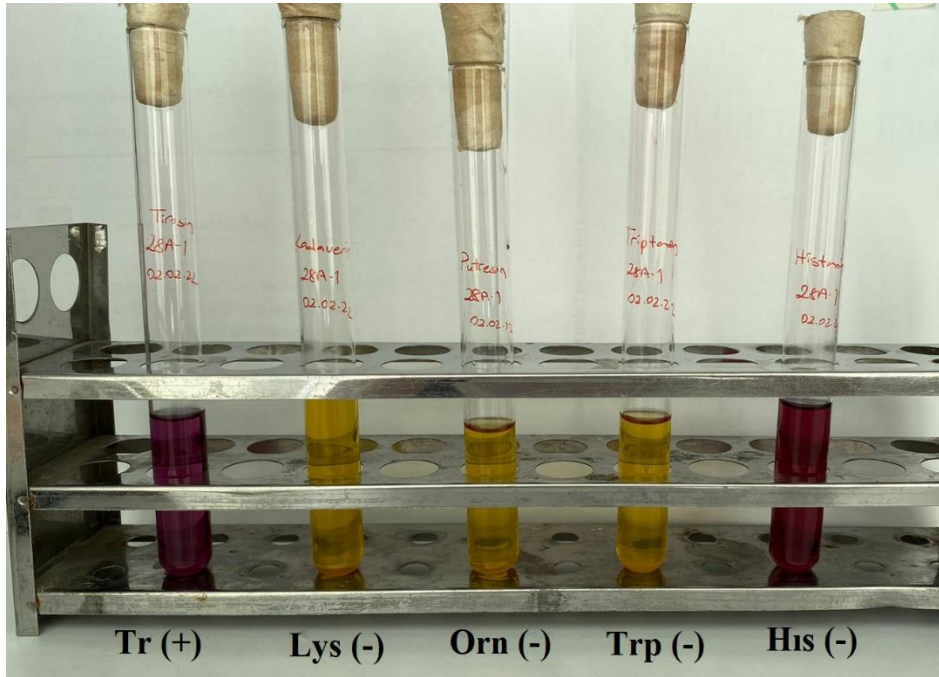
*Y: yeşil zeytin, S: siyah zeytin

Elde edilen sonuçlara göre; zeytin örneklerinin LAB florasının yaklaşık %14'ünü enterokok, %29'unu laktobasil ve %58'inin laktokok morfolojisinden oluştuğu belirlenmiştir. Buna karşın, dünyada ve ülkemizde yapılan fermente zeytin çalışmalarında, zeytindeki dominant mikrofloranın laktobasil cinsine ait olduğu Korukluoğlu vd. (2002); Tofalo vd. (2012); Hurtado vd. (2012) ve Yalçınkaya ve Kılıç (2019) tarafından tespit edilmiştir.

4.2 LAB İzolatlarının Aminoasit Dekarboksilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Zeytin örneklerinden elde edilen toplam 101 izolatın, öncelikli olarak biyojen amin üreticisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu bağlamda, putresin, kadaverin, histamin, tiramin ve triptamin hedef biyojen aminler olarak belirlenmiştir.

Laktokok, laktobasil ve enterokok suşları tarafından, hedef biyojen aminlerin üretilme durumları öncül aminoasitleri içeren dekarboksilaz broth ortamlarında ayrı ayrı incelenmiştir. Bu bağlamda, aminoasit içeren sıvı besiyerlerinde mor renk oluşumu pozitif reaksiyonu, sarı renk oluşumu ise negatif reaksiyonu ifade etmektedir (Mete, 2011). Aminoasit dekarboksilaz testi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Çizelge 4.2'de fermente zeytin örneklerinden izole edilen enterekok, laktobasil ve laktokok izolatlarının dekarboksilaz aktivite test sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Aminoasit dekarboksilaz testi (Tr: tirozin, Lys: lisin, Orn: ornitin, Trp: triptamin ve His: histidin)

Çizelge 4.2 Fermente zeytin örneklerinden izole edilen LAB izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri

NO	İZOLAT NO	TYR	CAD	PUT	TRP	HIS	ZEYTİN TİPİ
1	1BM	++	+++	+++	+++	-	Y
2	1BR	-	-	-	-	-	
3	2BM	++	+++	+++	+++	-	Y
4	3BM	+++	+++	+++	+	-	Y
5	4BM	+++	-	-	-	+	Y
6	4BR	+	-	-	+	-	
7	5BM	+++	+++	+++	+++	-	Y
8	5BR	-	-	-	-	-	
9	6BM	+++	+++	+++	+++	-	Y
10	7BR	+++	+++	+++	+++	-	
11	8BM	++	++	+++	+	-	Y
12	8BR	+++	++	+++	+++	-	
13	10BM	+	+++	+++	+	-	S
14	10BR	+++	+++	+++	+++	-	
15	11BM	++	+++	+++	++	-	Y
16	11BR	+++	+++	+++	++	+	
17	12BM	++	+++	+++	+++	-	S
18	12BR	+++	-	+++	+++	+++	
19	13BM	+++	+++	+++	+++	+++	S
20	13BR	+	-	-	+	-	
21	13BA	++	-	-	-	-	
22	14BR	-	-	-	-	-	Y
23	14BA	+++	-	-	-	-	
24	15BM	+	+++	+++	+++	-	Y
25	16BM	+++	+++	+++	+++	-	S
26	16BR	-	-	-	-	-	
27	17BR	-	-	-	-	-	Y
28	18BR	-	-	-	-	-	Y
29	19BM	-	+	++	-	-	S
30	19BR	+++	+++	+++	+++	-	
31	20BM	-	-	-	-	-	Y
32	20BR	+	-	+	-	-	
33	21BM	++	+++	+++	+	-	Y
34	22BM	-	-	-	-	-	S
35	22BR	+	-	-	-	-	
36	23BM	++	++	++	++	-	Y
37	23BR	+	+	++	-	+	
38	25BM	+++	+++	+++	+++	-	Y
39	25BR	-	+++	+++	++	-	

Çizelge 4.2 Fermente zeytin örneklerinden izole edilen LAB izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri (devam)

NO	İZOLAT NO	TYR	CAD	PUT	TRP	HIS	ZEYTİN TİPİ
40	26BM	-	-	-	-	-	S
41	26BR	-	-	-	-	-	
42	26BA	++	-	-	-	-	
43	27BM	+	+	-	-	-	Y
44	27BR	-	-	-	-	-	Y
45	27BA	+	-	-	-	-	
46	28BM	+++	+++	+++	+++	-	Y
47	28BR	+++	+++	+++	++	-	
48	28BA	+	-	-	-	-	
49	29BM	-	-	-	-	-	Y
50	29BR	-	-	-	-	-	
51	29BA	+	-	-	-	-	
52	30BM	++	++	++	+	-	Y
53	30BR	+	+	+	-	-	Y
54	30BA	++	-	-	-	-	
55	31BM	+++	-	+++	-	-	S
56	31BR	-	-	-	-	-	
57	32BM	-	+	+	-	+	Y
58	32BR	+	-	+	+	-	
59	33BR	+	+++	++	+++	-	S
60	34BR	-	+	-	-	-	S
61	35BM	++	+	++	++	+	Y
62	35BR	-	+	-	-	-	
63	36BR	-	-	-	-	-	S
64	36BA	+++	-	-	-	-	
65	37BR	-	-	-	-	-	Y
66	37BA	-	-	-	-	-	
67	38BR	+	+	+	-	-	S
68	39BM	-	-	-	-	-	S
69	39BA	+++	-	-	-	-	
70	40BR	-	-	+	-	-	Y
71	40BA	-	-	-	-	-	
72	41BM	++	-	-	-	-	Y
73	41BR	-	-	-	-	-	
74	41BA	+++	-	-	-	-	
75	42BM	++	-	-	-	-	S
76	42BR	++	-	-	-	-	
77	42BA	-	-	-	-	-	
78	43BR	-	-	-	-	-	Y
79	44BR	+	+	+	-	-	Y
80	45BM	++	+++	++	++	-	Y
81	46BM	-	-	-	-	-	S

Çizelge 4.2 Fermente zeytin örneklerinden izole edilen LAB izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri (devam)

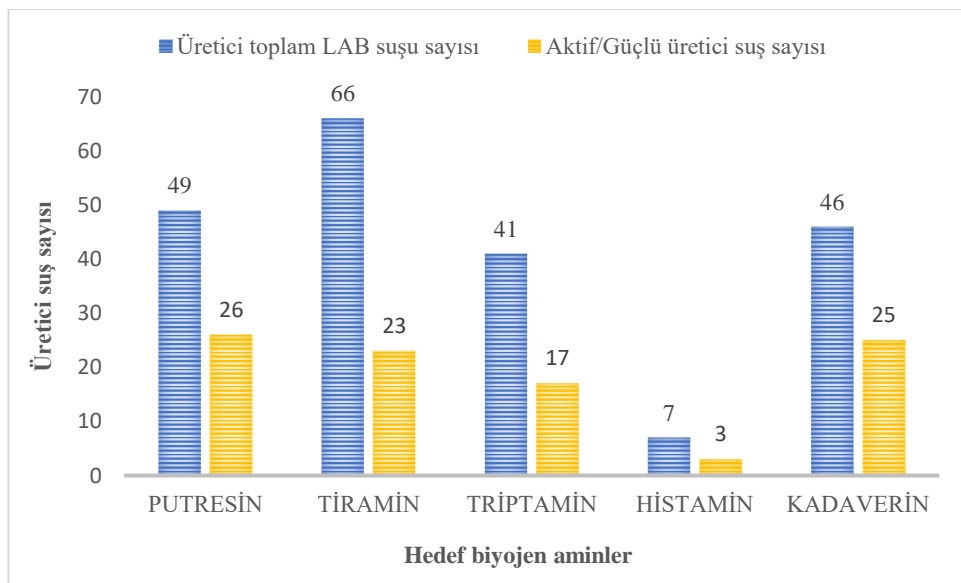
NO	İZOLAT NO	TYR	CAD	PUT	TRP	HIS	ZEYTİN TİPİ
82	46BR	-	-	-	-	-	
83	47BM	-	-	-	-	-	Y
84	48BM	+	++	++	++	-	Y
85	48BR	-	-	-	-	-	
86	50BR	-	+	-	-	-	Y
87	51BM	+++	-	++	+	-	Y
88	51BR	+++	-	-	-	-	Y
89	51BA	+	-	++	-	-	
90	52BM	++	-	-	-	-	Y
91	52BR	++	-	-	-	-	
92	53BM	++	+++	++	+	-	Y
93	57BM	++	+++	+++	+++	-	Y
94	58BR	+	+	+	+	-	S
95	59BR	++	++	++	+	-	Y
96	60BR	++	++	++	+	-	Y
97	61BM	-	-	-	-	-	Y
98	61BR	+++	+++	+++	++	-	
99	62BM	+	++	+	++	-	Y
100	62BR	-	-	-	-	-	
101	63BR	++	++	++	++	-	Y

(-): Üretici değil (Broth ortamda görülen sarı renk)

(+): Zayıf üretici (Broth ortamda görülen açık mor-kırmızımsı renk)

(++): Orta derecede üretici (Broth ortamda görülen mor renk)

(+++): Güçlü üretici (Broth ortamda görülen parlak mor renk)



Şekil 4.2 Dekarboksilaz sıvı besiyerinde LAB suşlarının biyojen amin üretim sayısı

Çalışma kapsamında, zeytinden izole edilen LAB suşları tarafından en az dekarboksile edilen aminoasitin histidin olduğu Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Yalnızca 7 LAB suşunun histamin üreticisi (4BM, 13BM, 32BM, 35BM, 11BR, 12BR, 23BR) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Tez çalışmasında, histaminden sonra 41 LAB suşunun triptamin üreticisi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Üretici laktobasil suşları; 2BM, 15BM, 21BM, 23BM, 25BM, 30BM, 7BR, 8BR ve enterokok suşlarının ise; 1BM, 8BM, 48BM, 51BM ve 10BR olduğu tespit edilmiştir. Geriye kalan 3BM, 5BM, 6BM, 10BM, 11BM, 12BM, 13BM, 16BM, 28BM, 35BM, 45BM, 53BM, 57BM, 62BM, 11BR, 12BR, 13BR, 19BR, 25BR, 28BR, 32BR, 33BR, 58BR, 59BR, 60BR, 61BR, 63BR nolu izolatların ise laktokok suşları olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). 17 izolat (1BM, 2BM, 5BM, 6BM, 7BR, 8BR, 10BR, 12BM, 12BR, 13BM, 15BM, 16BM, 19BR, 25BM, 28BM, 33BR ve 57BM) ise güçlü triptamin üreticisi olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

46 LAB suşunun kadaverin ürettiği Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Bu suşların, 25’i aktif biyojen amin üreticisi olarak tanımlanmıştır. Bu suşlar; 1BM, 2BM, 3BM, 5BM, 6BM, 7BR, 10BM, 10BR, 11BM, 11BR, 12BM, 13BM, 15BM, 16BM, 19BR, 21BM, 25BM, 25BR, 28BM, 28BR, 33BR, 53BM, 57BM ve 61BR’dir (Çizelge 4.2).

Zeytindeki LAB suşları tarafından, tiraminden sonra en fazla üretilen biyojen aminin putresin olduğu Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Ornitin aminoasidini dekarboksile eden enterokok suşları; 1BM, 8BM, 19BM, 31BM, 48BM, 51BM, 10BR, 40BR, 44BR ve 51BA; laktobasil suşları ise 2BM, 15BM, 21BM, 23BM, 25BM, 30BM, 7BR, 8BR, 20BR ve 23BR’dir. Geriye kalan putresin üreticileri ise laktokok suşları olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

Son olarak, tez çalışmasında LAB suşları tarafından en fazla üretilen biyojen aminin tiramin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Bu bağlamda, tirozin aminoasidini dekarboksile eden enterokok suşları; 1BM, 4BM, 8BM, 27BM, 31BM, 48BM, 51BM, 52BM, 10BR, 22BR, 42BR, 44BR, 13BA, 14BA, 26BA, 27BA, 28BA, 29BA, 30BA, 36BA, 39BA, 41BA ve 51BA’dır. Üretici laktokok suşları; 3BM, 5BM, 6BM, 10BM,

11BM, 12BM, 13BM, 16BM, 28BM, 35BM, 41BM, 42BM, 45BM, 53BM, 57BM, 62BM, 11BR, 12BR, 13BR, 19BR, 28BR, 32BR, 33BR, 38BR, 51BR, 58BR, 59BR, 60BR, 61BR, 63BR ve laktobasil suşları ise; 2BM, 15BM, 21BM, 23BM, 25BM, 30BM, 4BR, 7BR, 8BR, 20BR, 23BR, 30BR, 52BR nolu izolatlardır.

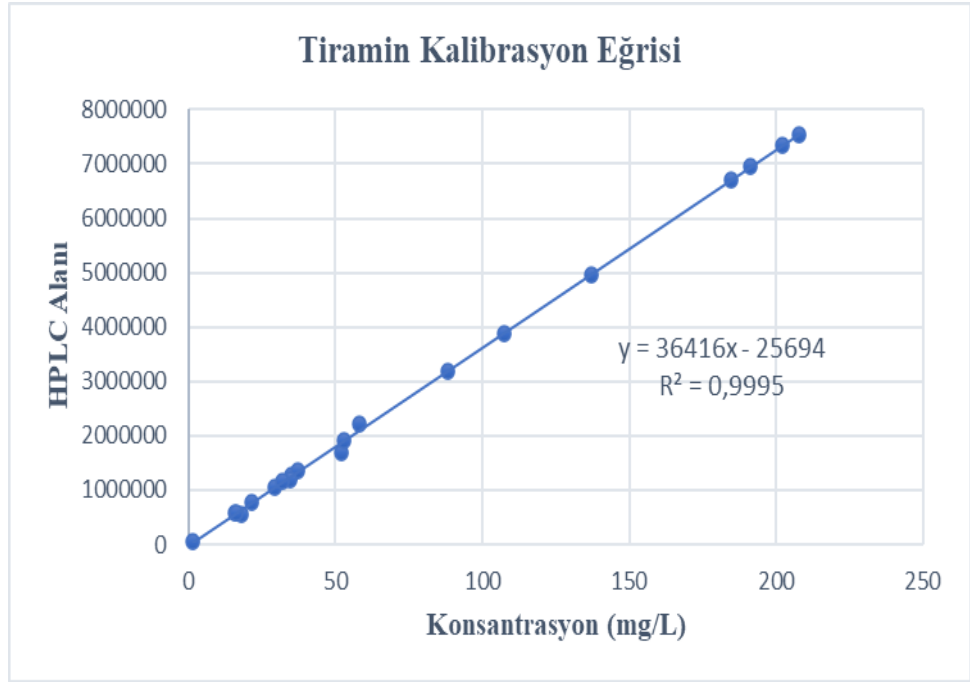
Biyojen aminlerin varlığı, fermente gıdalar başta olmak üzere sofralık zeytinlerde rapor edilmiştir (Bautista-Gallego vd. 2020). Ancak, literatürde fermente zeytindeki laktik asit suşları tarafından sentezlenen biyojen aminlerin araştırıldığı çalışma sayısı sınırlıdır. Yapılan bir çalışmada, Bevilacqua vd. (2010) İtalyan sofralık zeytinlerinden elde edilen LAB izolatlarının histamin, kadaverin, tiramin ve putresin üretimini, tez çalışmamızda kullandığımız gibi, Bover-Cid ve Holzapfel (1999) tarafından yapılan niteliksel testle değerlendirmişlerdir. Bu test sonucunda, incelenen tüm suşların biyojen amin üretimine yönelik analizi negatif olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Abriouel vd. (2012) fermente yeşil sofralık zeytinlerinden elde edilen laktobasil, pediokok ve lökonostok suşlarının hiçbirinin putresin, histamin ve tiramin üretimi göstermediğini saptamışlardır. Bununla birlikte, Yalçınkaya ve Kılıç (2019) Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan zeytin örneklerindeki LAB suşlarının lisin ve histidin amino asitlerini içeren besiyerinde renk değişimi göstermediklerini saptamışlardır. Buna karşın, zeytinden izole edilen *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus acidipiscis* ve *Lactobacillus plantarum* suşlarının tiramin ürettiği belirlenmiştir.

Bununla birlikte, diğer fermente gıdalarda LAB tarafından en fazla sentezlenen biyojen aminin tiramin olduğu çeşitli araştırmalarda belirlenmiştir (Bover-Cid vd. 2001; Nieto-Arribas vd. 2009; Garai vd. 2007; Kalhotka vd. 2012; Yüceer ve Özden Tuncer, 2015; Ertürkmen ve Öner, 2015; Poveda vd. 2017; Mete vd. 2017). Tez çalışmamızda, hedef biyojen aminlerin oluşumu açısından 101 LAB suşu incelendiğinde, bu suşlar tarafından en fazla tiramin üretildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Dolayısıyla, çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur.

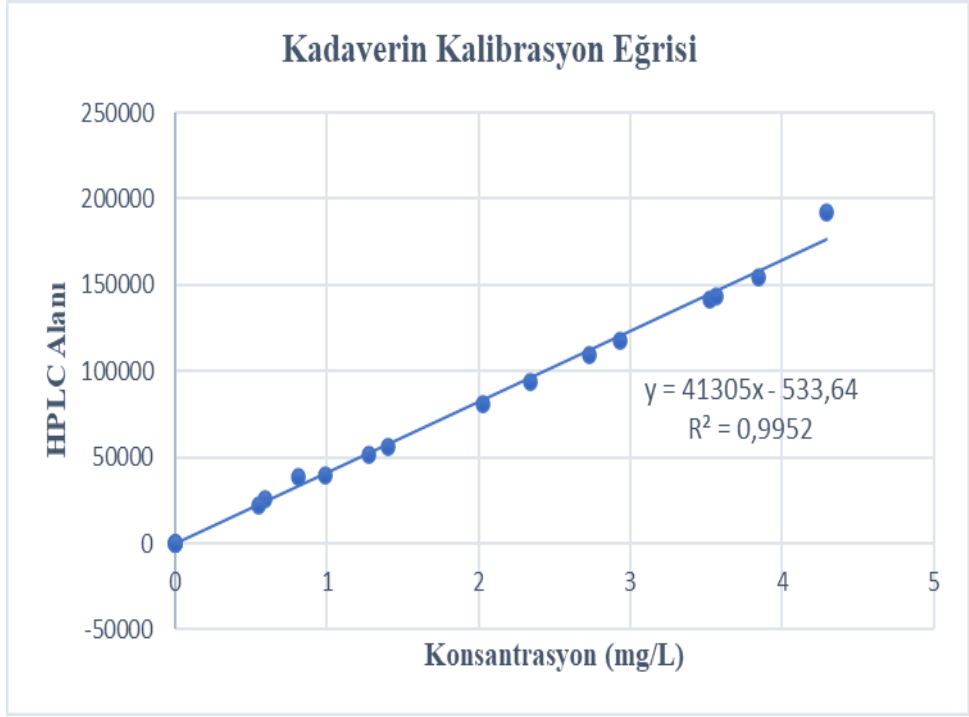
4.3 LAB Suşları Tarafından Üretilen Biyojen Amin Miktarının Saptanması

4.3.1 Biyojen aminlerin kalibrasyon grafikleri

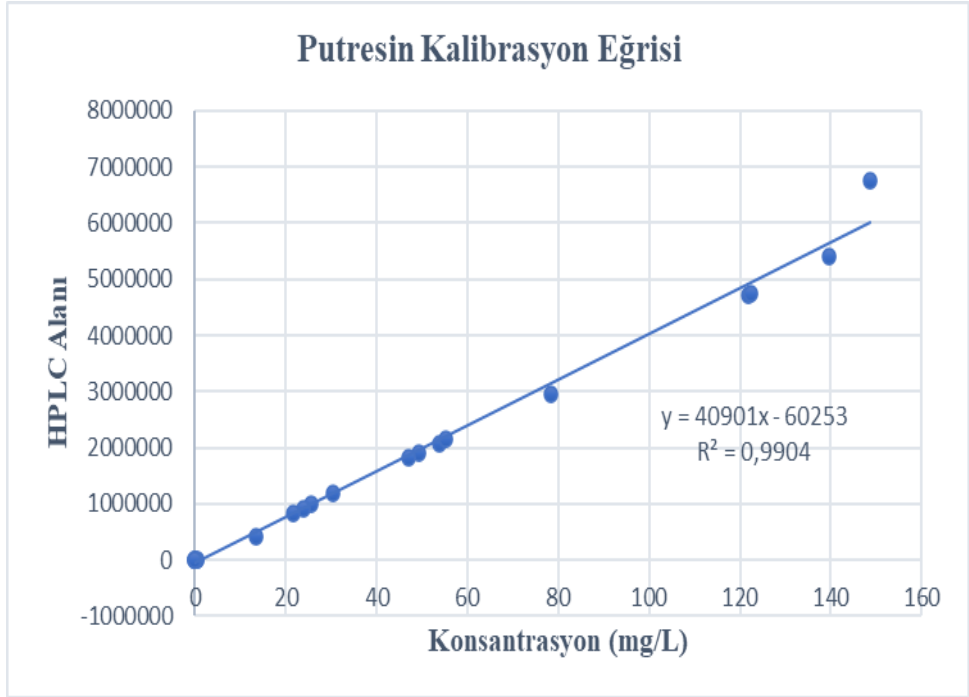
Biyojen aminlerin kalibrasyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da yer almaktadır.



