



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE BAZI BİYOJEN
AMİN ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN
MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ**

ÖZNUR BUCAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKİNİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2011

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE BAZI BİYOJEN
AMİN ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN
MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ

ÖZNUR BUCAK

Bu tez,
Zootekni Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2011

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Öznur Bucak tarafından hazırlanan “Laktik Asit Bakterilerinde Biyojen Amin Üretiminin Moleküler Olarak İncelenmesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 01 / 06 / 2011 tarihinde oy birliği ile Zootekni Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç.Dr.Emin ÖZKÖSE (DANIŞMAN)

Zootekni Anabilim Dalı, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr.İsmail AKYOL (ÜYE)

Zootekni Anabilim Dalı, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr.Ashabil AYGAN (ÜYE)

Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof.Dr. M.HAKKI ALMA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Öznur BUCAK

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

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE BİYOJENİK AMİN ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZNUR BUCAK

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, doğal köy yoğurtlardan izole edilmiş olan 118 *Streptococcus thermophilus* ve 32' si *Lactobacillus bulgaricus*'un biyojen amin üretme potansiyellerinin moleküler olarak belirlenmesidir. Toplam 150 izolatta histamin (*hdc*), tiramin (*tdc*), pütresin (*odc*) ve kadaverin (*ldc*) olmak üzere dört farklı geni polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmiştir. 25 adet *S. thermophilus* izolatın histamin, 16 adet *S. thermophilus* ve 1 adet *L. bulgaricus* izolatın tiramin, 3 adet *S. thermophilus* izolatın izolatın pütresin ve 2 adet *S. thermophilus* izolatın izolatın kadaverin üretme potansiyeli PCR ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Laktik Asit Bakterileri, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, Biyojen amin, histamin, tiramin, pütresin, kadaverin.

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı, Haziran / 2011

Danışman: Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE

Sayfa sayısı: 50

**DETERMINING THE MOLECULAR PRODUCTION OF BIOGENIC
AMIN IN LACTIC ACID BACTERIA**

M.Sc. THESIS

ÖZNUR BUCAK

ABSTRACT

The aim of this study is to determine molecular potential of biogenic amines production of 118 *Streptococcus thermophilus* and 32 *Lactobacillus bulgaricus*, isolated from natural yoghurts. Four different types of biogenic amines, histamine, tiramin, putresin, kadaverin, are determined by Polymerase Chain Reaction (PCR) in total 150 isolates. It was observed that 25 *S.thermophilus* isolates contain histamine, 16 *S. thermophilus* and one *L. bulgaricus* isolates contain tiramin, three *S. thermophilus* isolates contain putrescine and two of *S. thermophilus* isolates contain kadaverine gene.

Key Words: Lactic acid bacteria, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, Biogenic amine, histamine, tyramine, putrescine, cadaverine.

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam
Instution of Art science
Animal Science Main Discipline, June / 2011

Advisor: Asoc. Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE

Page number: 50

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE BİYOJENİK AMİN ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ

ÖZET

Biyojen aminler, gıdalarda mikroorganizma aktivitesine bağlı olarak oluşan moleküler bileşiklerdir. Bu kimyasal bileşikler protein ve amino asit içeren gıdalarda ve özellikle mikroorganizmaların biyokimyasal aktivitesi için uygun şartları sağlayan ortamlarda oluşmaktadır. Fermente gıdalardaki biyojen aminler ilgili amino asitin dekarboksilasyonu sonucu oluşmaktadır. Kimyasal olarak putresin biyojen amini arjinin veya ornithin dekarboksilasyonu, histamin histidin karboksilasyonu, kadaverin lisin karboksilasyonu, tiramin trozin dekarboksilasyonu, ve triptamin triptofan dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır.

Doğal yoğurtlardan izole edilmiş 118 adet *S. thermophilus* ve 32 adet *L. bulgaricus* izolatının 16S rRNA kod bölgesi kullanılarak moleküler tanımlaması teyit edilmiştir. Histamin, tiramin, putresin ve kadaverin üretim kapasiteleri PZR yöntemiyle belirlenmiştir. Histamin üretim potansiyeli *hdc* geni üzerinde 435 bç uzunluğundaki primer çifti ile, tiramin üretim potansiyeli *tdc* geni üzerinde 720 bç uzunluğunda bir bölge çoğaltılarak belirlenmiştir. Putresin ve kadaverin üretim potansiyelleri sırası ile *odc* ve *ldc* genleri üzerinden 972 bç ve 1185 bç uzunluğundaki bölgenin spesifik amplifikasyonu ile belirlenmiştir. HPLC sonuçları ile moleküler olarak tespit edilen biyojenik amin potansiyelleri karşılaştırılmıştır ve PCR ile HPLC sonuçları arasında doğrusal bir ilişki bulunamamıştır.