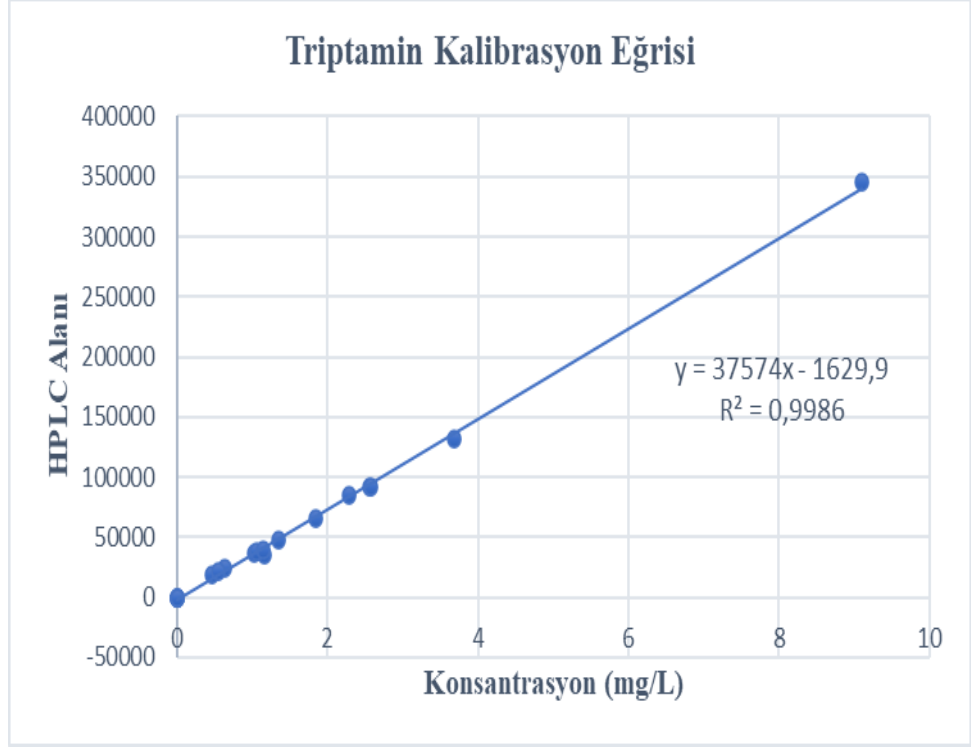
Şekil 4.3 Tiramin kalibrasyon grafiği



Şekil 4.4 Kadaverin kalibrasyon grafiği



Şekil 4.5 Putresin kalibrasyon grafiği



Şekil 4.6 Triptamin kalibrasyon grafiği

4.3.2 Biyojen amin miktarlarının saptanması

Aminoasit dekarboksilaz testi pozitif çıkan 72 LAB suşunun, biyojen amin oluşturma kapasitesi HPLC cihazıyla kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler, Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Fermente zeytin örneklerinden izole edilen LAB izolatlarının oluşturdukları hedef biyojen aminlerin konsantrasyonları (mg/L)

Yeşil zeytin	NO	İZOLAT NO	TYR	CAD	PUT	TRP	HIS	TOPLAM BA
	1	1BM	191,346	0,593	0,400	0,000	0,000	192,339
	2	2BM	1,127	0,000	0,000	1,420	0,000	2,547
	3	3BM	1,001	0,000	0,000	1,452	0,000	2,453
	4	4BM	184,531	0,549	0,000	0,640	0,000	185,72
	5	4BR	19,254	0,000	0,000	1,798	0,000	21,052
	6	5BM	0,988	0,000	0,000	0,000	0,000	0,988
	7	6BM	1,149	0,000	0,000	1,625	0,000	2,774
	8	7BR	21,953	0,000	0,000	0,717	0,000	22,67
	9	8BM	1,363	0,000	0,426	1,355	0,000	3,144
	10	8BR	15,655	0,000	0,000	0,638	0,000	16,293
	11	11BM	0,691	0,000	0,000	1,133	0,000	1,824
	12	11BR	14,817	0,000	0,000	2,128	0,000	16,945
	13	14BA	207,265	0,000	0,000	2,608	0,000	209,873
	14	15BM	1,029	0,000	0,000	1,501	0,000	2,53
	15	20BR	15,113	0,886	48,781	0,000	0,000	64,78
	16	21BM	0,876	0,000	0,000	1,796	0,000	2,672
	17	23BM	1,279	0,000	0,000	1,466	0,000	2,745
	18	23BR	21,097	0,000	0,000	2,246	0,000	23,343
	19	25BM	0,756	0,000	0,000	0,871	0,000	1,627
	20	25BR	72,093	0,990	0,000	1,102	0,000	74,185
	21	27BM	202,099	0,000	0,000	0,000	0,000	202,099
	22	27BA	202,254	0,000	0,000	0,000	0,000	202,254
	23	28BM	0,873	0,000	0,000	2,075	0,000	2,948
	24	28BR	21,917	0,000	0,000	1,601	0,000	23,518
	25	28BA	0,865	0,000	0,000	0,000	0,000	0,865
	26	29BA	226,676	7,997	0,000	24,651	0,000	259,324
	27	30BM	0,448	0,000	0,000	0,995	0,000	1,443
	28	30BR	3,765	1,570	0,671	0,000	0,000	6,006
	29	30BA	40,822	0,831	54,285	0,000	0,000	95,938
	30	32BM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	31	32BR	13,933	4,018	51,343	0,000	0,000	69,294
	32	35BM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	33	35BR	16,367	3,904	35,853	0,536	0,000	56,66
	34	40BR	21,386	4,295	49,304	0,000	0,000	74,985
	35	41BM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	36	41BA	32,057	1,280	139,620	3,684	0,000	176,641
	37	44BR	15,789	2,026	46,997	0,000	0,000	64,812
	38	45BM	0,678	0,000	1,387	0,000	0,000	2,065
	39	48BM	52,185	3,564	21,604	2,284	0,873	80,51
	40	50BR	16,004	2,340	23,811	0,462	0,000	42,617
	41	51BM	58,158	0,000	30,314	2,558	0,000	91,03
42	51BR	3,056	1,696	0,598	0,000	0,000	5,35	

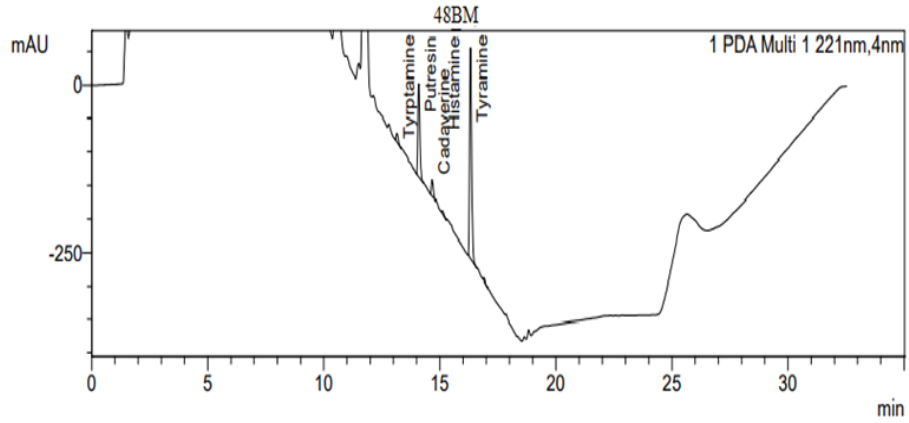
Çizelge 4.3 Fermente zeytin örneklerinden izole edilen LAB izolatlarının oluşturdukları hedef biyojen aminlerin konsantrasyonları (mg/L) (devam)

	NO	İZOLAT NO	TYR	CAD	PUT	TRP	HIS	TOPLAM BA	
Yeşil zeytin	43	51BA	22,965	0,000	93,817	0,000	0,000	116,782	
	44	52BM	52,797	2,936	13,518	1,851	0,000	71,102	
	45	52BR	2,800	1,595	0,485	0,000	0,000	4,88	
	46	53BM	4,932	1,197	0,469	0,798	0,000	7,396	
	47	57BM	0,000	0,000	11,562	25,183	0,000	36,745	
	48	59BR	35,242	13,923	3,094	4,058	0,000	56,317	
	49	60BR	30,739	0,000	0,000	0,000	0,000	30,739	
	50	61BR	257,939	0,000	0,000	0,000	0,000	257,939	
	51	62BM	0,000	0,000	12,814	16,120	0,000	28,934	
	Siyah zeytin	52	10BM	1,172	0,000	0,000	1,514	0,000	2,686
		53	10BR	107,251	0,815	0,000	1,160	0,000	109,226
54		12BM	1,090	0,000	0,000	0,751	0,000	1,841	
55		12BR	21,208	0,000	0,000	1,943	0,000	23,151	
56		13BM	1,145	0,000	0,000	1,539	0,000	2,684	
57		13BR	13,178	0,000	0,000	0,870	0,000	14,048	
58		13BA	207,618	0,000	0,000	2,572	0,000	210,19	
59		16BM	1,057	0,000	0,000	1,477	0,000	2,534	
60		19BM	136,999	3,528	55,355	1,019	0,000	196,901	
61		19BR	3,312	1,852	0,568	0,000	0,000	5,732	
62		22BR	17,960	2,732	25,726	0,000	0,000	46,418	
63		26BA	37,170	0,000	122,530	0,548	0,000	160,248	
64		31BM	88,080	3,849	121,696	1,053	0,000	214,678	
65		33BR	3,888	1,436	0,637	0,374	0,000	6,335	
66		34BR	16,121	2,230	36,702	0,000	0,000	55,053	
67		36BA	29,245	1,403	78,437	1,152	0,000	110,237	
68		38BR	5,412	1,286	0,617	0,000	0,000	7,315	
69	39BA	34,567	0,000	148,718	9,095	0,000	192,38		
70	42BM	0,468	0,000	0,000	1,363	0,000	1,831		
71	42BR	35,078	0,989	53,708	0,000	0,000	89,775		
72	58BR	0,000	0,000	0,000	22,785	0,000	22,785		

*TYR : tiramin,
 *CAD : kadaverin,
 *PUT : putresin,
 *TRP : triptamin,
 *HIS : histamin.

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre; enterekok, laktobasil ve laktokok suşlarının ürettiği tiramin ve triptamin konsantrasyonları sırasıyla 0,448 – 257,939 mg/L ve 0,374 – 25,183 mg/L arasında değişkenlik göstermiştir. Ayrıca, 70 LAB izolatının histamin

konsantrasyonları 0,000 mg/L olarak belirlenirken; yalnızca 48BM izolat nolu örnekte histamin 0,873 mg/L olarak saptanmıştır. Bununla birlikte, suşların ürettiği putresin içeriği en az 0,400 mg/L ila en fazla 148,718 mg/L olarak bulunmuştur. Bu suşlar tarafından, üretilen kadaverin konsantrasyonunun ise (en az 0,549 mg/L, en fazla 13,923 mg/L) hem putresin hem de tiramin miktarından çok daha düşük olduğu Çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

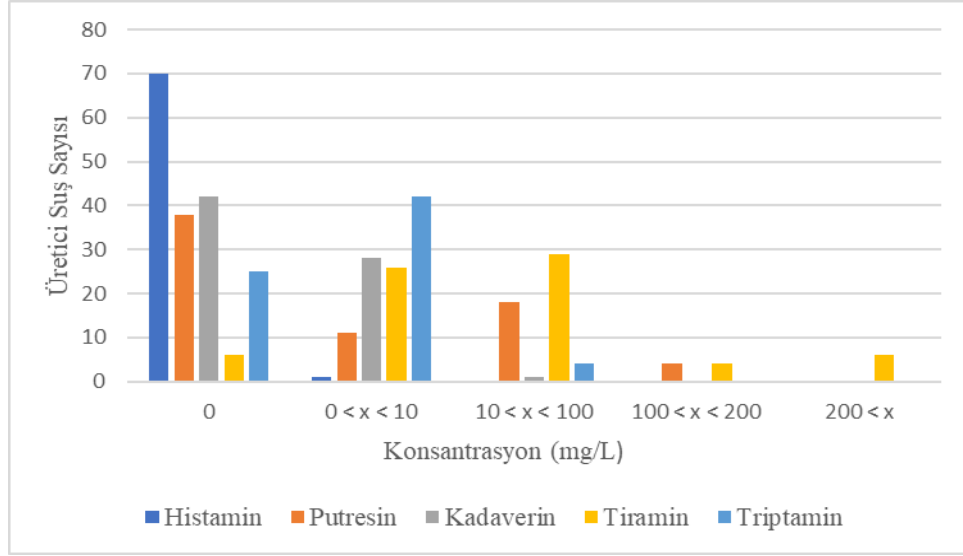


Şekil 4.7 48BM nolu LAB izolatının kromatogramı

48BM izolat nolu LAB suşu tarafından üretilen en yüksek konsantrasyona sahip biyojen aminin 52,185 mg/L ile tiramin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, tez çalışmasında yalnızca bu suş tarafından 0,873 mg/L konsantrasyonda histamin üretildiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, değişen konsantrasyonlarda putresin (21,604 mg/L) ve kadaverin (3,564 mg/L) üretildiği de saptanmıştır. Tez çalışması kapsamında mevcut suşun hedeflenen beş biyojen amini üreten tek suş olduğu belirlenmiştir.

Fermente zeytin örneklerinden izole edilen LAB suşlarının yaklaşık %92,0’si (66/72) tiramin; %40’ı (29/72) kadaverin; %46’sı (33/72) putresin; %65’i (47/72) triptamin ve %1,4’ü (1/72) histamin üretmiştir. Bununla birlikte, fermente zeytinden izole edilen suşların önemli bir kısmının tirozin amino asidini dekarboksile ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). Buna karşın, histamin için bu durum geçerli değildir. Benzer bir sonuç, fermente zeytin örneklerinde Bevilacqua vd. (2010) tarafından da saptanmıştır. Çizelge 4.3’te görüldüğü üzere, 33BR nolu izolat triptamin için 0,374 mg/L ile en düşük

konsantrasyonda biyojen amin üretici suş olmasına rağmen, 61BR nolu izolat en yüksek tiramin üreticisi suş olarak belirlenmiştir.



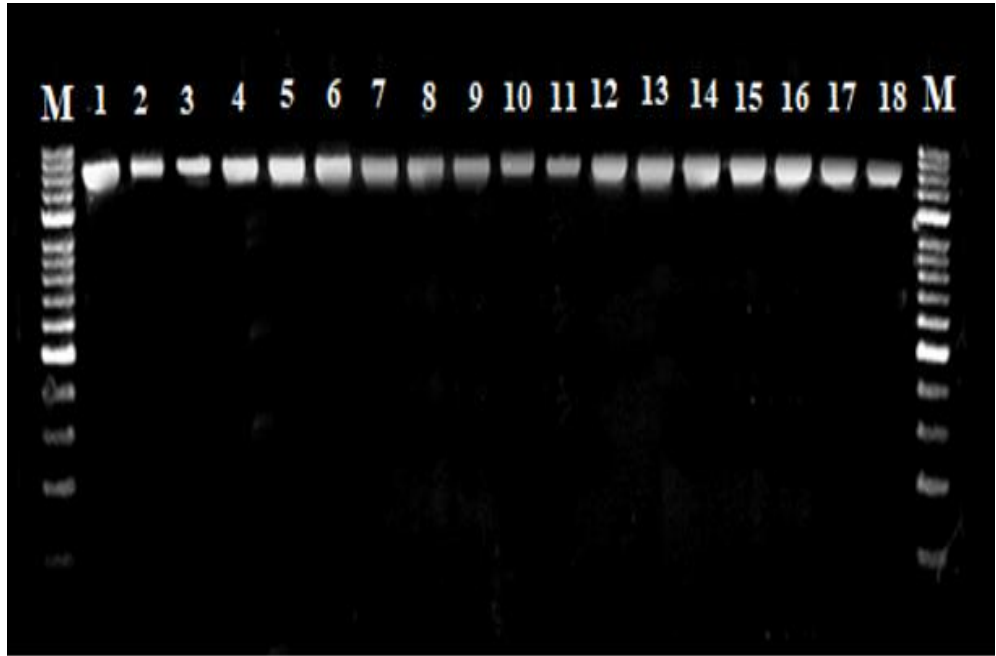
Şekil 4.8 LAB suşları tarafından üretilen biyojen aminlerin konsantrasyona göre sayıca dağılımı

ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), fermente gıdalarda toplam biyojen amin miktarının 1000 mg/Kg'ı geçmemesi gerektiğini ve 100-800 mg/Kg arasındaki tiramin konsantrasyonlarının bireylerde çeşitli toksik etkilere sebep olduğunu vurgulamışlardır (Düz ve Fidan, 2016). Mevcut tez çalışmasında izole edilen 1OBR, 13BA, 14BA, 27BA, 1BM, 4BM, 27BM, 19BM, 61BR ve 29BA izolat nolu LAB suşlarının bu konsantrasyonlar arasında tiramin ürettiği belirlenmiştir.

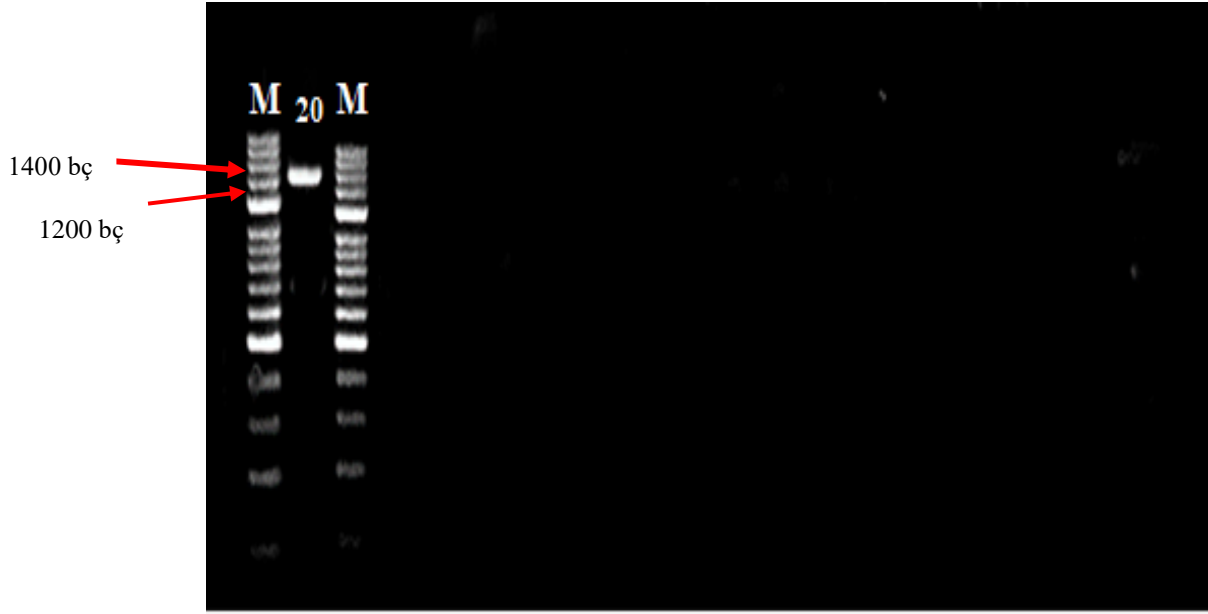
Biyojen aminlerin olumsuz sağlık etkilerinin yanı sıra, yüksek konsantrasyonlarda putresin ve kadaverin (50-100 mg/L), fermente gıdaların organoleptik özellikleri üzerinde kötü bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Özellikle bu durumun fermente şaraplarda çeşitli özelliklerin kaybolmasına ve şarapta metalik, etimsi ve/veya kokuşmuş bir aroma oluşumuna neden olabileceği Alvarez ve Moreno-Arribas (2014) tarafından bildirilmiştir. Bu bağlamda, LAB suşlarının %25,35'i ve %1,40'ı 10 ila 100 mg/L arasında sırasıyla putresin ve kadaverin üretmiştir (Şekil 4.8). Bununla birlikte, 19BM, 31BM, 32BR, 42BR, 26BA, 30BA, 36BA, 39BA, 41BA ve 51BA izolat nolu suşların ise ürettiği putresin miktarı 50 mg/L'den yüksek bulunmuştur.

4.4 LAB Suşlarının 16S rDNA Dizi Analizi ile Moleküler Düzeyde Tanımlanması

HPLC-DAD cihazı vasıtasıyla triptamin, kadaverin, putresin, tiramin ve histamin üretimi bakımından yüksek konsantrasyonlarda üretici olan bazı LAB suşları (10BR, 22BR, 40BR, 42BR, 44BR, 50BR, 1BM, 4BM, 8BM, 19BM, 27BM, 31BM, 48BM, 51BM, 52BM, 13BA, 26BA, 36BA, 41BA) belirlenmiştir. Bu suşların 16S rDNA analizi ile tür düzeyinde moleküler tanımlaması yapılmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 PZR ile çoğaltılan LAB suşlarının 16S rDNA fragmentleri



Şekil 4.9 PZR ile çoğaltılan LAB suşlarının 16S rDNA fragmentleri (devamı)

M: M O'Gene Ruler DNA marker (bç) : 1500, 1200, 1000, 800, 700, 600, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 150, 100, 50

1: 42BR	11: 19BM
2: 40BR	12: 50BR
3: 10BR	13: 52BM
4: 4BM	14: 51BM
5: 44BR	15: 31BM
6: 22BR	16: 36BA
7: 48BM	17: 26BA
8: 8BM	18: 39BA
9: 27BM	19: 41BA
10: 1BM	20: 13BA

Elde edilen ürünlerin büyüklüğünün min 1200 bp ila max 1400 bp arasında olduğu Şekil 4.9'da gösterilmiştir. 16S rDNA gen bölgesinin çift yönlü dizi analizi sonuçları, BLAST programı kullanılarak NCBI veri tabanında bulunan 16S rDNA dizileriyle karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 LAB suşlarının 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre tür düzeyinde tanımlanması

İzolat No	İleri (F)	Benzerlik Oranı (%)	Geri (R)	Benzerlik Oranı (%)	16S rDNA Dizisine Göre Yapılan Tanı
10BR	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>
22BR	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
40BR	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>
42BR	<i>Enterococcus lactis</i>	100	<i>Enterococcus lactis</i>	100	<i>Enterococcus lactis</i>
44BR	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
50BR	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
1BM	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
4BM	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
8BM	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
19BM	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
27BM	<i>Enterococcus lactis</i>	100	<i>Enterococcus lactis</i>	100	<i>Enterococcus lactis</i>
31BM	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
48BM	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
51BM	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
52BM	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>
13BA	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
26BA	<i>Enterococcus lactis</i>	100	<i>Enterococcus lactis</i>	100	<i>Enterococcus lactis</i>
36BA	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
39BA	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
41BA	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>

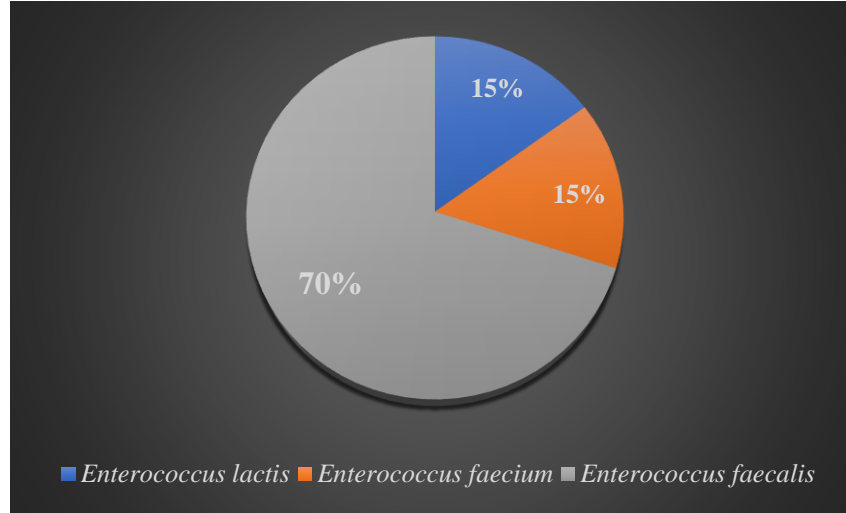
Çizelge 4.5 Tanımlanan LAB suşlarının ürettikleri biyojen amin konsantrasyonları (mg/L)

Suş Türü	No	İzolat No	TYR	CAD	PUT	TRP	HIS	Toplam BA	Zeytin Tipi
<i>E. faecium</i>	1	10BR	107,251	0,815	0,000	1,160	0,000	109,226	S
	2	40BR	21,386	4,295	49,304	0,000	0,000	74,985	Y
	3	52BM	52,797	2,936	13,518	1,851	0,000	71,102	Y
<i>E. faecalis</i>	4	22BR	17,960	2,732	25,726	0,000	0,000	46,418	S
	5	44BR	15,789	2,026	46,997	0,000	0,000	64,812	Y
	6	50BR	16,004	2,340	23,811	0,462	0,000	42,617	Y
	7	1BM	191,346	0,593	0,400	0,000	0,000	192,339	Y
	8	4BM	184,531	0,549	0,000	0,640	0,000	185,72	Y
	9	8BM	1,363	0,000	0,426	1,355	0,000	3,144	Y
	10	19BM	136,999	3,528	55,355	1,019	0,000	196,901	S
	11	31BM	88,080	3,849	121,696	1,053	0,000	214,678	S
	12	48BM	52,185	3,564	21,604	2,284	0,873	80,51	Y
	13	51BM	58,158	0,000	30,314	2,558	0,000	91,03	Y
	14	13BA	207,618	0,000	0,000	2,572	0,000	210,19	S
	15	36BA	29,245	1,403	78,437	1,152	0,000	110,237	S
	16	39BA	34,567	0,000	148,718	9,095	0,000	192,38	S
	17	41BA	32,057	1,280	139,620	3,684	0,000	176,641	Y
<i>E. lactis</i>	18	42BR	35,078	0,989	53,708	0,000	0,000	89,775	S
	18	27BM	202,099	0,000	0,000	0,000	0,000	202,099	Y
	20	26BA	37,170	0,000	122,530	0,548	0,000	160,248	S

*TYR : tiramin, CAD : kadaverin, PUT : putresin, TRP : triptamin ve HIS : histamin

*Y : yeşil zeytin; S : siyah zeytin

Tez çalışmamızda, en yüksek toplam biyojen amin içeriğine 214,678 mg/L konsantrasyonla 31BM izolat nolu *Enterococcus faecalis* türü sahiptir. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus lactis* türleri arasında üretilen en yüksek biyojen amin içeriği sırasıyla 109,226 mg/L ve 202,099 mg/L olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).