Amino asit dekarboksilasyonu türe, suşa ve çevre şartlarına göre farklılık göstermektedir. Dolayısı ile türlerde biyojenik amin üretme özelliklerinin tespit edilmesi önemlidir. Gıda zehirlenmelerine sebep olma potansiyelleri nedeniyle biyojenik amin üreten bakterilerin belirlenmesi gıda sanayisi için oldukça önemlidir. Erken ve hızlı olarak biyojenik amin belirlenmesi biyojenik aminlerin oluşumunun önlenmesi açısından önemlidir.

DETERMINING THE MOLECULAR PRODUCTION OF BIOGENIC AMIN IN LACTIC ACID BACTERIA

SUMMARY

Biogenic amines are molecular compounds that are formed depending on microbial activity in foods. These chemical compounds are formed in protein and amino acid rich foods and in environments providing microorganisms proper conditions for their biochemical activity. Biogenic amines formations in fermented foods occur as a result of decarboxylation of relevant amino acid. Biogenic amines, putrecine, histamine, tyramine and tryptamine are formed by decarboxylation of arginine or ornithine, histidine, tyrosine and tryptophan chemically.

Molecular identification of 118 *Streptococcus thermophilus* and 32 *Lactobacillus bulgaricus*, isolates from natural yoghurts were confirmed using 16S rRNA encoding region. Histamine, tyramine, putrecine and cadaverine production capacity were determined with the method of PCR. Amplification of 435 bp long *hdc* gene was used to determine histamine production potential and 720 bp long *tdc* gene amplification was used to verify tyramine production. The potential production of putrecine and cadaverine were determined by the amplification of 972 bp and 1185 bp long fragments on *odc* and *ldc* genes. HPLC results and molecular biogenic amines production potentials are compared and a linear correlation was not found with the result of PCR and HPLC.

Decarboxylation of amino acids shows differences in species, strain and environmental conditions. Consequently, it is important to establish the feature of production of biogenic amines in species. The establishment of bacteria that produce biogenic amine is vital for food industry since those bacteria have the potential of leading to food poisoning. The early and fast establishment of biogenic amines is crucial in terms of avoiding the formation of biogenic amines.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesinde ve yazım aşamasında göstermiş oldukları yardım ve katkılarından dolayı başta danışman hocam Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE olmak üzere, Yrd. Doç. Dr. İsmail AKYOL ve Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarındaki her konuda yardımını ve yakınlığını esirgemeyen değerli hocam Dr. Yekta GEZGİNÇ ve Arş. Gör. Ferit Can YAZDIÇ başta olmak üzere, arkadaşlarım F.Binnur KORKMAZ, İlkin KAYA, Fadime TOPÇAL ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Tezimin yazım aşamasındaki yardımlarından dolayı değerli kuzenlerim Ali ÖNAL ve Süleyman UMMAK' a,

Bugünlere gelmemde emekleri büyük olan ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen kıymetli annem, babam ve abime,

Teşekkürü bir borç bilirim.

Temmuz 2011, KAHRAMANMARAŞ

Öznur BUCAK

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri	1
1.2. LAB Türlerinin Doğal İzolasyonu ve Endüstride Kullanım Alanları.....	2
1.3. Yoğurt Bakterileri.....	6
1.3.1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	7
1.3.2. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	8
1.4. Laktik Asit Bakterilerinde Biyojen Amin Formasyonu.....	8
1.5. Çalışmanın Amacı.....	14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	15
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Kimyasallar	18
3.1.2. Laktik Asit Bakterileri	18
3.2. Metot	24
3.2.1. Bakteriyel Besi Yerlerinin Hazırlanması ve İnkübasyon Koşulları.....	24
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	25
3.2.3. DNA'nın Jel Elektroforezi.....	26
3.2.4. Bakterilerin Stoklanması	26
3.3. HPLC Analizi	27
3.4.1. HPLC Standartlarının Oluşturulması	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1. İzolat Türlerinin Teyit Edilmesi.....	28