Şekil 4.10 Enterokok suşlarının tür düzeyinde yüzdeler dağılımı

Elde edilen dizilere göre, fermente zeytin örneklerinde üç tür tanımlanmıştır. Bunlar; *Enterococcus faecalis* (%70), *Enterococcus lactis* (%15) ve *Enterococcus faecium* (%15)'dur. Yeşil ve siyah zeytin örneklerinin her ikisinde de dominant tür olarak *Enterococcus faecalis* bulunmuştur. Rehaiem vd. (2016) Tunus'ta hasat edilen 10 yeşil zeytin örneğinden toplam 20 LAB suşu izole etmişlerdir. Bu suşların, 8'i *Enterococcus faecium*, 3'ü *E. faecalis*, 2'si *E. casseliflavus* ve 7'si *E. durans* olarak tür düzeyinde belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada, Anagnostopoulos vd. (2018) Kıbrıs yeşil sofralık zeytinlerinden elde edilen 64 izolatin hepsinin spesifik PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yoluyla *Enterococcus faecium* türüne ait olduğunu saptamışlardır. El Issaoui vd. (2017) 127 adet sofralık zeytin örneğinden toplam 143 LAB suşu izole etmiştir. Bu izolatlardan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal kriterleri sonucu *Enterococcus* (%66,6), *Leuconostoc* (%26,6) ve *Lactobacillus* (%6,8) laktik cinslerine ait olduğu belirlenmiştir.

Yalçınkaya ve Kılıç, (2019) Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan (Antalya, Burdur, İzmir, Isparta ve Eskişehir) zeytin örneklerinden elde edilen izolatların genetik analizine göre; %57,53'sini *Lactobacillus plantarum*, %27,39'unu *Lb. acidipiscis*, %9,58'ini *Enterococcus faecium*, %2,73'ünü *Lb. alimentarius*, %1,36'sını *Lb. farciminis* ve *Lb. namurensis*'in oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, izole edilen *Enterococcus faecium* suşlarının biyojen amin sentezlemediğini saptamışlardır. Buna karşın, çalışmamızda fermente zeytinlerden izole edilen tüm *Enterococcus faecium* suşlarının hedef biyojen aminlerden yalnızca histamini üretmediği Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Bununla birlikte, ülkemizde yapılan bir başka çalışmada, Korukluoğlu vd. (2002) Balıkesir, Bursa ve Manisa illerinden elde edilen 3'ü yeşil olmak üzere toplam 18 fermente zeytin örneğinin 12'sinden LAB izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen 38 izolatın 12 tanesinin *Lactobacillus plantarum* (%31,58), 4 tanesinin *Lb. brevis* (%10,52), 17 tanesinin *Leuconostoc mesenteroides* (%44,74), 4 tanesinin *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (%10,53) ve sadece 1 tanesinin *Pediococcus damnosus* (%2,63) türüne ait oldukları saptanmıştır.

Tofalo vd. (2012)'de Itrana bianca, Peranzana, Nocellara del Belice, Bella di Cerignola ve Cellina di Nardo` zeytin çeşitlerinde baskın biyotayı laktobasil cinsinin temsil ettiğini belirtmişlerdir. Benzer bir sonuç, sofralık zeytinlerde Hurtado vd. (2012) ve Doulgeraki vd. (2013) tarafından da tespit edilmiştir.

El Issaoui vd. (2021) Fas'ın farklı bölgelerinden toplanan sofralık zeytinlerde, MRS Agar kullanarak 38 LAB suşu izole etmişlerdir ve bu suşların moleküler tanımlaması için PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi kullanılmışlardır. Moleküler identifikasyona göre, *Enterococcus faecium* 32 suşla (%84,21) izole edilen en baskın tür olmuştur. Bu sonuçlar, zeytinlerin laktik asit bakterilerinin biyolojik çeşitliliği açısından çeşitli bir ekosistem oluşturduğunu ve bunun nihai ürünün kalitesini ve güvenliğini etkileyebileceğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, yapılan tez çalışmasında da hem siyah zeytinden hem de yeşil zeytinden izole edilen suşların her ikisinde de enterokok cinsinin dominant olduğu bulunmuştur.

Ladore vd. (2012) et, peynir ve yoğurt gibi gıdalardan izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* suşlarının tiramin ve putresin üretme yeteneğini ince tabaka kromatografisi (TLC) ve HPLC cihazları kullanarak değerlendirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, tiramin sentezi *E. faecium* ve *E. faecalis*'in ve putresin sentezi ise *E. faecalis*'in tür düzeyinde bir özelliği olduğu tespit edilmiştir. Mevcut çalışmamızda, fermente zeytinden izole edilen bu suşların da hedef biyojen aminlerden en az birini sentezleyebildiği HPLC cihazı ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.5).

Yakın tarihte araştırılan diğer fermente gıdalar incelendiğinde; Moracanın vd. (2015) Uzicka sosislerinden izole edilen 24 LAB'ın biyojen amin (tiramin, putresin, triptamin, kadaverin, spermin, histamin ve sepermidin) üretimini sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi kullanılarak araştırmışlardır. Benzer şekilde, mikroorganizmaların dekarboksilaz aktivitesi, 24 saatlik kültivasyondan sonra gelişme ortamında incelenmiştir. Araştırma, hiçbir izolatan triptamin üretmediğini, yalnızca 1 suşun sepermidin ürettiğini ve geri kalan aminlerin ise çok düşük miktarlarda üretildiğini göstermiştir. Biyojen aminler içerisinde üretilen en yüksek konsantrasyon ise 22.56 µg/mL ile histamin bulunmuştur. Sonuç olarak, Uzicka sosisinden izole edilen LAB'ın *in vitro* önemli amin üreticileri olmadığını gösterilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, Li vd. (2022) Çin'in geleneksel soya ürünü sufu'dan 54 bakteri suşu izole etmişlerdir. İzole edilen bakterilerin, MRS brothda biyojen amin üretme yeteneği HPLC ile karakterize edilmiştir. Ön kolorimetrik taramaya göre, bu suşların 32'sinin biyojen amin üreten suş (reaksiyon mor renk göstermiştir) olduğunu tespit edilmiştir. Sufudaki *Enterococcus faecalis* WS-4-6 suşunun yüksek konsantrasyonda (735,05 µg/mL) tiramin üretebildiğini saptanmıştır.

5. SONUÇ

- Bu çalışmada Mersin, Bursa, Antalya, Kocaeli ve Muğla illerdeki çeşitli pazarlardan ve üreticilerden satın alınan 63 farklı fermente zeytin örneği izolasyon materyali olarak kullanılmıştır.
- KAA (Kanamisin Eskulin Azide Agar)MRS (de MAN, ROGOSA and SHARPE), ve M-17 Agara yapılan ekimler sonucunda, siyah ve yeşil zeytin örneklerinden toplam 119 adet muhtemel LAB izolatu (*Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. ve *Lactobacillus* spp.) izole edilmiş ve 101 izolat LAB olarak doğrulanmıştır. Buna göre, 30 izolat *Enterococcus* spp., 46 izolat *Lactococcus* spp., ve 25 izolat *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanmıştır.
- KAA Agar'dan izole edilen suşlara 'BA', MRS Agar'dan izole edilen suşlara 'BR' ve M-17 Agar'dan izole edilen suşlara ise 'BM' kodu verilmiştir.
- Laktik asit bakterisi olarak belirlenen 101 izolatu öncelikli olarak, biyojen amin üreticisi olup olmadığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda, çalışmada LAB'ın dekarboksilaz enzim aktiviteleri triptofan, histidin, lizin, kadaverin ve tirozin aminoasitlerinden birini içeren modifiye dekarboksilaz besiyerinde test edilmiştir. Triptamin için triptofan, histamin için histidin, kadaverin için lizin, tiramin için tirozin ve putresin için ornitin öncül aminoasit olarak kullanılmıştır. Renk değişiminin esas alındığı aminoasit dekarboksilaz aktivitesi testinde, rengin sarıdan mora dönmesi biyojen amin oluşumu bakımından pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.
- Bu kapsamda, LAB izolatlarında en çok tespit edilen biyojen aminin 66 üretici suş ile tiramin olduğu belirlenmiştir. Tiramini sırasıyla, 49 üretici suş ile putresin; 46 üretici suş ile kadaverin; 41 üretici suşla triptamin ve 7 üretici suşla histamin takip etmiştir. Bu, suşların içerisinden dekarboksilaz broth ortamında parlak mor renk oluşturanlar güçlü üretici olarak tanımlanmıştır.

- Tiramin üreticisi suşların %34,84'ü; putresin üreticilerinin %53,06'sı; kadaverin üreticilerinin %54,34'ü; triptamin üreticilerin %41,46'sı ve histamin üreticilerinin %42,85'i güçlü üretici olarak belirlenmiştir. Buna karşın, 28 adet LAB suşunun hedef biyojen aminlerin hiçbirini sentezlemediği tespit edilmiştir.
- Dekarboksilaz broth ortamında üretici olarak belirlenen LAB suşlarının biyojen amin konsantrasyonları HPLC-DAD cihazı yardımıyla belirlenmiştir. Siyah zeytin örneklerinde tiramin içeriği 0,468-207,618 mg/L; kadaverin içeriği 0,815-3,849 mg/L; putresin içeriği 0,568-148,718 mg/L ve triptamin içeriği 0,374-22,785 mg/L arasında değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, siyah zeytinden izole edilen suşlarının hiçbirinde histamin üretimi saptanmamıştır. Bununla birlikte, yeşil zeytinden izole edilen suşların 0,448-257,939 mg/L arasında tiramin; 0,549-13,923 mg/L arasında kadaverin; 0,400-139,620 mg/L arasında putresin; 0,462-25,183 mg/L arasında triptamin ürettiği saptanmıştır. Buna karşın, siyah zeytin aksine yeşil zeytinden izole edilen sadece bir suшта histamin konsantrasyonu belirlenmiştir. Üretilen maksimum histamin konsantrasyonu 0,873 mg/L'dir.
- Tez çalışmasında belirlenen hedef biyojen amin konsantrasyonları karşılaştırıldığında, en yüksek tiramin üretici suş 257,939 mg/L ile 61BR kodlu izolattır. Bununla birlikte, 59BR suşu 13,923 mg/L ile en yüksek kadaverin üreticisi suş olurken; 39BA kodlu suş ise 148,718 mg/L ile en yüksek putresin konsantrasyonuna sahiptir. Buna karşın, kantitatif olarak triptamin konsantrasyonları diğer hedef aminlere göre oldukça düşük bulunmuştur. En yüksek triptamin içeriği 25,183 mg/L ile 57BM nolu LAB izolatında gözlemlenmiştir. Öte yandan, tüm hedef biyojen aminleri üreten tek suşun 48 BM kodlu LAB izolatu olduğu tespit edilmiştir.

- Tez çalışmasının son aşamasında, toplam 20 adet LAB suşunun moleküler tanımlaması 16S rDNA dizi analizi uygulanarak tür düzeyinde belirlenmiştir. Elde edilen dizilere göre, fermente zeytin örneklerinde *Enterococcus faecalis* (%70), *Enterococcus lactis* (%15) ve *Enterococcus faecium* (%15) olmak üzere üç tür tanımlanmıştır.

Fermente ürünlerde biyojen amin üzerine literatürde çok sayıda çalışma yer almaktadır. Buna karşın, önemli bir ekonomik kaynağa sahip fermente zeytinde biyojen amin oluşumu üzerine yapılan çalışmalar son derece kısıtlıdır. Sonuç olarak, elde edilen tez çalışmasının verileri incelendiğinde, fermente zeytinlerde biyojen amin oluşum riskinin yüksek olduğu saptanmıştır. Özellikle, tiramin konsantrasyonu yaklaşık 200 mg/Kg ve üzeri olan numuneler, bireysel hassasiyete sahip tüketiciler için sağlıksız olabileceğinden, daha düşük kalitede kabul edilmiştir.

Bu bağlamda, sofralık zeytin üretiminde kaliteli hammadde kullanımı, üretim ve daha sonraki proses aşamalarında hijyen kurallarına uyulması ve depolama koşullarına dikkat edilmesi önem arz etmektedir. Diğer yandan, dünyada fermente gıdalarda biyojen amin oluşumu üzerine yapılan bilimsel çalışmalar, çoğunlukla mikrobiyel kaynaklı olup olmadığının tespit edilmesi ve bu bakterilerin moleküler karakterizasyonu üzerine odaklanmıştır. Ancak, Türkiye’de yürütülen çalışmalarda ise genellikle gıdalardaki biyojen aminin kalitatif ve kantitatif tayini için çeşitli analitik teknikler kullanılmaktadır. Bu nedenle, mevcut tez çalışması ülkemiz adresli çalışmalara yön gösterici nitelik taşımakta ve yapılacak benzer çalışmalara da referans olma özelliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fuentes, M. Á. F., Pérez-Pulido, R. and Gálvez, A. 2012. Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology*, 32(2), 308-316.
- Akan, S. ve Demirağ, M. K. 2018. Gıdalarda biyojen amin oluşum mekanizmalarına etki eden faktörler ve biyojen aminlerin diğer bileşiklere dönüşümleri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 24(7), 1388-1392.
- Akoğlu, A., Yaman, H., Coşkun, H. ve Sarı, K. 2017. Mengen peynirinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(2), 453-459.
- Aktop, S. 2022. Geleneksel peynirlerden biyojen amin üreticisi *enterococcus* suşlarının izolasyonu ve biyojen amin üretme özelliğinin moleküler düzeyde tanımlanması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 144, Ankara.
- Akyol, V., Kundakçı, A. ve Ergönül, B. 2015. Gıdalarda biyojen aminler-Biogenic amines in foods. *Celal Bayar University Journal of Science*, 11(2).
- Alvarez, M. A. and 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 and Technology*, 39(2), 146-155.
- Anagnostopoulos, D. A., Bozoudi, D. and Tsaltas, D. 2018. Enterococci isolated from cypriot green table olives as a new source of technological and probiotic properties. *Fermentation*, 4(2), 48.
- Anlı, R. E., Vural, N., Yılmaz, S. and Vural, Y. H. 2004. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal Of Food Composition and Analysis*, 17(1), 53-62.
- Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F. and Tabanelli, G. 2019. Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. *Foods*, 8(1), 17.
- Bargossi, E., Gardini, F., Gatto, V., Montanari, C., Torriani, S. and Tabanelli, G. 2015. The capability of tyramine production and correlation between phenotypic and genetic characteristics of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1371.
- Bautista-Gallego, J., Medina, E., Sánchez García, B., Benítez-Cabello, A. and Arroyo López, F. N. 2020. Role of lactic acid bacteria in fermented vegetables. *Grasas Aceites*, 71, e358.

- Bevilacqua, A., Altieri, C., Corbo, M. R., Sinigaglia, M. and Ouoba, L. I. I. 2010. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian Bella di Cerignola table olives: selection of potential multifunctional starter cultures. *Journal of Food Science*, 75(8), M536-M544.
- Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Grieco, F., Ramires, F. A., Mita, G. and Logrieco, A. F. 2015. Physico-chemical characterization of natural fermentation process of Conservolea and Kalamàta table olives and development of a protocol for the pre-selection of fermentation starters. *Food Microbiology*, 46, 368-382.
- 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, 2210-2218.
- Bover-Cid S. and Holzapfel W. H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53(1), 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M. C. 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 66(3), 185-189.
- Büyükyörük, S. ve Soyutemiz, G. E. 2010. Geleneksel olarak üretilmiş İzmir Tulum Peynirinden *Lactococcus lactis* (*Lactococcus lactis* alttür *lactis* ve alttür *cremoris*) suşlarının izolasyonu, fenotipik ve moleküler teknikler ile identifikasyonu. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7(2), 81-87.
- Conte, P., Fadda, C., Del Caro, A., Urgeghe, P. P. and Piga, A. 2020. Table olives: An overview on effects of processing on nutritional and sensory quality. *Foods*, 9(4), 514.
- Costa, D. J., Martínez, A. M., Ribeiro, W. F., Bichinho, K. M., Di Nezio, M. S., Pistonesi, M. F. and Araujo, M. C. 2016. Determination of tryptamine in foods using square wave adsorptive stripping voltammetry. *Talanta*, 154, 134-140.
- Costantini, A., Vaudano, E., Pulcini, L., Carafa, T. and Garcia-Moruno, E. 2019. An overview on biogenic amines in wine. *Beverages*, 5(1), 19.
- Del Rio, B., Redruello, B., Fernandez, M., Martin, M. C., Ladero, V. and Alvarez, M. A. 2020. The biogenic amine tryptamine, unlike β -phenylethylamine, shows in vitro cytotoxicity at concentrations that have been found in foods. *Food Chemistry*, 331, 127303.
- Ding, T. and Li, Y. 2024. Biogenic amines are important indices for characterizing the freshness and hygienic quality of aquatic products: A review. *LWT*, 115793.

- Doulgeraki, A. I., Pramateftaki, P., Argyri, A. A., Nychas, G. J. E., Tassou, C. C. and Panagou, E. Z. 2013. Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 353-356.
- 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. ve Fidan, A. F. 2016. Biyojen aminler ve etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*, 9(2), 114-121.
- Eerola S., Hinkkanen R., Lindfors E. and Hirvi T. 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International*, 76(3), 575-577.
- El Issaoui, K., Zinebi, S., Abrini, J., Zahli, R., Amajoud, N., Skali-Senhaji, N. and Khay, E. O. 2017. Characterization of antibacterial lactic acid bacteria isolated from moroccan fermented olives. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 14(4), 1315–1329.
- El Issaoui, K., Khay, E. O., Abrini, J., Zinebi, S., Amajoud, N., Senhaji, N. S. and Abriouel, H. 2021. Molecular identification and antibiotic resistance of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from table olives. *Archives of Microbiology*, 203, 597-607.
- Emer, C. D., Marques, S., Colla, L. M. and Reinehr, C. O. 2021. Biogenic amines and the importance of starter cultures for malolactic fermentation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 27(1), 26-33.
- Erdag, D., Merhan, O. and Yildiz, B. 2018. Biochemical and pharmacological properties of biogenic amines. *Biogenic Amines*, 8, 1-14.
- Ertürkmen, P. ve Zübeyde, Ö. 2015. Beyaz peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin başlatıcı (starter) kültür özelliklerinin biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 19(3), 9-16.
- Fong, F. L. Y., Lam, K. Y., San Lau, C., Ho, K. H., Kan, Y. H., Poon, M. Y. and Sze, E. T. P. 2020. Reduction in biogenic amines in douchi fermented by probiotic bacteria. *PLoS One*, 15(3), e0230916.
- Garai, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A. and Moreno-Arribas, M. V. 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*, 45(5), 473-478.
- Garcia-Garcia, P., Brenes-Balbuena, M., Hornero-Mendez, D., Garcia-Borrego, A. and Garrido-Fernández, A. 2000. Content of biogenic amines in table olives. *Journal of Food Protection*, 63(1), 111-116.

- Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G. and Özogul, F. 2016. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: A review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1218.
- Guo, Y. Y., Yang, Y. P., Peng, Q. and Han, Y. 2015. Biogenic amines in wine: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(7), 1523-1532.
- Hornero-Mendez, D. and Garrido-Fernandez, A. 1997. Rapid high-performance liquid chromatography analysis of biogenic amines in fermented vegetable brines. *Journal of Food Protection*, 60(4), 414-419.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T. and Monfort, J. M. 1993. Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 18(2), 107-113.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A. and Rozès, N. 2012. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology*, 31(1), 1-8.
- Iñigo, R. M. and Abad, F. B. 1983. Fermentación y nivel de histamina en aceitunas verdes. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, (141), 33-41.
- Ishimaru, M., Muto, Y., Nakayama, A., Hatate, H. and Tanaka, R. 2019. Determination of biogenic amines in fish meat and fermented foods using column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Analytical Methods*, 12, 166-175.
- Jiménez, E., Ladero, V., Chico, I., Maldonado-Barragán, A., López, M., Martín, V. and Rodríguez, J. M. 2013. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiology*, 13(1), 1-12.
- Kalhotka, L., Manga, I., Přichystalová, J., Hülová, M., Vyletělová, M. and Šustová, K. 2012. Decarboxylase activity test of the genus *Enterococcus* isolated from goat milk and cheese. *Acta Veterinaria Brno*, 81(2), 145-151.
- Karaalioglu, O., Togay, S. O., Mustafa, A. Y., Soysal, G., Çardak, M., Bağcı, U. ve Tınaztepe, Ö. E. 2019. Çiğ balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* suşlarının gıda güvenliği yönünden bazı özelliklerinin değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 76(3), 341-352.
- Korukluoğlu, M., Gürbüz, O. ve Şahin, İ. 2002. Taze zeytin mikroflorasında bulunan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi. *Journal of Agricultural Sciences*, 8(02), 109-113.
- Ladero, V., Rattray, F. P., Mayo, B., Martín, M. C., Fernández, M. and Alvarez, M. A. 2011. Sequencing and transcriptional analysis of the biosynthesis gene cluster of putrescine-producing *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6409-6418.

- Ladero, V., Fernández, M., Calles-Enríquez, M., Sánchez-Llana, E., Cañedo, E., Martín, M. C. and Alvarez, M. A. 2012. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci?. *Food Microbiology*, 30(1), 132-138.
- Landete, J. M., de Las Rivas, B., Marcobal, A. and Muñoz, R. 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3), 258-269.
- Landeta, G., Curiel, J. A., Carrascosa, A. V., Muñoz, R. and De Las Rivas, B. 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Science*, 95(2), 272-280.
- Lee, Y. C., Kung, H. F., Huang, C. Y., Huang, T. C. and Tsai, Y. H. 2016. Reduction of histamine and biogenic amines during salted fish fermentation by *Bacillus polymyxa* as a starter culture. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(1), 157-163.
- Li, B. and 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, Y., Yan, T., Yin, L., Cheng, Y. and Jia, X. 2022. Isolation and identification of tyramine-producing bacteria and their biogenic amines formation during fermentation of sufu. *Cellular and Molecular Biology*, 68(1), 75-88.
- Linares, D. M., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M. C. and Álvarez, M. A. 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 3, 180.
- Linares, D. M., del Rio, B., Redruello, B., Ladero, V., Martin, M. C., Fernandez, M. and Alvarez, M. A. 2016. Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. *Food Chemistry*, 197, 658-663.
- Liu, Y. He, Y. Li, H. Jia, D. Fu, L. Chen, J. and Wang, Y. 2024. Biogenic amines detection in meat and meat products: the mechanisms, applications, and future trends. *Journal of Future Foods*, 4(1), 21-36.
- Medina-Pradas, E. and Arroyo-López, F. N. 2015. Presence of toxic microbial metabolites in table olives. *Frontiers in Microbiology*, 6, 154906.
- Mete, A. 2011. Şalgamdan izole edilen laktik asit bakterilerinin dekarboksilasyon aktivitelerinin ve biyojen amin üretme yeteneklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 51, Sakarya.
- Mete, A., Coşansu, S., Demirkol, O. and Ayhan, K. 2017. Amino acid decarboxylase activities and biogenic amine formation abilities of lactic acid bacteria isolated from shalgam. *International Journal of Food Properties*, 20(1), 171-178.

- Mietz, J. L. and Karmas, E. 1977. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 42(1), 155-158.
- Mohedano, M. L., López, P., Spano, G. and Russo, P. 2015. Controlling the formation of biogenic amines in fermented foods. In *Advances in fermented foods and beverages*, Woodhead Publishing, 273-310.
- Moracanin, S. V., Stefanovic, S., Radicevic, T., Borovic, B. and Djukic, D. 2015. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria isolated from Uzicka sausages. *Procedia Food Science*, 5, 308-311.
- Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 1-24.
- Nieto-Arribas, P., Poveda, J. M., Seseña, S., Palop, L. and Cabezas, L. 2009. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*, 20(12), 1092-1098.
- Norris, J. R., Berkeley, R.C W., Logan, N. A. and O'donnell, A.G. 1981. The Genus *Bacillus* and *Sporolactobacillus*, In: *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A. and Schlegel, H. G. (eds), New York.
- Ordóñez, J. L., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. D. C. and Callejón, R. M. 2016. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages—A review. *Analytica Chimica Acta*, 939, 10-25.
- Özogul, F. and Hamed, I. 2018. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(10), 1660-1670.
- Panebianco, F. and Caridi, A. 2021. New insights into the antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from different food matrices. *Grasas y Aceites*, 72(1), e400-e400.
- Park, Y. K., Lee, J. H. and Mah, J. H. 2019. Occurrence and reduction of biogenic amines in traditional Asian fermented soybean foods: A review. *Food Chemistry*, 278, 1-9.
- Perin, L. M., Belviso, S., Dal Bello, B., Nero, L. A. and Cocolin, L. 2017. Technological properties and biogenic amines production by bacteriocinogenic lactococci and enterococci strains isolated from raw goat's milk. *Journal of Food Protection*, 80(1), 151-157.
- Perpetuini, G., Prete, R., Garcia-Gonzalez, N., Khairul Alam, M. and Corsetti, A. 2020. Table olives more than a fermented food. *Foods*, 9(2), 178.

- Pessione, E. and Cirrincione, S. 2016. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: Encrypted peptides and biogenic amines. *Frontiers in Microbiology*, 7, 876.
- Pleva, P., Buňková, L., Lauková, A., Lorencová, E., Kubáň, V. and Buňka, F. 2012. Decarboxylation activity of enterococci isolated from rabbit meat and staphylococci isolated from trout intestines. *Veterinary Microbiology*, 159(3-4), 438-442.
- Portilha-Cunha, M. F., Macedo, A. C. and Malcata, F. X. 2020. A review on adventitious lactic acid bacteria from table olives. *Foods*, 9(7), 948.
- Pot, B., Felis, G. E., Bruyne, K. D., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J. and Vandamme, P. 2014. The genus *Lactobacillus*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 249-353.
- Poveda, J. M., Ruiz, P., Sesena, S. and Palop, M. L. 2017. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria during a craft brewing process. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 129-136.
- Rehaiem, A., Fhoula, I., Slim, A. F., Boubaker, I. B. B., Chihi, A. B. and Ouzari, H. I. 2016. Prevalence, acquired antibiotic resistance and bacteriocin production of *Enterococcus* spp. isolated from tunisian fermented food products. *Food Control*, 63, 259-266.
- Sahu, L., Panda, S. K., Paramithiotis, S., Zdolec, N. and Ray, R. C. 2015. Biogenic amines in fermented foods: overview. In: *Fermented Foods—Part I: Biochemistry and Biotechnology*. Montet, D. and Ramesh, C. R. (eds), 318-332.
- Santos, M. S. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3), 213-231.
- Simon Sarkadi, L. 2019. Amino acids and biogenic amines as food quality factors. *Pure and Applied Chemistry*, 91(2), 289-300.
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C. and Lolkema, J. S. 2010. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(3), 95-100.
- Suzzi, G. and Gardini, F. 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 41-54.
- Teepoo, S., Promta, A. and Phapugrangkul, P. 2019. A competitive colorimetric immunosensor for detection of tyramine in fish samples. *Food Analytical Methods*, 12, 1886-1894.
- Temiz, A. 2000. *Gıdalarda İndikatör Mikroorganizmalar*. Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, İzmir.

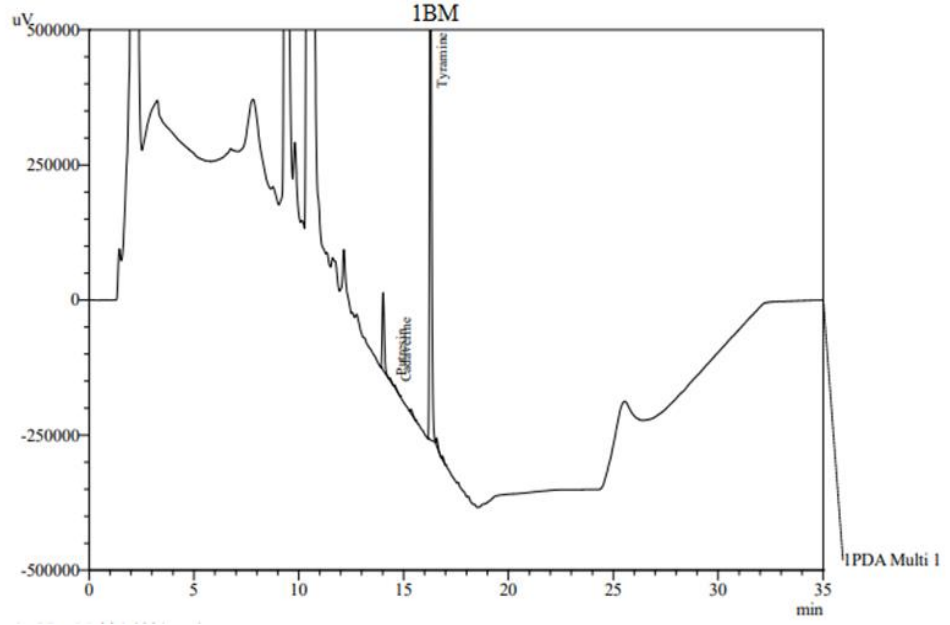
- Tofalo, R., Schirone, M., Perpetuini, G., Angelozzi, G., Suzzi, G. and Corsetti, A. 2012. Microbiological and chemical profiles of naturally fermented table olives and brines from different Italian cultivars. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102, 121-131.
- Toro-Funes, N., Bosch-Fuste, J., Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, M. T. and Vidal-Carou, M. C. 2015. Biologically active amines in fermented and non-fermented commercial soybean products from the Spanish market. *Food Chemistry*, 173, 1119-1124.
- Torriani, S., Gatto, V., Sembeni, S., Tofalo, R., Suzzi, G., Belletti, N. and Bover-Cid, S. 2008. Rapid detection and quantification of tyrosine decarboxylase gene (tdc) and its expression in gram-positive bacteria associated with fermented foods using PCR-based methods. *Journal of Food Protection*, 71(1), 93-101.
- Tufariello, M., Anglana, C., Crupi, P., Virtuosi, I., Fiume, P., Di Terlizzi, B. and Bleve, G. 2019. Efficacy of yeast starters to drive and improve Picual, Manzanilla and Kalamàta table olive fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2504-2512.
- Vasconcelos, H., Coelho, L. C., Matias, A., Saraiva, C., Jorge, P. A. and de Almeida, J. M. 2021. Biosensors for biogenic amines: A review. *Biosensors*, 11(3), 82.
- Vinci, G. and Maddaloni, L. 2020. Biogenic amines in alcohol-free beverages. *Beverages*, 6(1), 17.
- Visciano, P. and Schirone, M. 2022. Update on Biogenic Amines in Fermented and Non-Fermented Beverages. *Foods*, 11(3), 353.
- Yalçinkaya, S. and Kılıç, G. B. 2019. Isolation, identification and determination of technological properties of the halophilic lactic acid bacteria isolated from table olives. *Journal of Food Science and Technology*, 56(4), 2027-2037.
- Yüceer, Ö. 2015. Fermente sucuktan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlilikleri ve biyojen amin üretimlerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 67, Isparta.
- Yüceer, Ö. and Özden Tuncer, B. 2015. Determination of Antibiotic Resistance and Biogenic Amine Production of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Turkish Sausage (Sucuk). *Journal of Food Safety*, 35(2), 276-285.
- Zaman, M. Z., Bakar, F. A., Jinap, S. and Bakar, J. 2011. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 84-91.

Zhang, H., Yin, C., Xu, L., Prinyawiwatkul, W. and Xu, Z. 2019. An improved determination method for tyramine in foods using ultra-high performance liquid chromatography with benzylamine as internal standard. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 2101-2108.

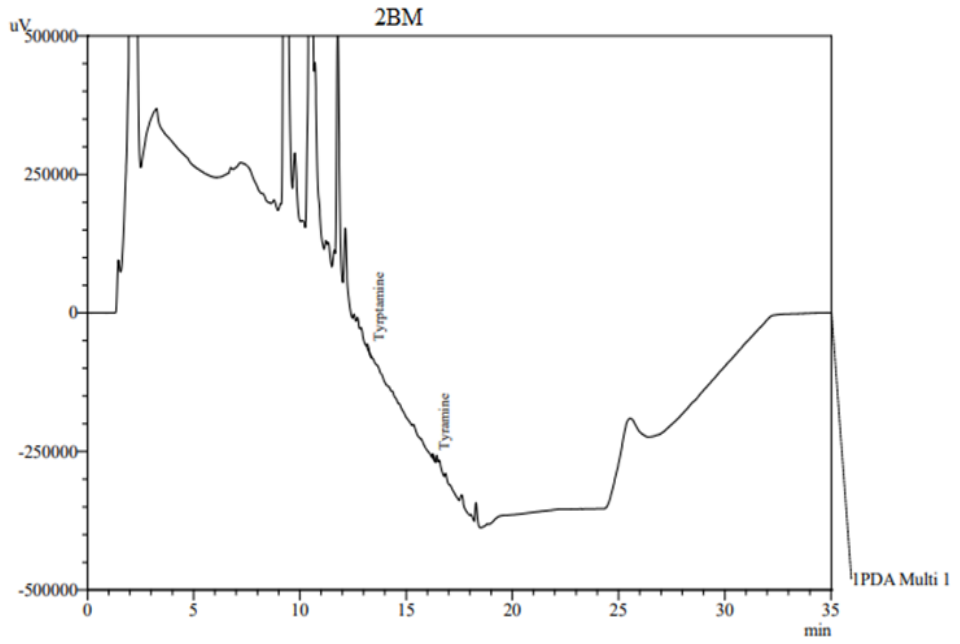
Wunderlichová, L., Buňková, L., Koutný, M., Jančová, P. and Buňka, F. 2014. Formation, degradation, and detoxification of putrescine by foodborne bacteria: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1012-1030.

EKLER

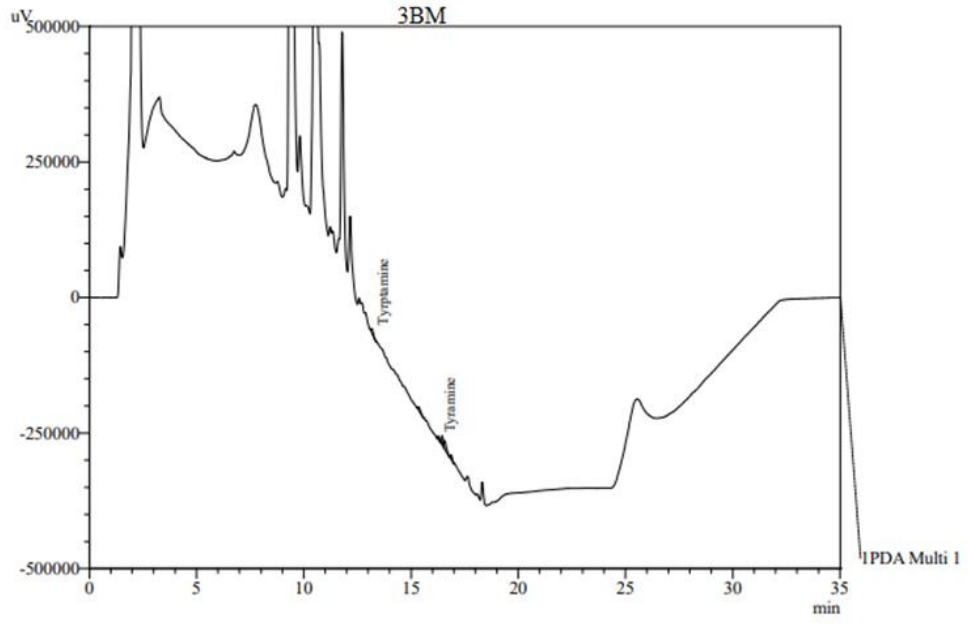
EK 1 Kadaverin, putresin ve tiramin üreten 1BM kodlu suşun kromatogramı



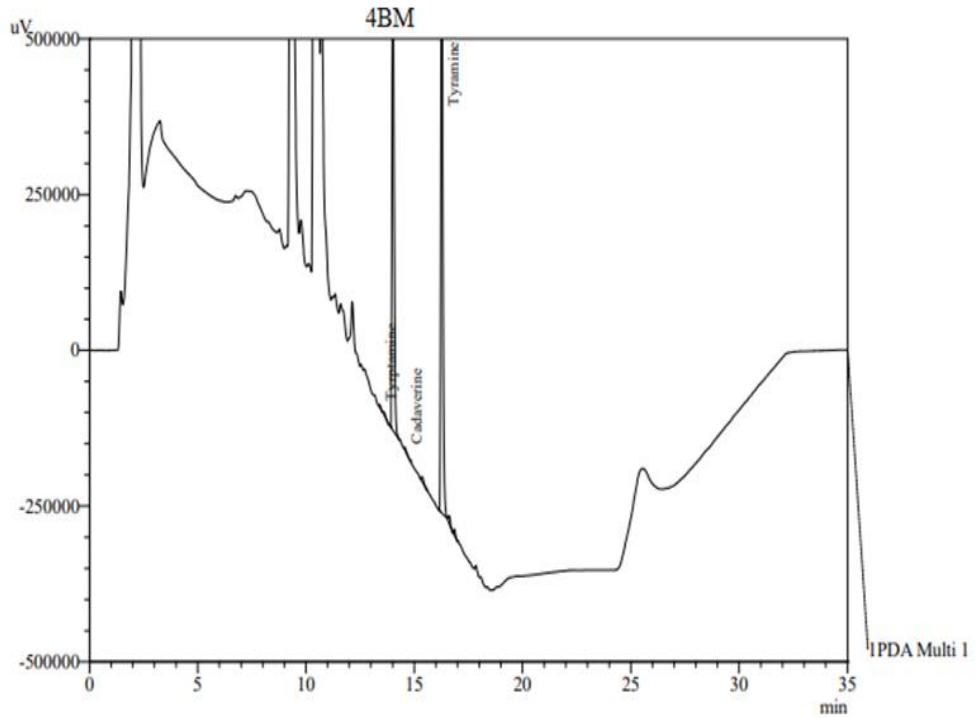
EK 2 Triptamin ve tiramin üreten 2BM kodlu suşun kromatogramı



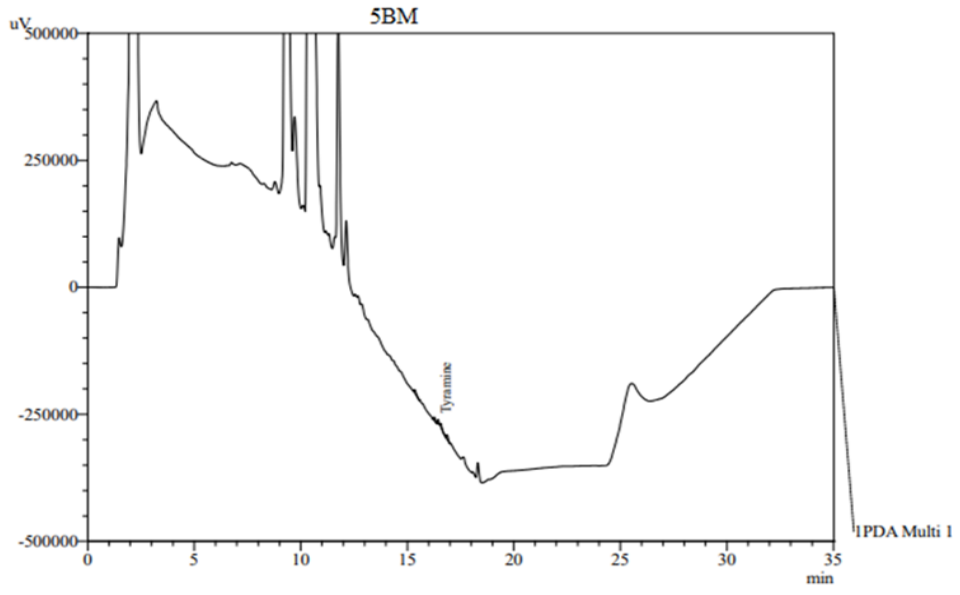
EK 3 Triptamin ve tiramin üreten 3BM kodlu suşun kromatogramı



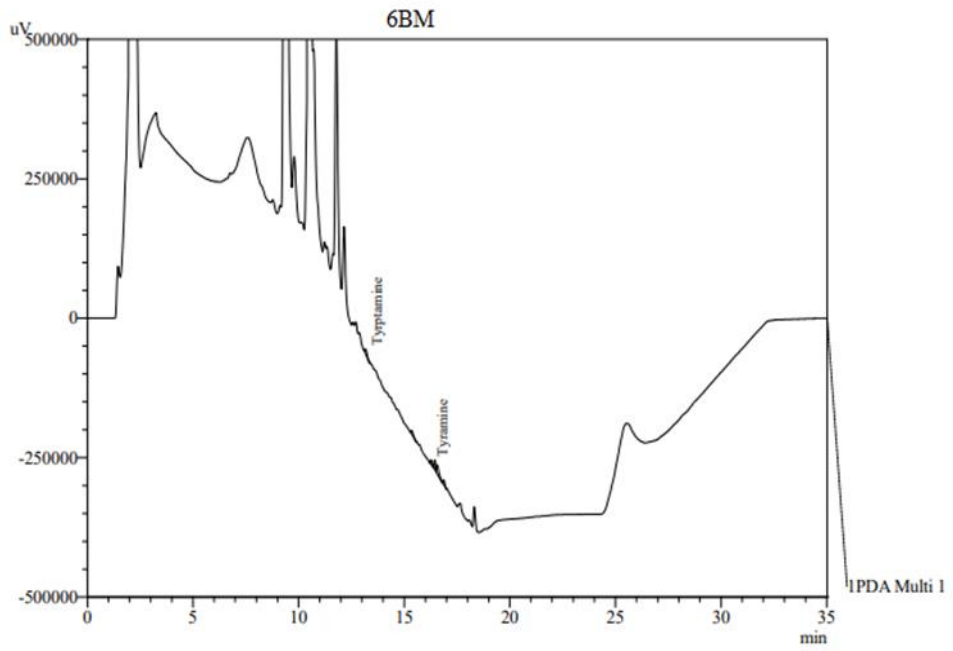
EK 4 Kadaverin, triptamin ve tiramin üreten 4BM kodlu suşun kromatogramı



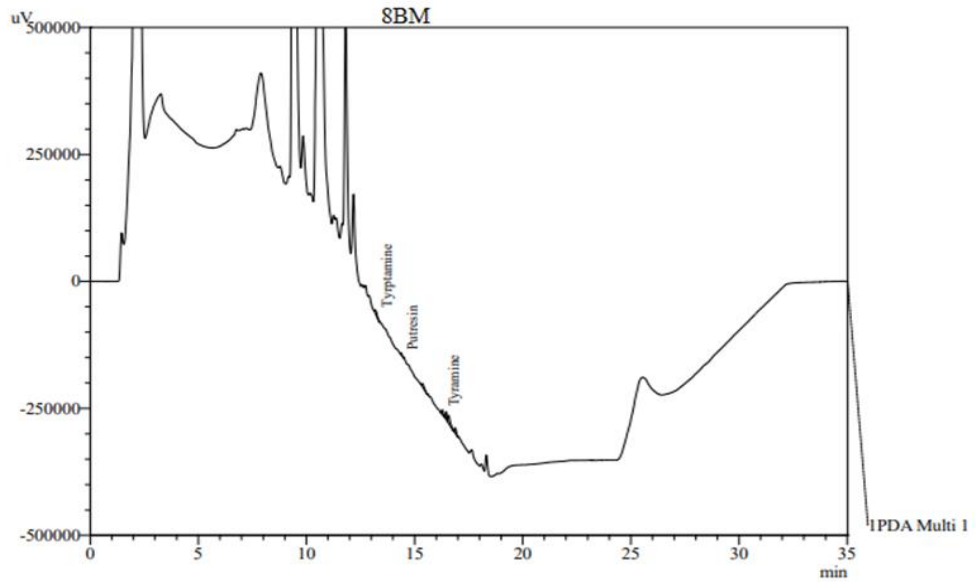
EK 5 Tiramin üreten 5BM kodlu suşun kromatogramı



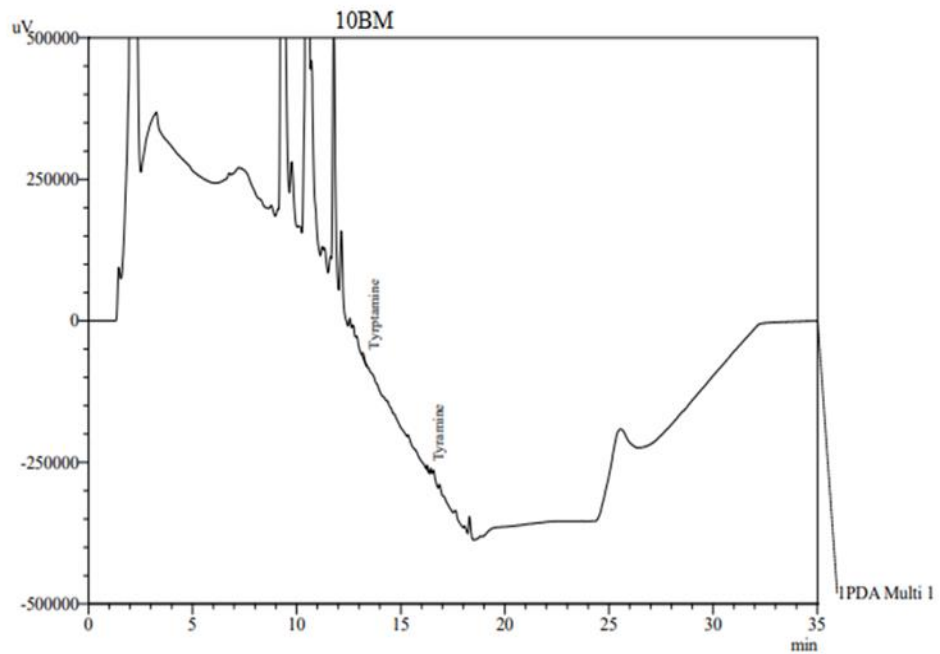
EK 6 Triptamin ve tiramin üreten 6BM kodlu suşun kromatogramı



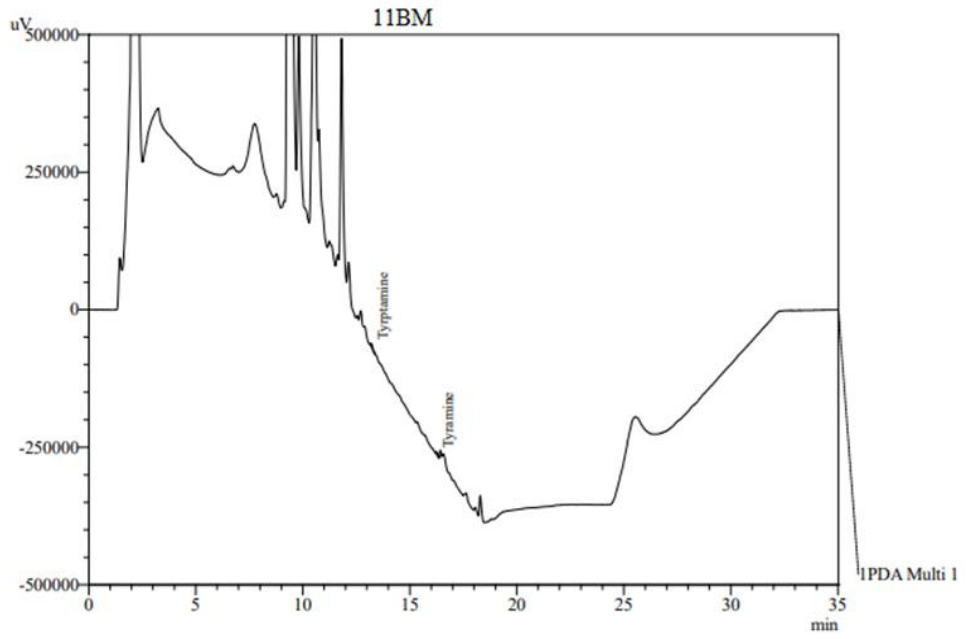
EK 7 Triptamin, putresin ve tiramin üreten 8BM kodlu suşun kromatogramı



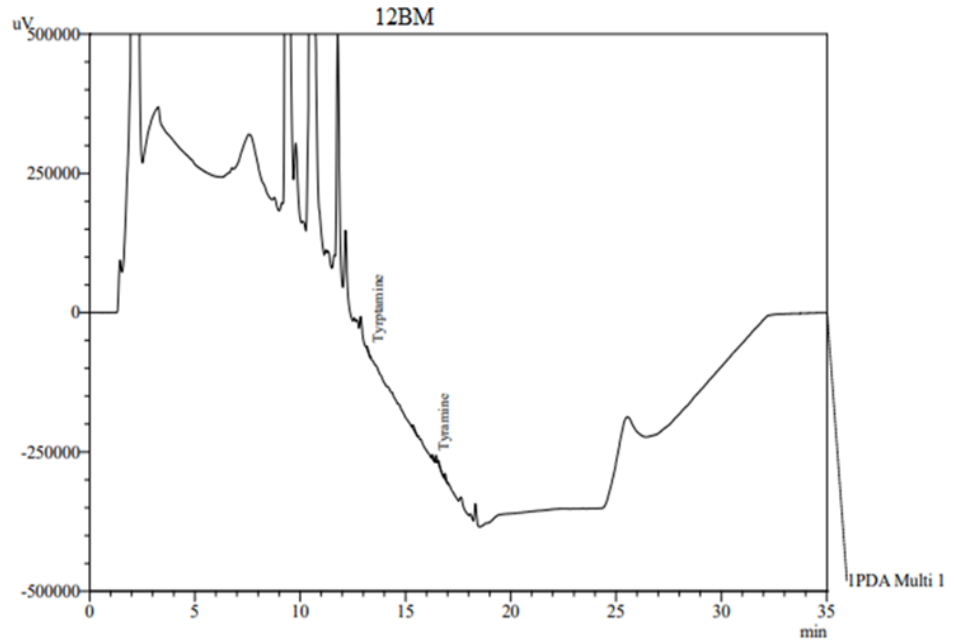
EK 8 Triptamin ve tiramin üreten 10BM kodlu suşun kromatogramı



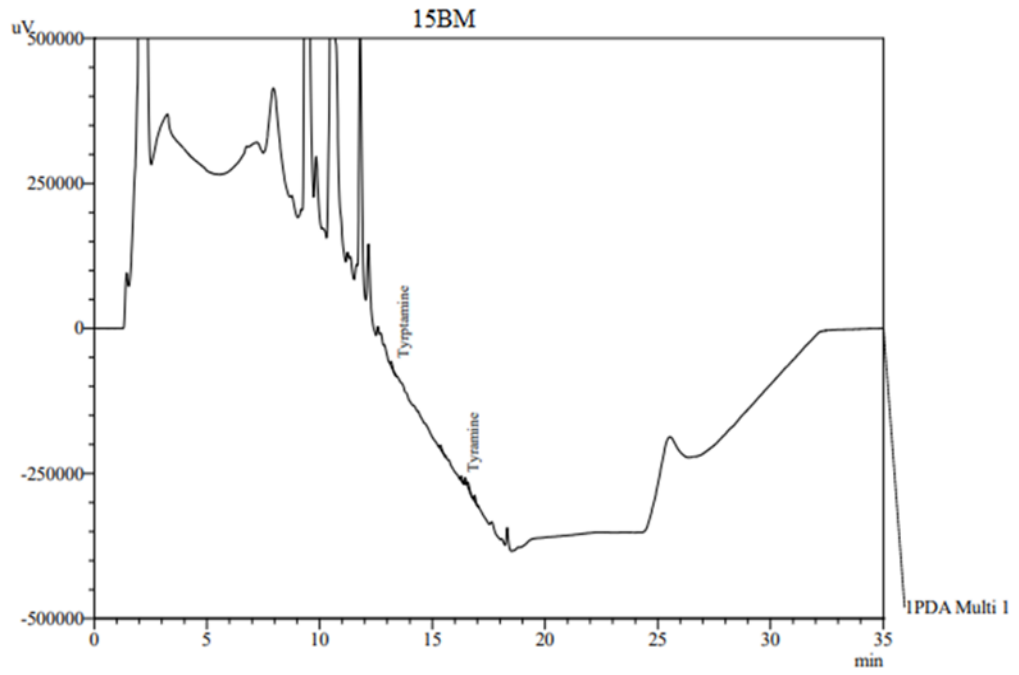
EK 9 Triptamin ve tiramin üreten 11BM kodlu suşun kromatogramı



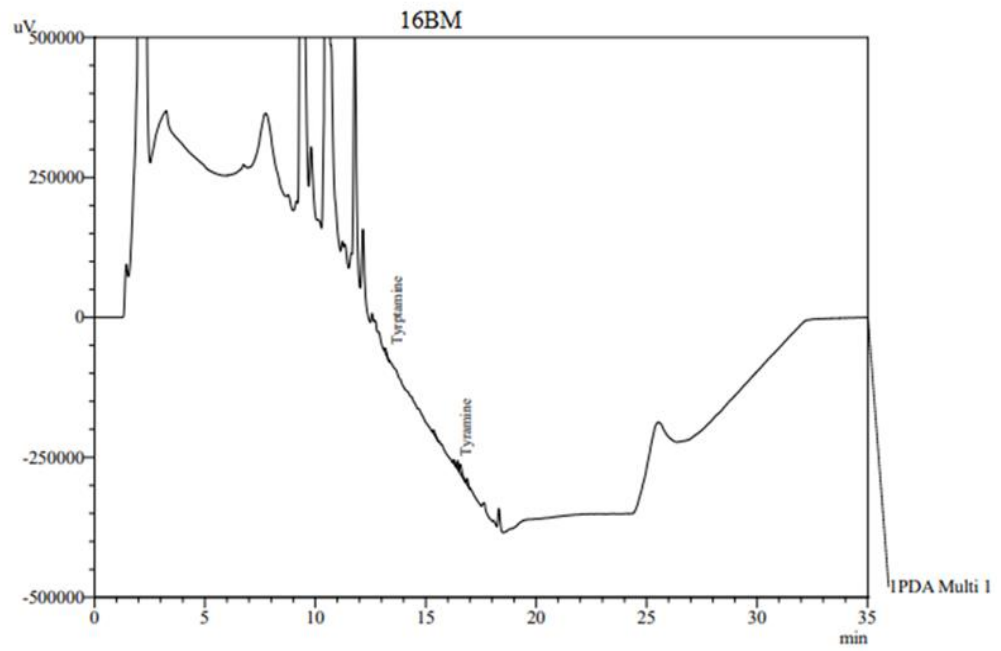
EK 10 Triptamin ve tiramin üreten 12BM kodlu suşun kromatogramı



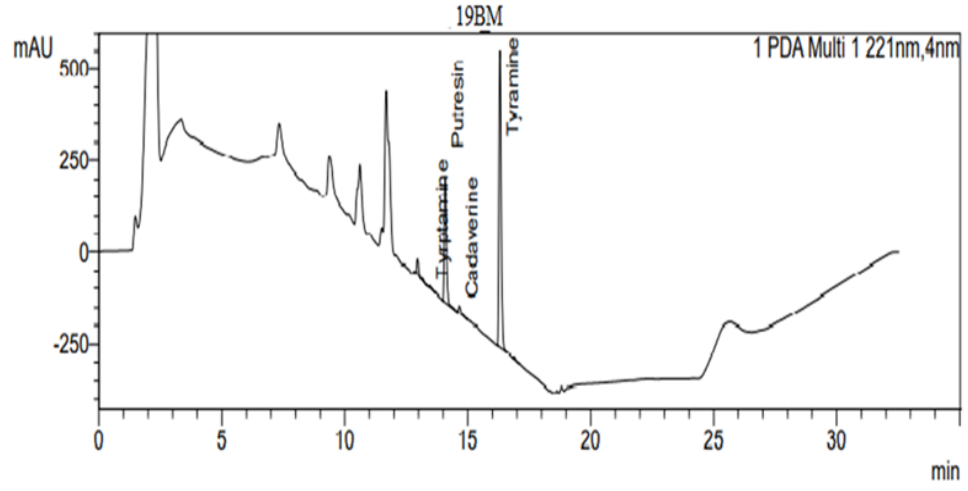
EK 11 Triptamin ve tiramin üreten 15BM kodlu süşun kromatogramı



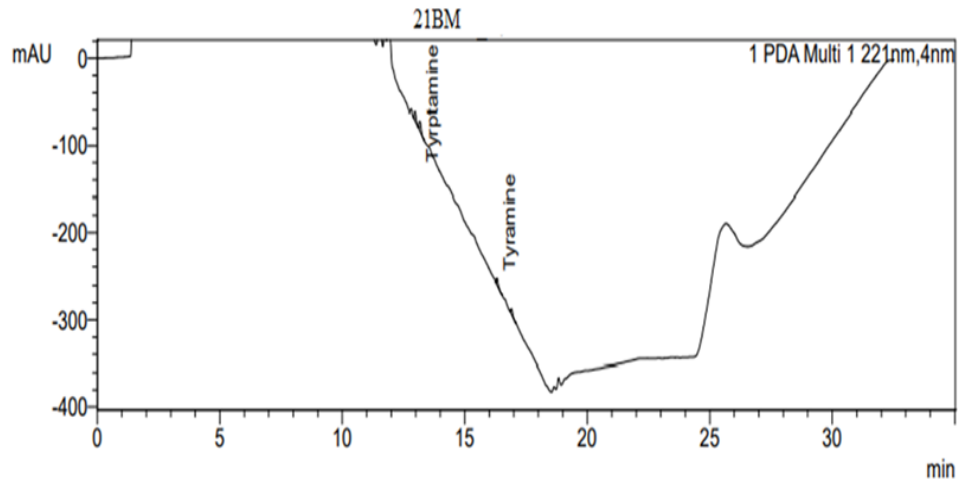
EK 12 Triptamin ve tiramin üreten 16BM kodlu süşun kromatogramı



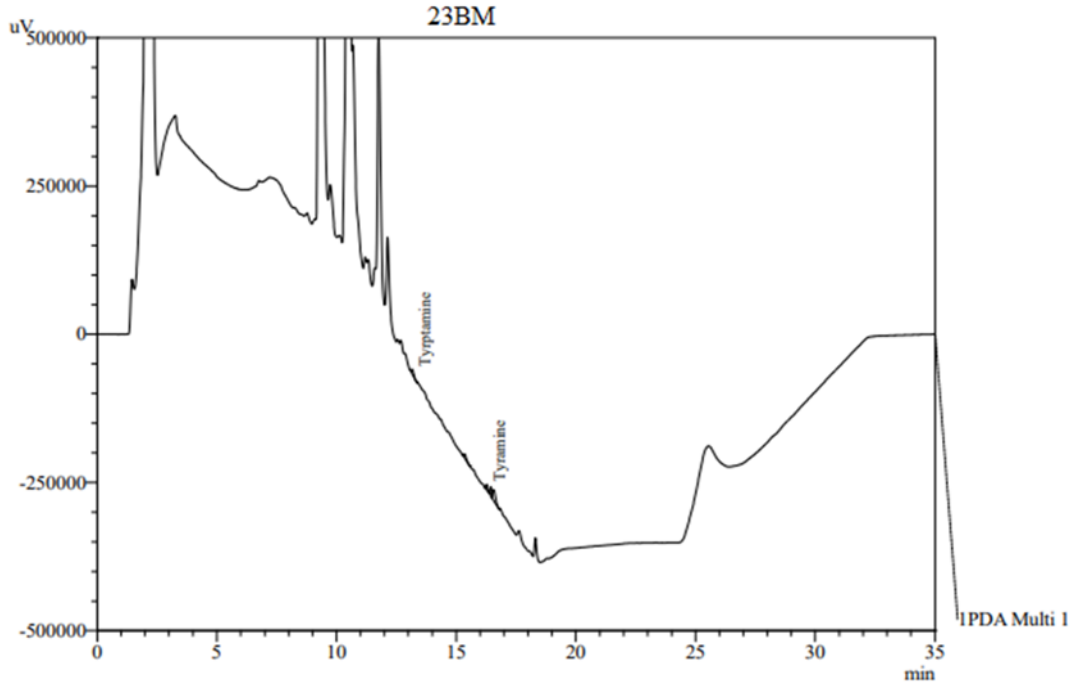
EK 13 Triptamin, putresin, kadaverin ve tiramin üreten 19BM kodlu suşun kromatogramı



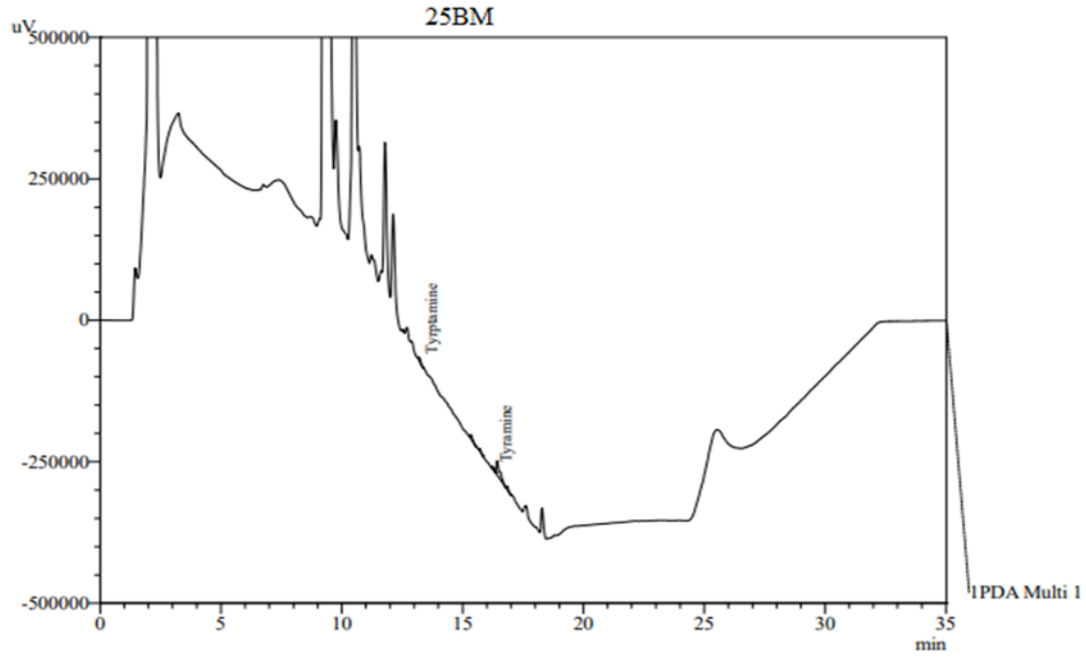
EK 14 Triptamin ve tiramin üreten 21BM kodlu suşun kromatogramı



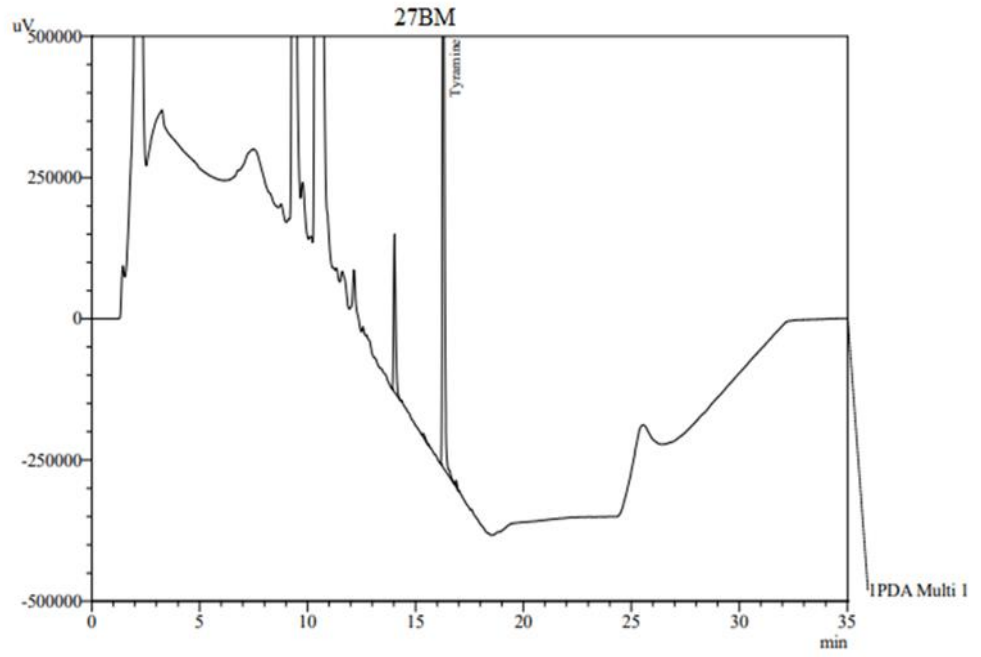
EK 15 Triptamin ve tiramin üreten 23BM kodlu suşun kromatogramı



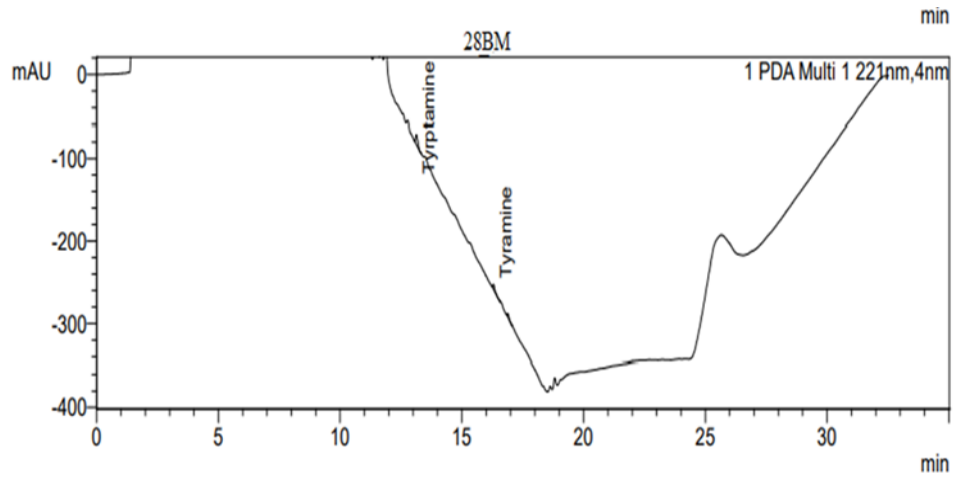
EK 16 Triptamin ve tiramin üreten 25BM kodlu suşun kromatogramı



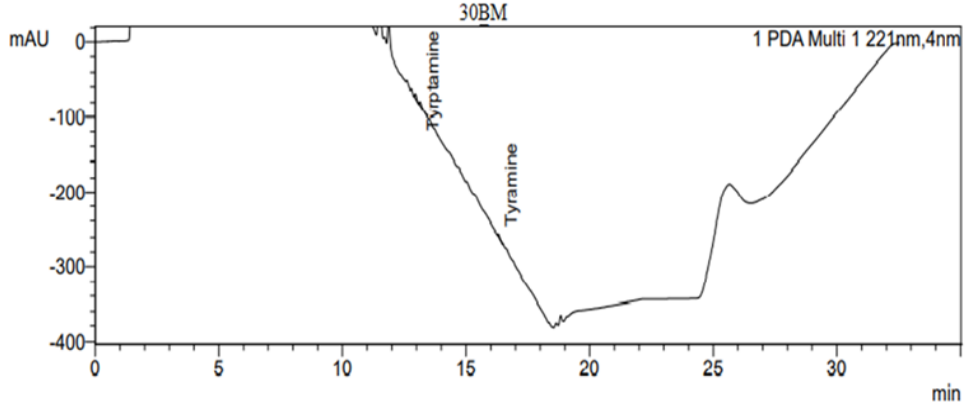
EK 17 Tiramin üreten 27BM kodlu suşun kromatogramı



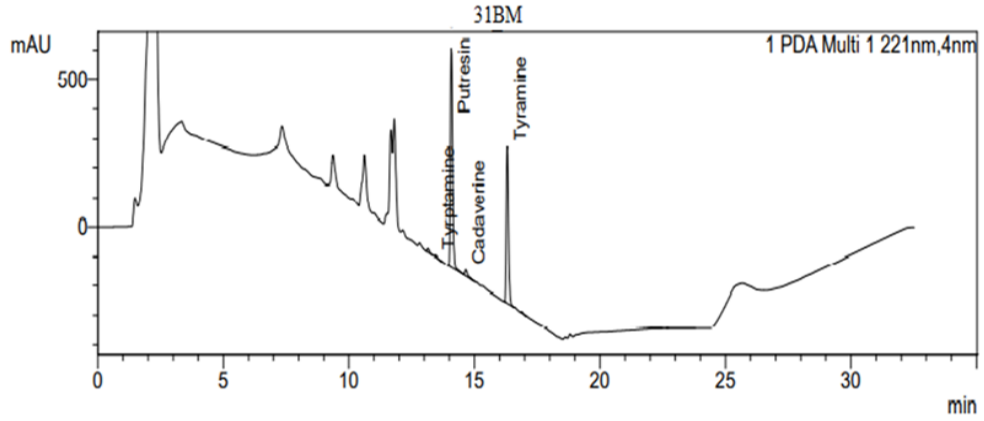
EK 18 Triptamin ve tiramin üreten 28BM kodlu suşun kromatogramı



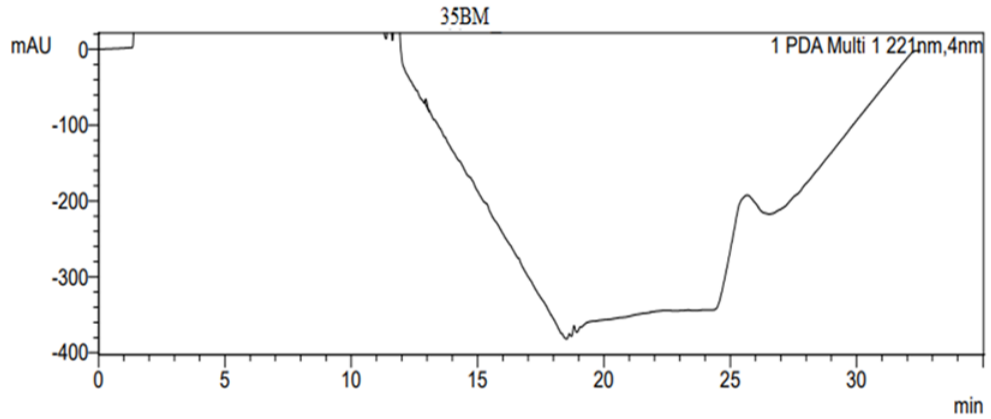
EK 19 Triptamin ve tiramin üreten 30BM kodlu suşun kromatogramı



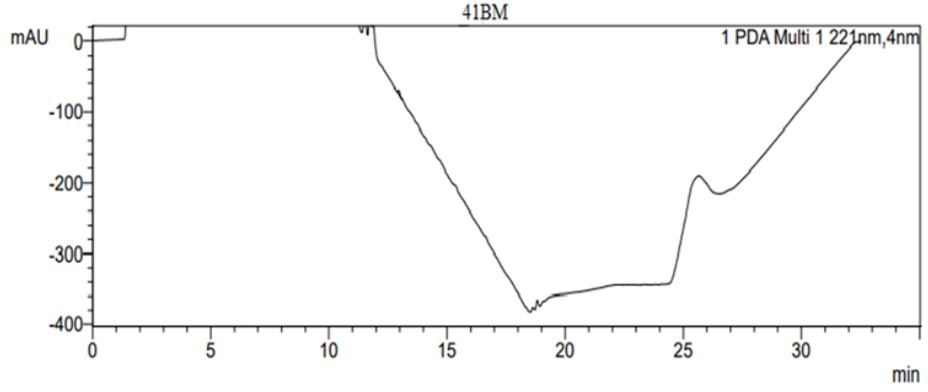
EK 20 Triptamin, putresin, kadaverin ve tiramin üreten 31BM kodlu suşun kromatogramı



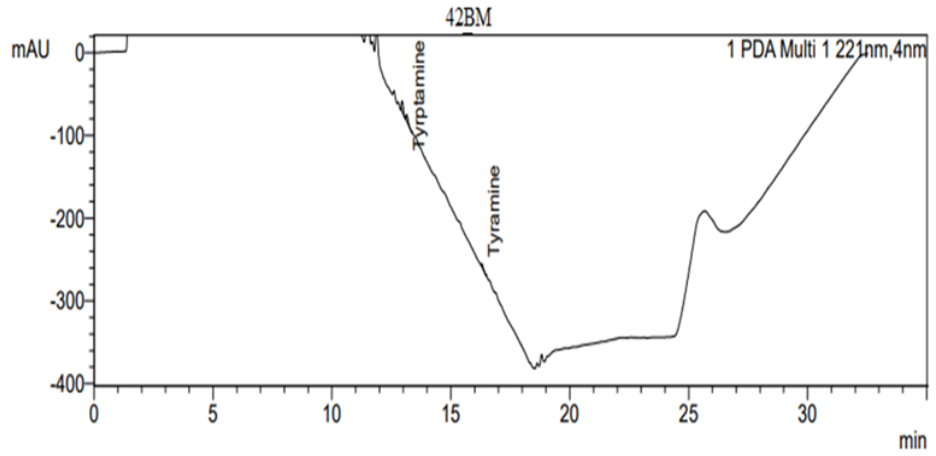
EK 21 35BM kodlu izolatin kromatogramı



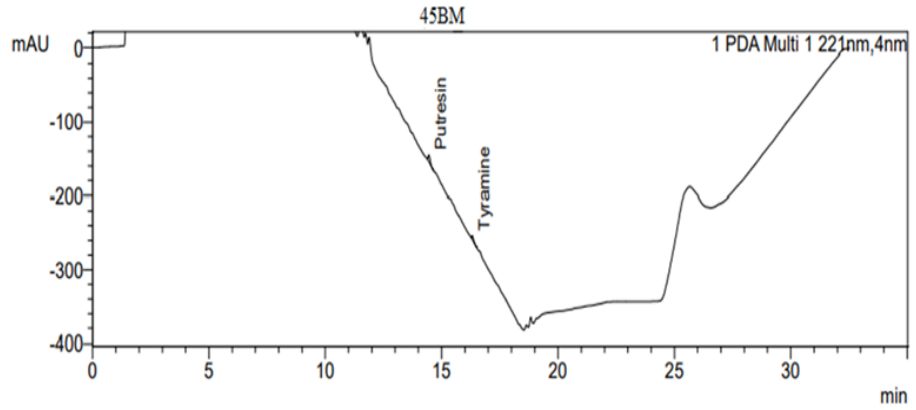
EK 22 41BM kodlu izolatın kromatogramı



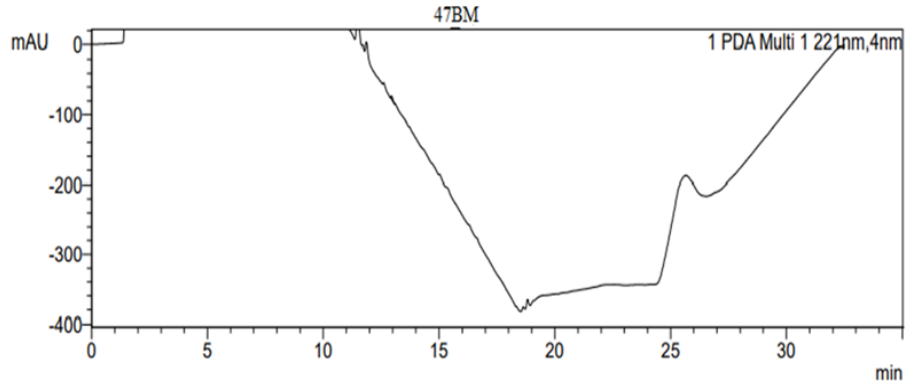
EK 23 Triptamin ve tiramin üreten 42BM kodlu suşun kromatogramı



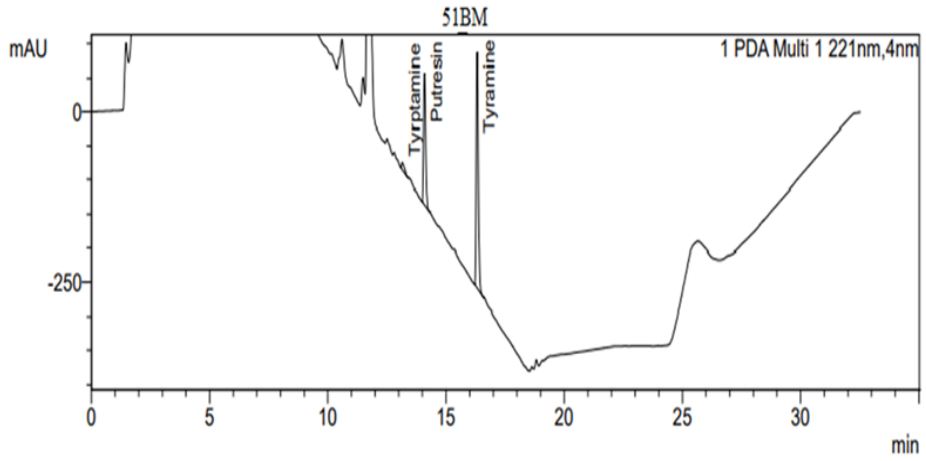
EK 24 Putresin ve tiramin üreten 45BM kodlu suşun kromatogramı



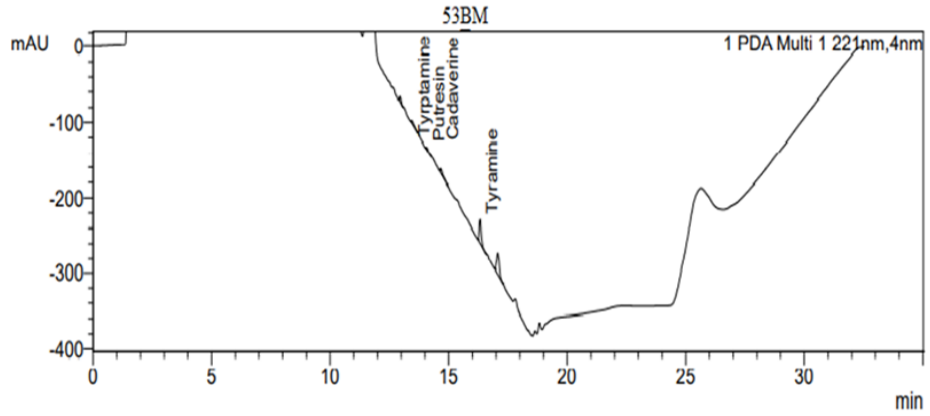
EK 25 47BM kodlu izolatın kromatogramı



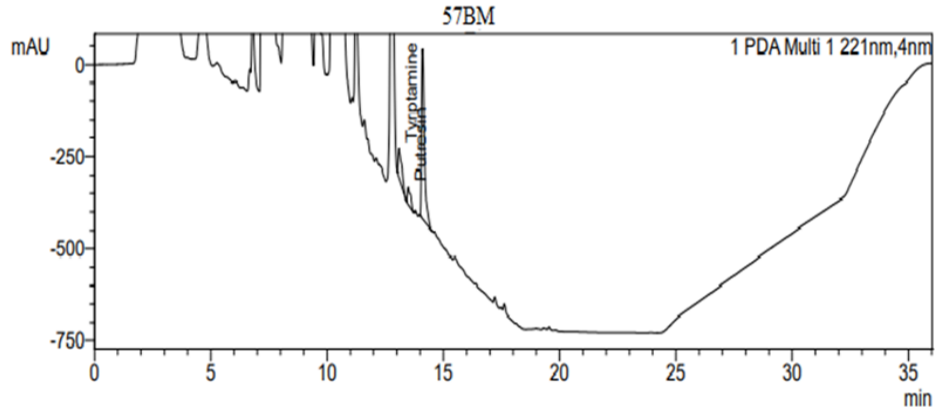
EK 26 Triptamin, putresin ve tiramin üreten 51BM kodlu suşun kromatogramı



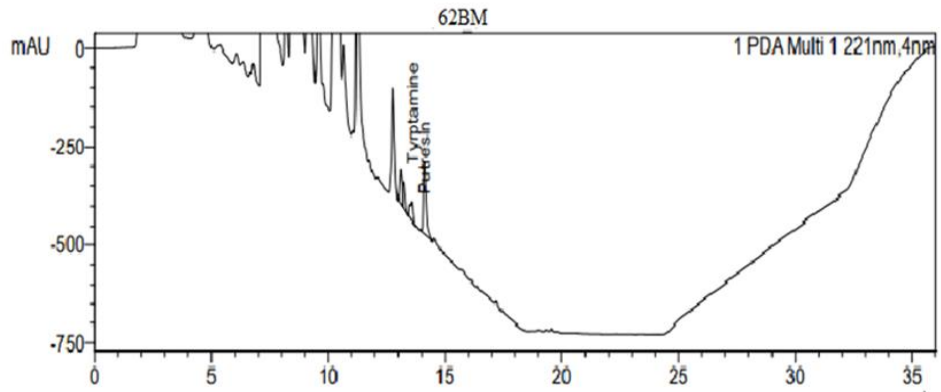
EK 27 Triptamin, putresin, kadaverin ve tiramin üreten 53BM kodlu suşun kromatogramı



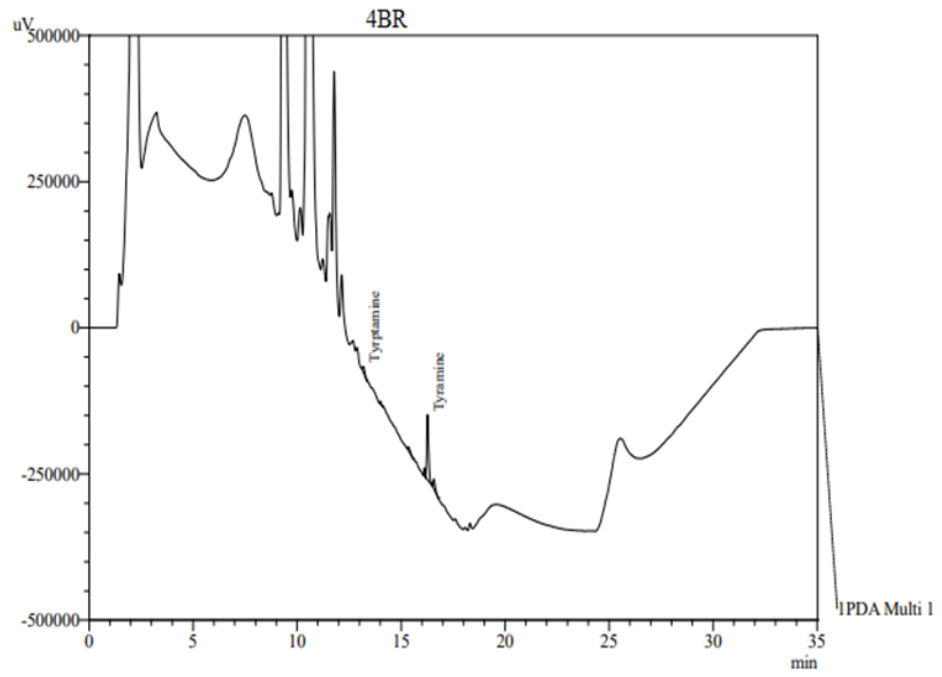
EK 28 Triptamin ve putresin üreten 57BM kodlu suşun kromatogramı



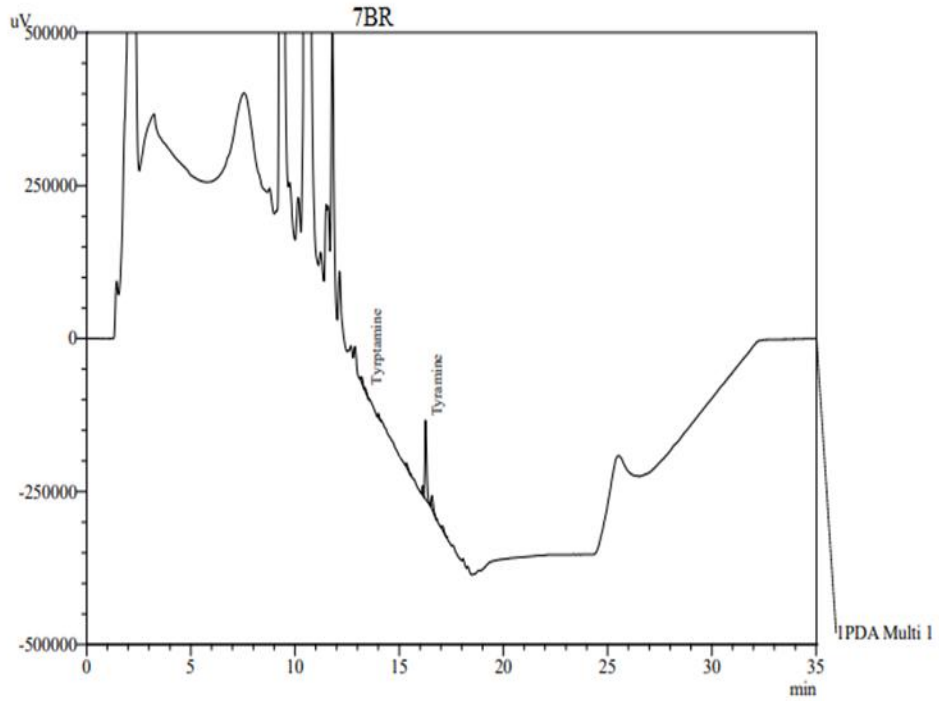
EK 29 Triptamin ve putresin üreten 62BM kodlu suşun kromatogramı



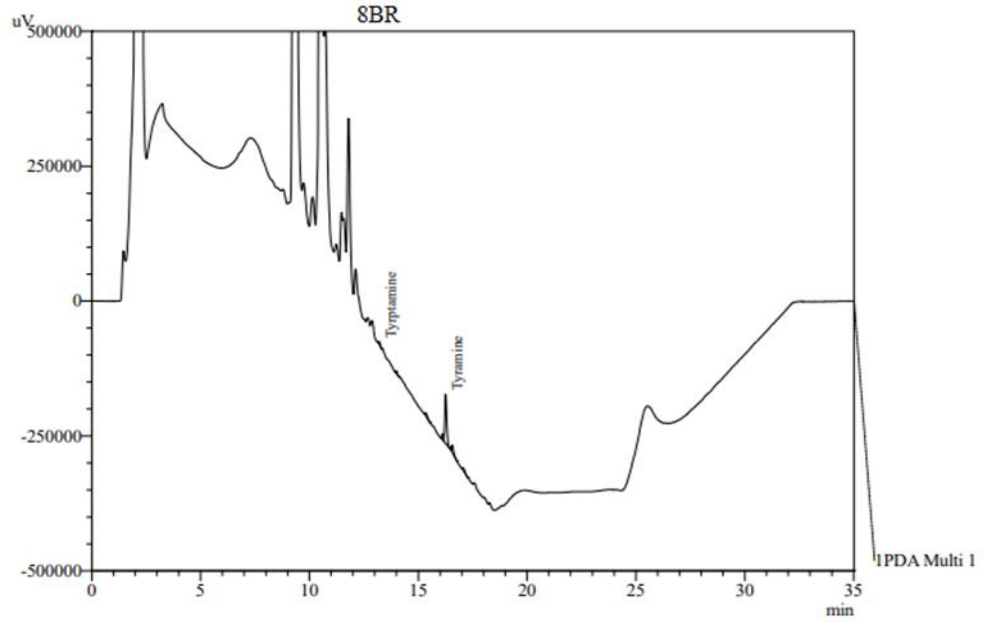
EK 30 Triptamin ve tiramin üreten 4BR kodlu suşun kromatogramı



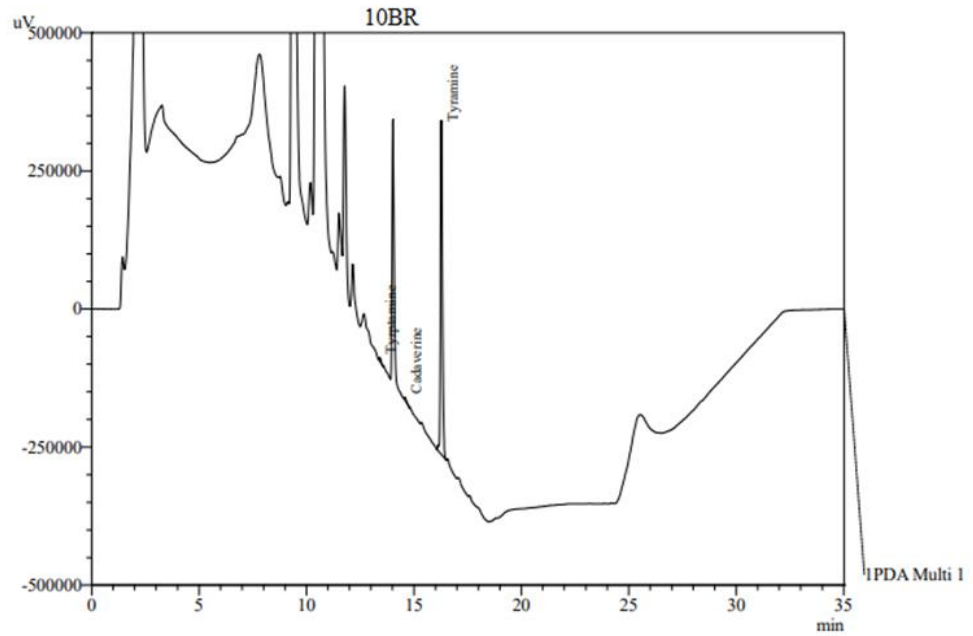
EK 31 Triptamin ve tiramin üreten 7BR kodlu suşun kromatogramı



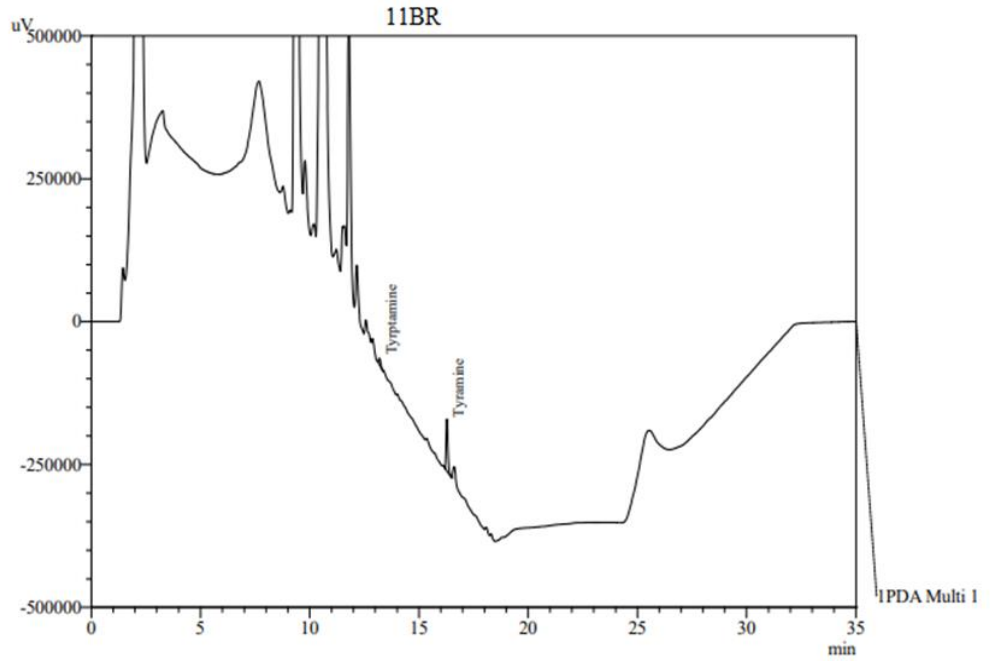
EK 32 Triptamin ve tiramin üreten 8BR kodlu süşun kromatogramı



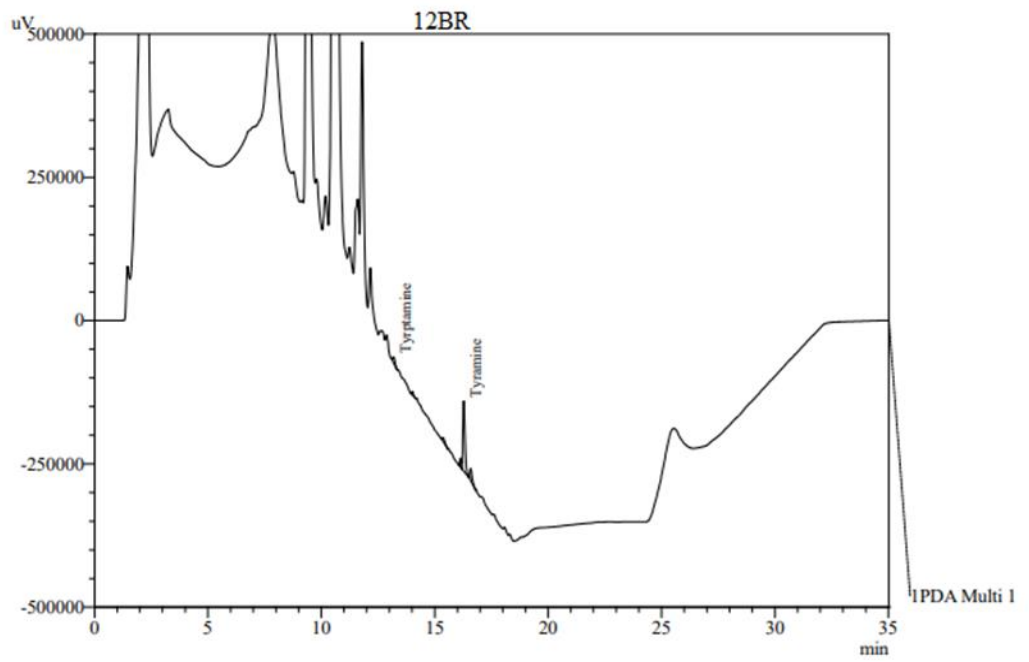
EK 33 Triptamin, kadaverin ve tiramin üreten 10BR kodlu süşun kromatogramı



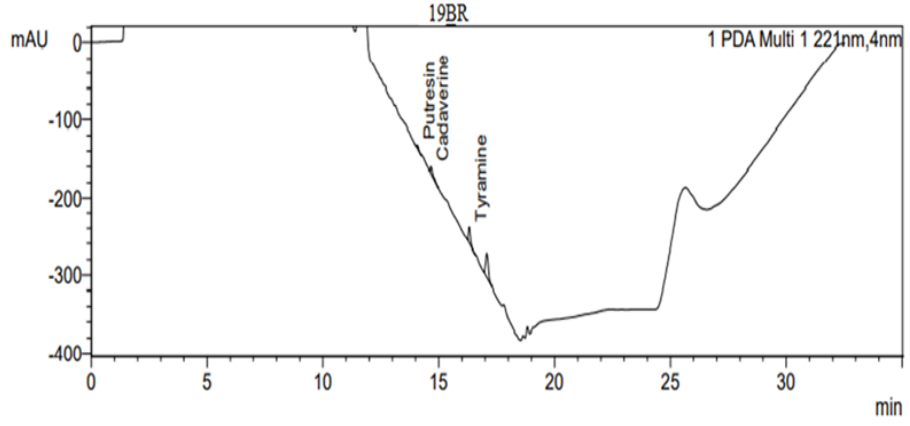
EK 34 Triptamin ve tiramin üreten 11BR kodlu suşun kromatogramı



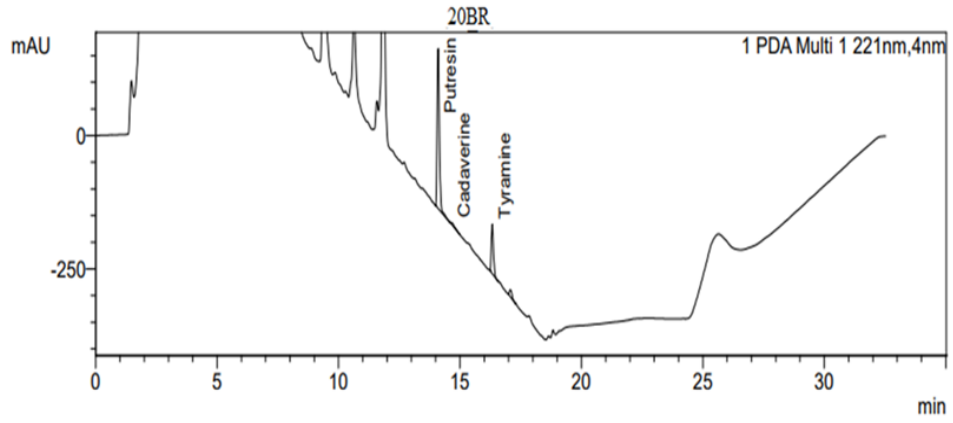
EK 35 Triptamin ve tiramin üreten 12BR kodlu suşun kromatogramı



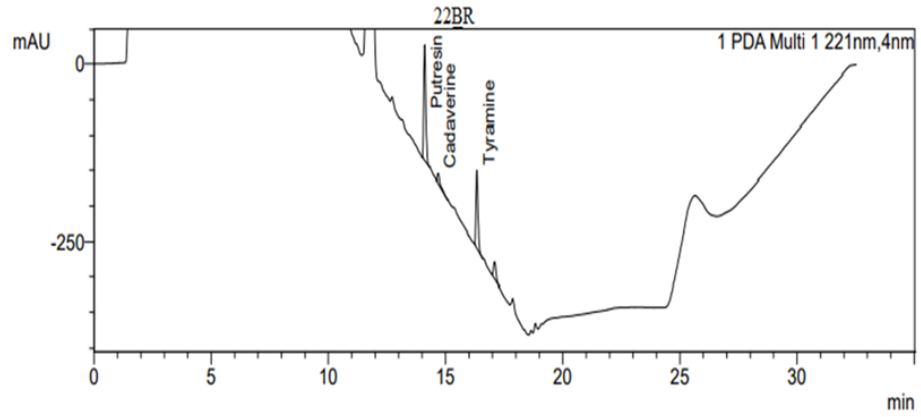
EK 36 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 19BR kodlu suşun kromatogramı



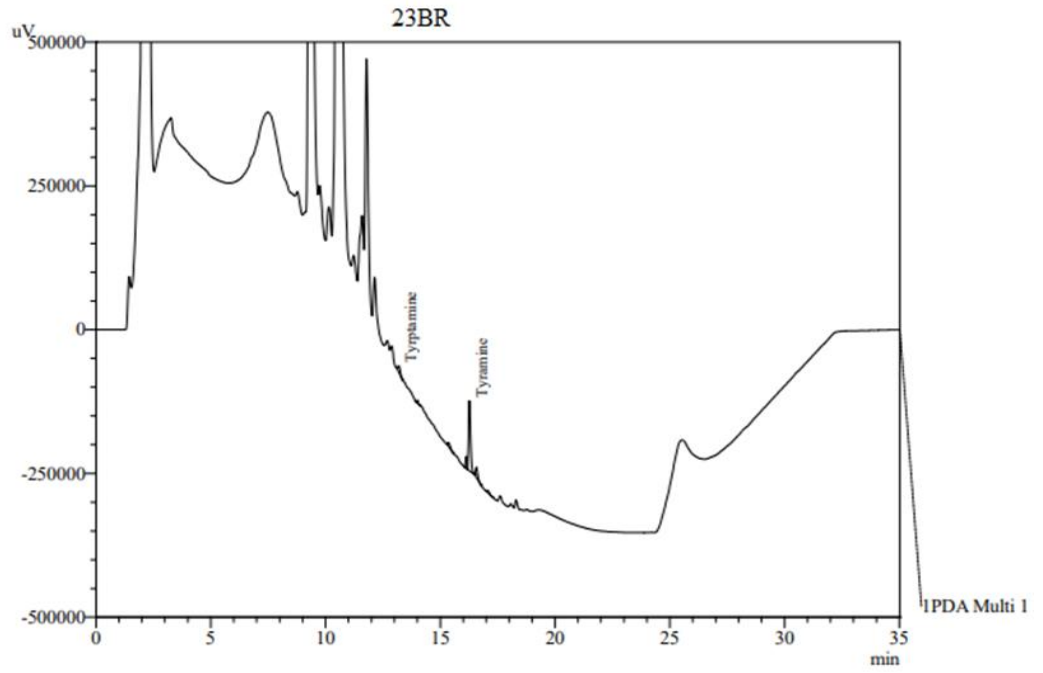
EK 37 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 20BR kodlu suşun kromatogramı



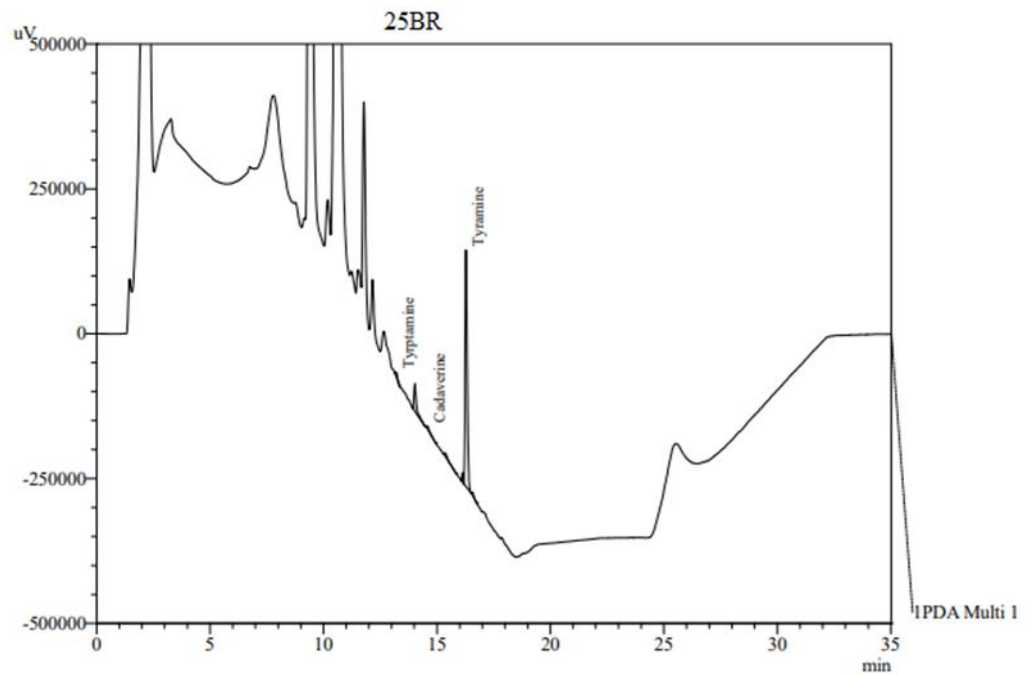
EK 38 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 22BR kodlu suşun kromatogramı



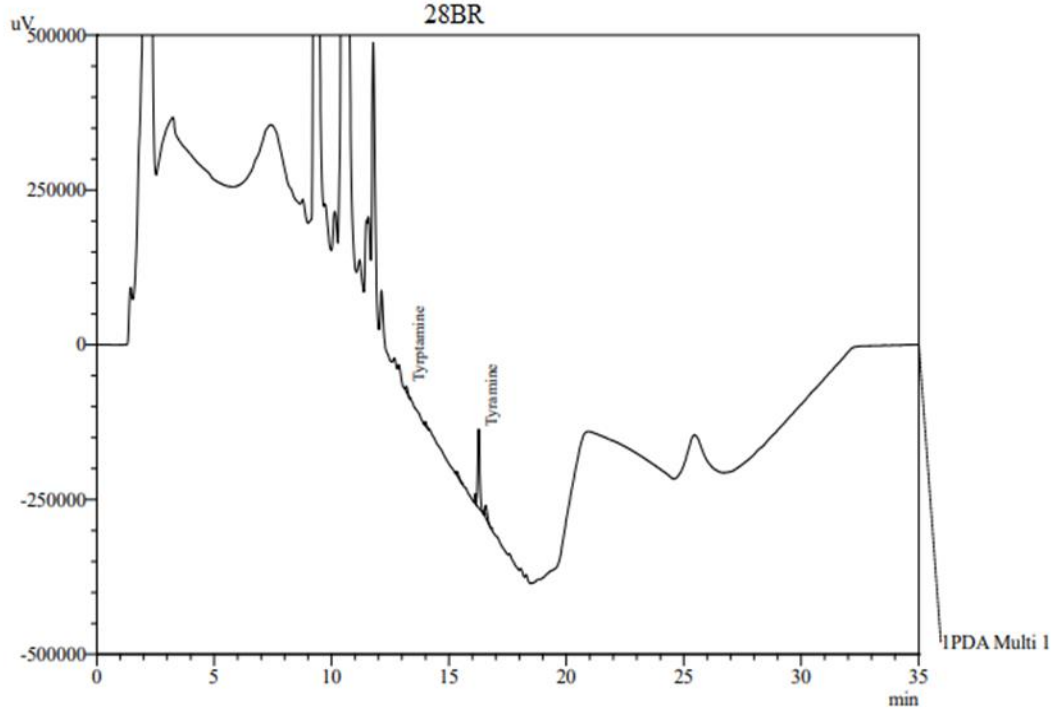
EK 39 Triptamin ve tiramin üreten 23BR kodlu süşun kromatogramı



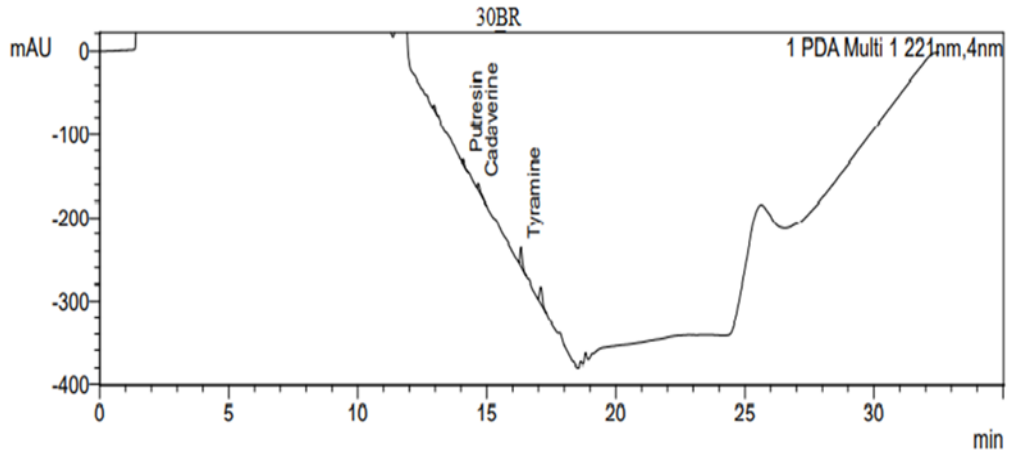
EK 40 Triptamin, kadaverin ve tiramin üreten 25BR kodlu süşun kromatogramı



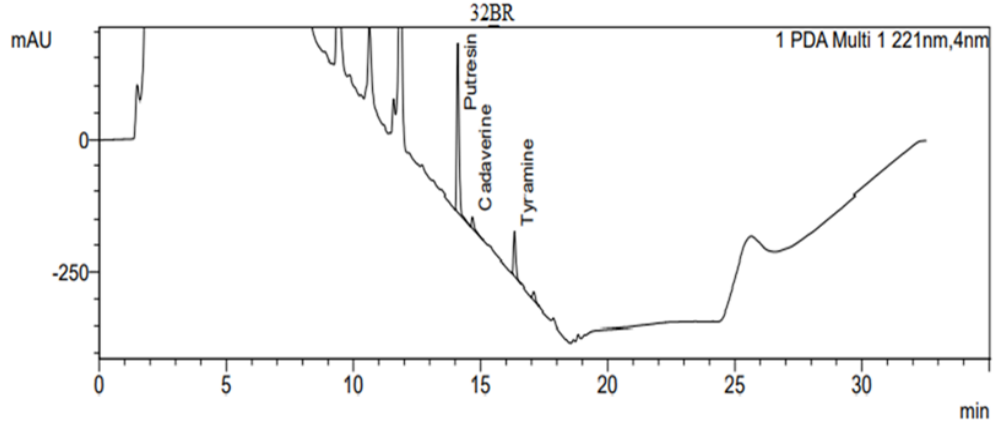
EK 41 Triptamin ve tiramin üreten 28BR kodlu suşun kromatogramı



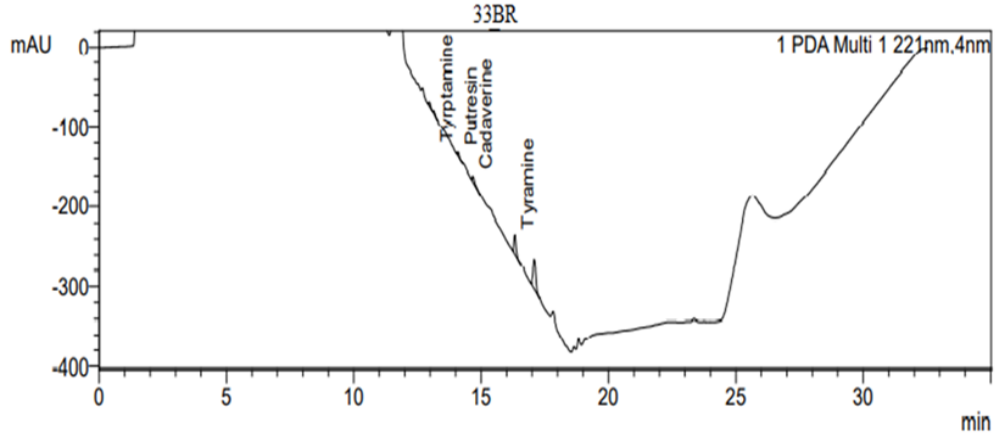
EK 42 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 30BR kodlu suşun kromatogramı



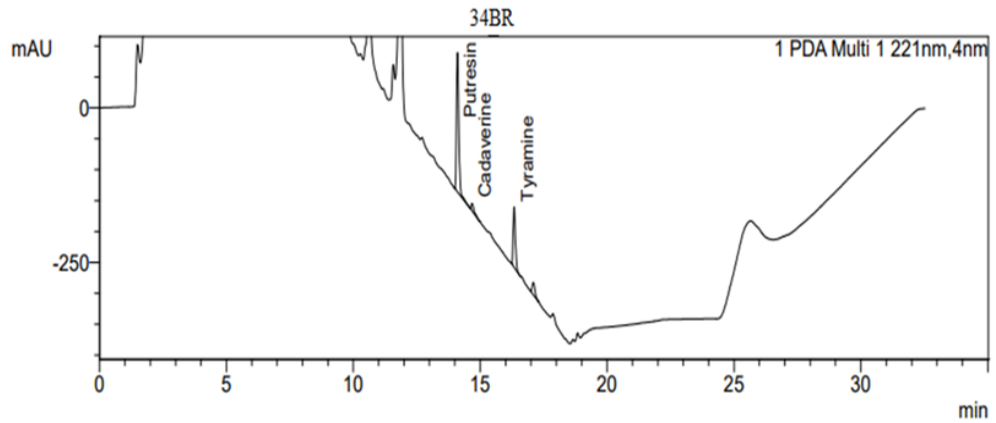
EK 43 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 32BR kodlu suşun kromatogramı



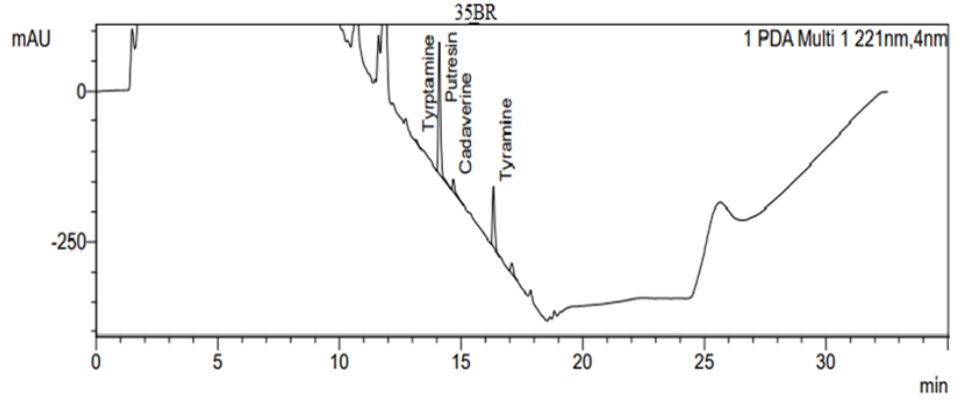
EK 44 Triptamin, putresin, kadaverin ve tiramin üreten 33BR kodlu suşun kromatogramı



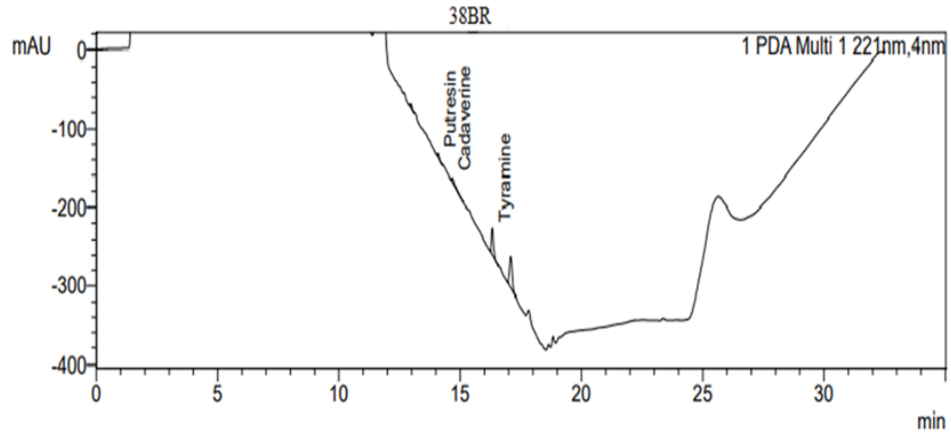
EK 45 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 34BR kodlu suşun kromatogramı



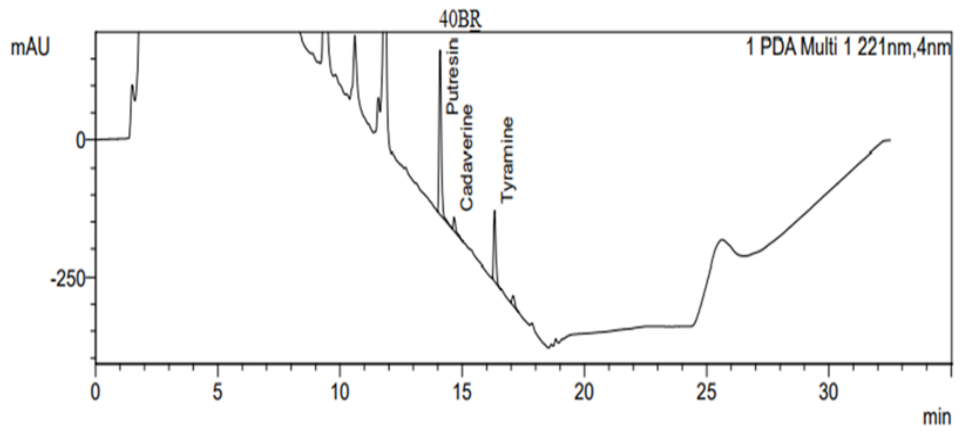
EK 46 Triptamin, putresin, kadaverin ve tiramin üreten 35BR kodlu suşun kromatogramı



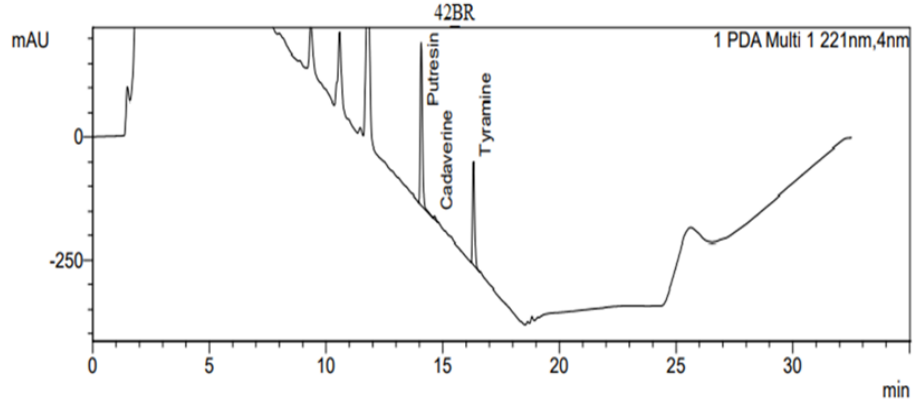
EK 47 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 38BR kodlu suşun kromatogramı



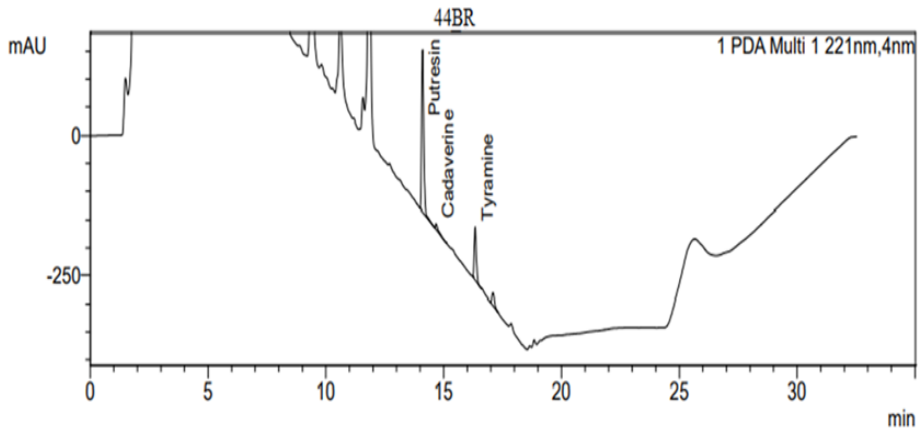
EK 48 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 40BR kodlu suşun kromatogramı



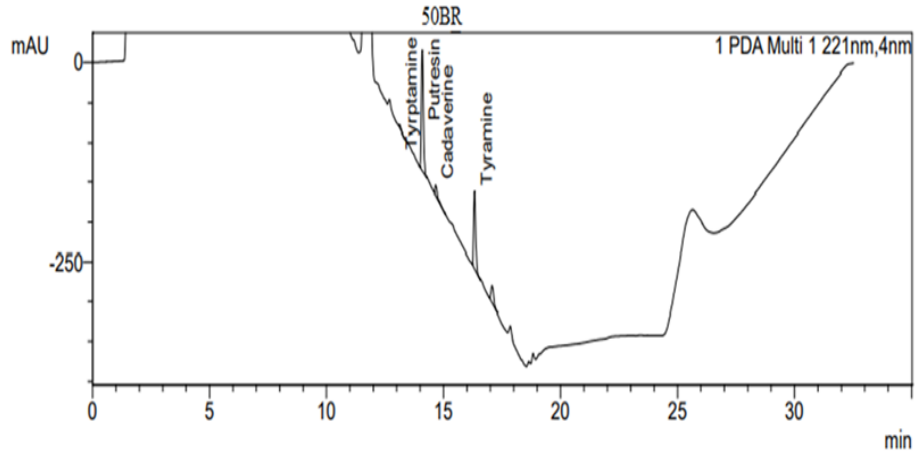
EK 49 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 42BR kodlu suşun kromatogramı



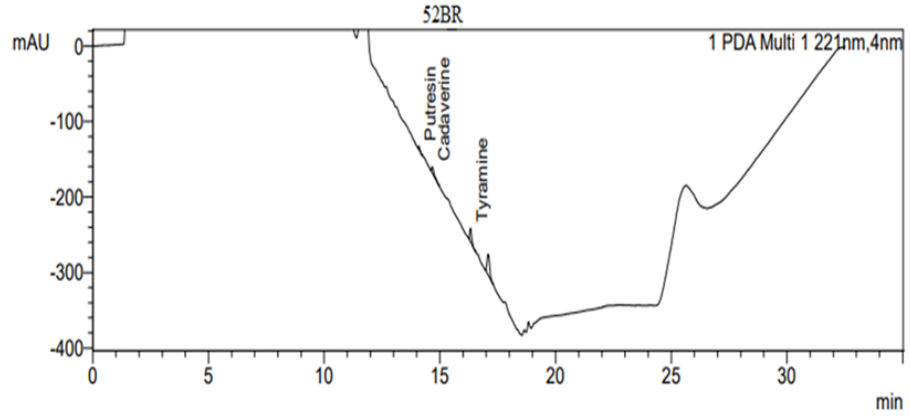
EK 50 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 44BR kodlu suşun kromatogramı



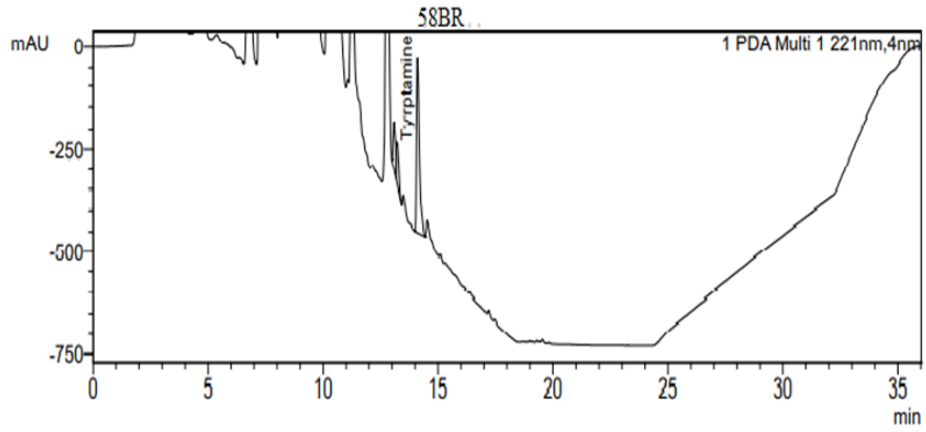
EK 51 Triptamin, putresin, kadaverin ve tiramin üreten 50BR kodlu suşun kromatogramı



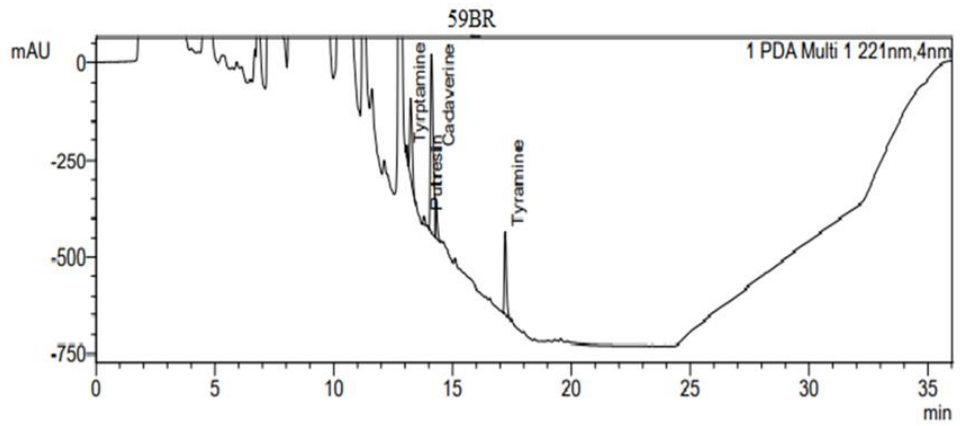
EK 52 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 52BR kodlu suşun kromatogramı



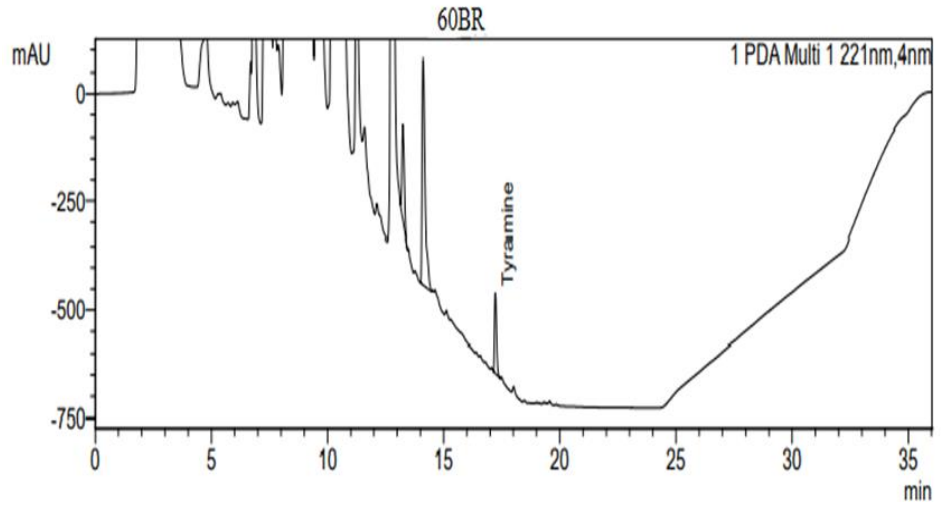
EK 53 Triptamin üreten 58BR kodlu suşun kromatogramı



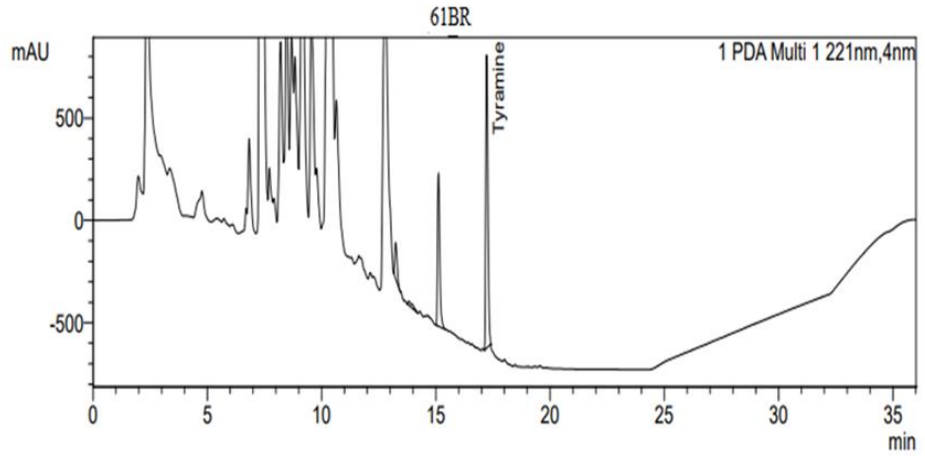
EK 54 Triptamin, putresin, kadaverin ve tiramin üreten 59BR kodlu suşun kromatogramı



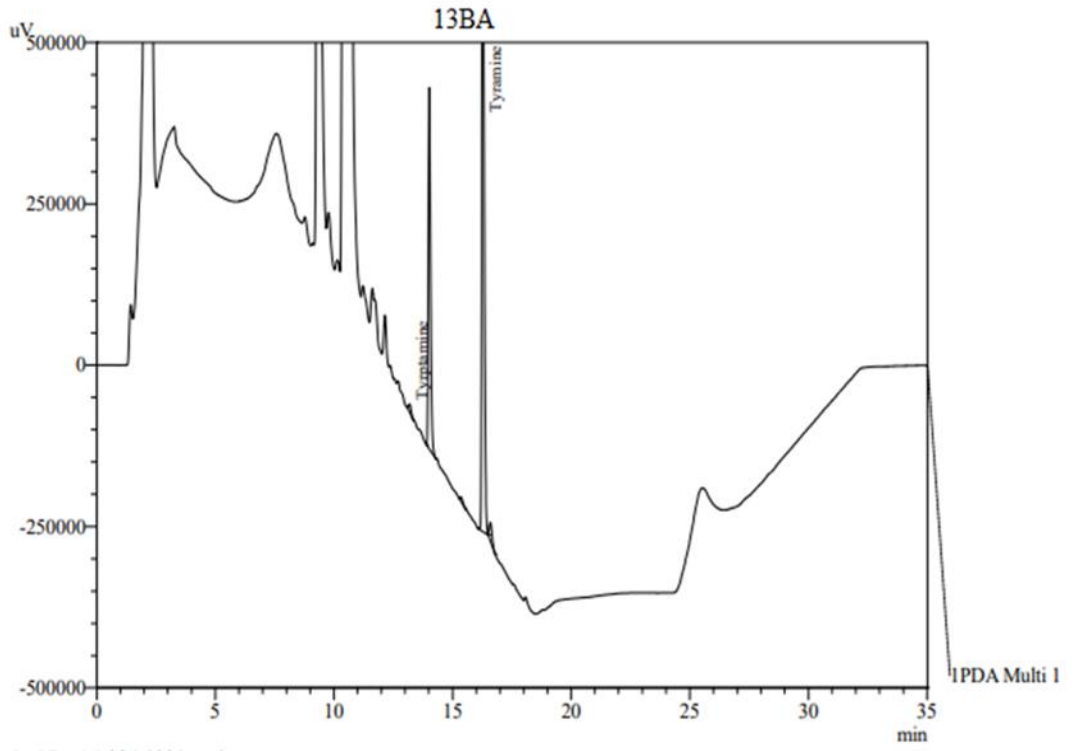
EK 55 Tiramin üreten 60BR kodlu suşun kromatogramı



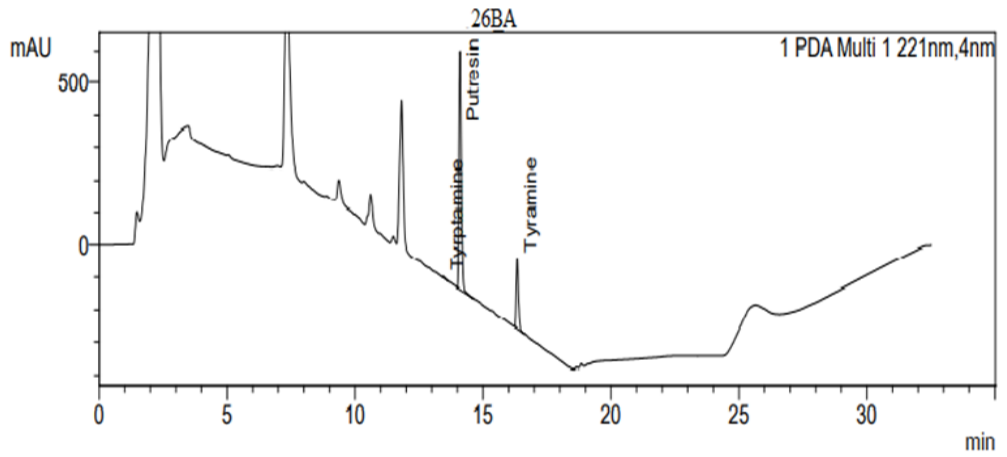
EK 56 Tiramin üreten 61BR kodlu suşun kromatogramı



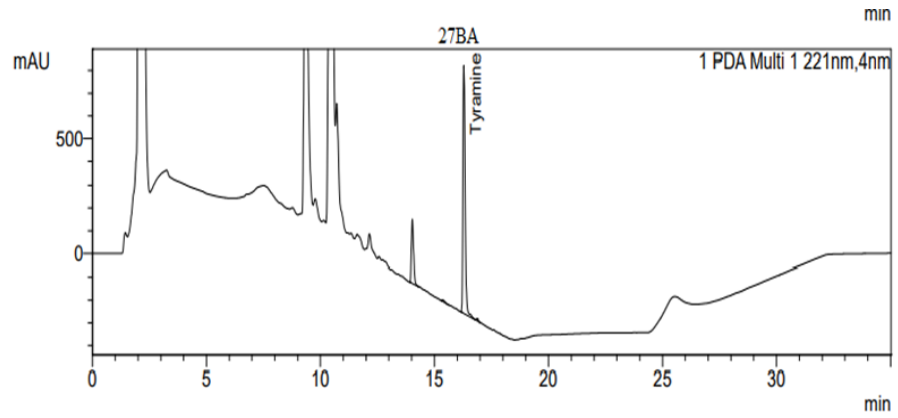
EK 57 Triptamin ve tiramin üreten 13BA kodlu suşun kromatogramı



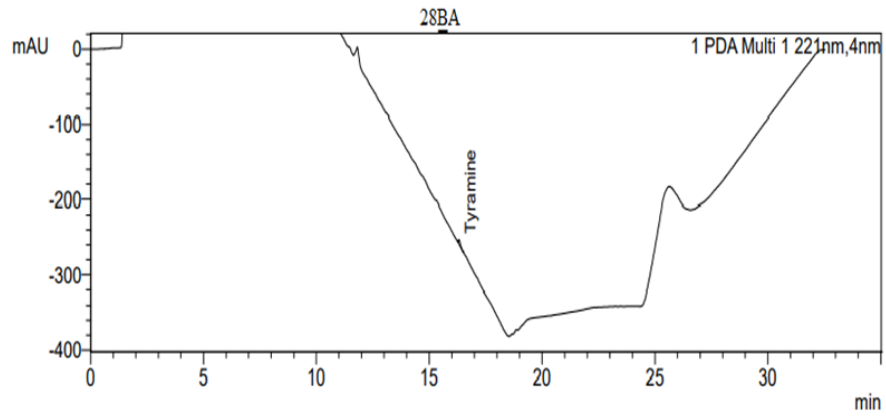
EK 58 Triptamin, putresin ve tiramin üreten 26BA kodlu suşun kromatogramı



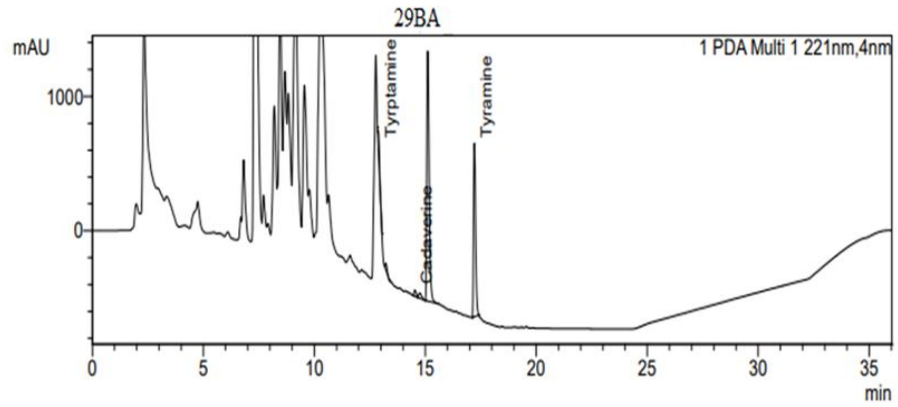
EK 59 Tiramin üreten 27BA kodlu süşun kromatogramı



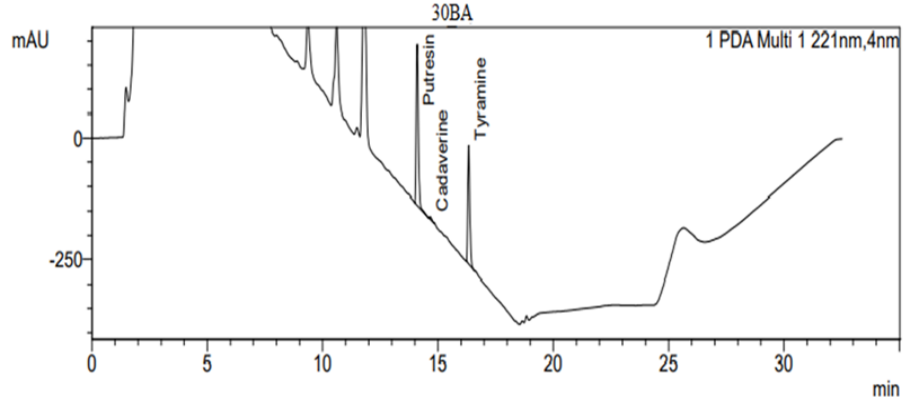
EK 60 Tiramin üreten 28BA kodlu süşun kromatogramı



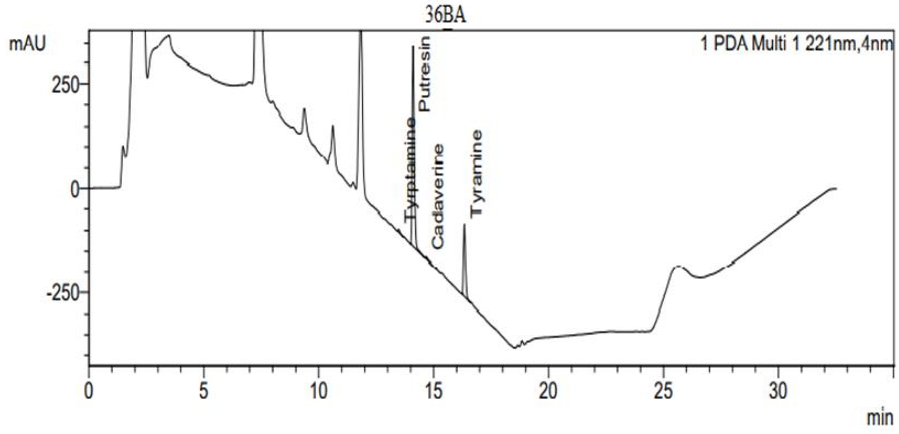
EK 61 Triptamin, kadaverin ve tiramin üreten 29BA kodlu süşun kromatogramı



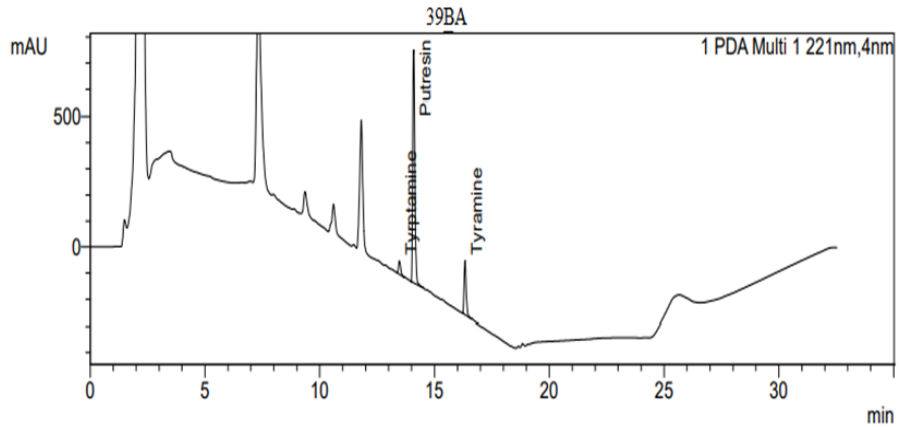
EK 62 Putresin, kadaverin ve tiramin üreten 30BA kodlu suşun kromatogramı



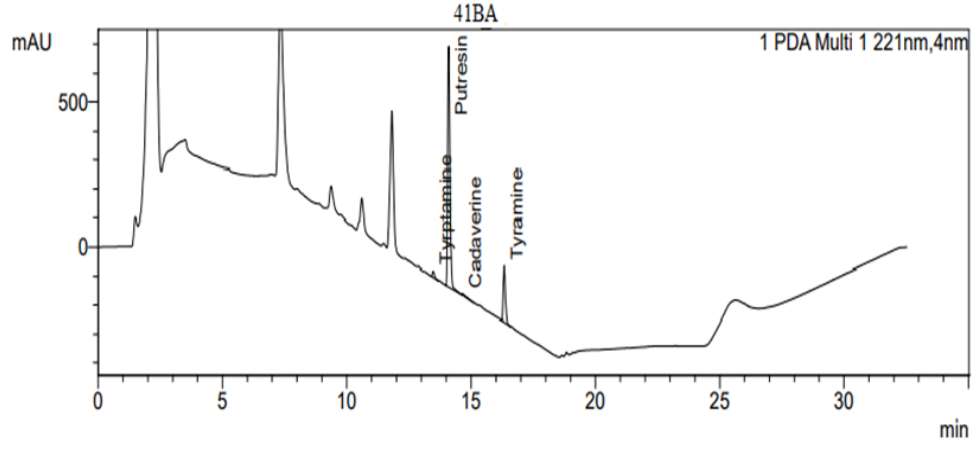
EK 63 Triptamin, putresin, kadaverin ve tiramin üreten 36BA kodlu suşun kromatogramı



EK 64 Triptamin, putresin ve tiramin üreten 39BA kodlu suşun kromatogramı



EK 65 Triptamin, putresin, kadaverin ve tiramin üreten 41BA kodlu suşun kromatogramı



EK 66 Putresin ve tiramin üreten 51BA kodlu suşun kromatogramı