4.2. Biyojen Amin Üretim Potansiyellerinin Tespiti.....	30
4.2.1. Histamin Üretiminin Moleküler ve Enstrümental İncelenmesi.....	30
4.2.2. Tiramin Üretiminin Moleküler ve Enstrümental İncelenmesi.....	33
4.2.3. Pütresin Üretiminin Moleküler ve Enstrümental İncelenmesi.....	35
4.2.4. Kadaverin Üretiminin Moleküler ve Enstrümental İncelenmesi.....	39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	42
EK ŞEKİLLER DİZİNİ.....	49
ÖZGEÇMİŞ	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Fermente edilmiş gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri.....	3
Çizelge 3.1.	<i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Lactobacillus bulgaricus</i> bakteri türleri.....	19
Çizelge 3.2.	Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan M17 besi ortamının kimyasal içeriği.....	25
Çizelge 3.3.	Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan MRS besi ortamının kimyasal içeriği.....	25
Çizelge 3.4.	<i>S. thermophilus</i> ve <i>L. bulgaricus</i> türlerinin biyojen amin üretme kapasitelerinin belirlenmesi için tasarlanan primerlerin nükleotid dizileri.....	26
Çizelge 4.1.	SM17 Histidin besi ortamında geliştirilen bazı <i>S. thermophilus</i> izolatlarının ürettiği Histamin miktarlarının HPLC ile belirlenmesi.	32
Çizelge 4.2.	SM17 ve MRS Tirozin besi ortamında geliştirilen bazı <i>S. thermophilus</i> ve <i>L. bulgaricus</i> izolatlarının ürettiği Tiraminin miktarının HPLC ile belirlenmesi.....	34
Çizelge 4.3.	SM17 Ornitin ortamında geliştirilen bazı <i>S. thermophilus</i> izolatlarının ürettiği Pütresinin HPLC analizlerine göre elde edilen ortalama değerleri.....	35
Çizelge 4.4.	SM17 Lizin ortamında geliştirilen bazı <i>S. thermophilus</i> izolatlarının ürettiği Kadaverinin HPLC analizlerine göre elde edilen ortalama değerleri.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Biyojen aminlerin oluşumunun metabolik yolla gösterimi	9
Şekil 4.1.	İzolatların PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	29
Şekil 4.2.	Koloni PZR ile histamin (<i>hdc</i>) geninin çoğaltılmış ve %1'lik agaroz jel görüntüsü	31
Şekil 4.3.	Koloni PZR ile tiramin (<i>tdc</i>) geninin çoğaltılmış ve %1'lik agaroz jel görüntüsü	33
Şekil 4.4.	Koloni PZR ile pütresin (<i>odc</i>) geninin çoğaltılmış ve %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	35
Şekil 4.5.	Koloni PZR ile kadaverin (<i>ldc</i>) geninin çoğaltılmış ve %1'lik agaroz jel görüntüsü	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa	: Aminoasit
BA	: Biyojen amin
BAI	: Biyojen Amin İndeksi
bç	: Baz çifti
BGML	: Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarı
BSA	: Bovine serum albumin
DAO	: Diaminoksidaz
dNTP	: Deoksi nükleotid trifosfat
DTT	: 1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	: Etilen-di-nitrilo-tetra-asetat
Et-Br	: Etidium Bromür
<i>hdc</i>	: Histidin dekarboksilaz
HNMT	: Histamin-N-metil transferaz
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
<i>ldc</i>	: Lizin dekarboksilaz
M	: Markör
MAO	: Monoaminoksidaz
NCBI	: National Center for Biotechnology Institute
<i>odc</i>	: Ornitin dekarboksilaz
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
rpm	: Revolutions per minute
ssp.	: Alt tür
<i>tdc</i>	: Tirozin dekarboksilaz
TBE	: Tris, Borik asit, EDTA
UV	: Ultra viyole

1. GİRİŞ

1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri (LAB) gıda endüstrisinde ve biyoteknolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan ve büyük önem taşıyan mikroorganizmalardır. LAB çiğ ya da pişirilmiş olarak gıdalarda bulunan temel bakteri grubudur (Kontominas ve ark., 2008). Laktik asit, 1780 yılında İsviçreli bir kimyager olan Carl Wilhelm Scheele tarafından keşfedilen, formülü $CH_3CHOH-COOH$ ve kimyasal adı hidroksipropanoyik asit olan bir hidroksi asittir. 1881'de ticari olarak ekşimiş sütten elde edilmiş ve bu yüzden süt asiti adını almıştır.

Sebze, balık, et, süt, tahıl gibi çiğ gıdaların çoğunda hem eş zamanlı hem de büyük ölçekli fermentasyonun korunması ve dönüşüm süreçleri için önemlidir (Gardner ve ark., 2001; Vogel ve ark., 2002). Metabolik bazı özellikleri sayesinde LAB genellikle, fermente gıdaların mikrobiyal güvenliğine lezzet, doku, besin değeri açısından önemli ölçüde katkıda bulunur (Settanni ve Corsetti, 2008). Laktik asitin etkisiyle gıda asitlenir ve bu bozulmaya neden olacak mikroorganizmaların büyümesini engeller, hatta öldürebilir. Aynı şekilde silaj yapımında kullanılan yeşil otların, silolara doldurulup oksijenle teması kesildiğinde ortamda büyüyen laktik asit bakterileri ortamı asitlendirerek silajın bozulmasına neden olabilecek diğer organizmaların büyümesine engel olur.

Morfolojik ve fiziksel olarak, Gram pozitif (+) olup, spor oluşturmayan, katalaz enzim sistemini içermeyen, düşük G+C içeriği (% 33-55) bulunan anaerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. LAB, homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki gruba ayrılırlar ve karbonhidratları fermentasyona uğrattıklarında esas ürün olarak laktik asit üretirler. Homofermentatif bakteriler glikozu parçalaması sonucu % 90 laktik asit, %10 CO_2 oluşturan bakterilerdir. Heterofermentatifler ikincil ürün olarak etil alkol, asetik asit, CO_2 , diasetil, asetonin gibi bileşikler oluştururlar (Prescott ve Dunn, 1987; Halkman, 1991). Aynı zamanda hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler de oluştururlar (Leroy ve de Vuyst, 2004). LAB tarafından oluşturulan laktik asit miktarı ve proteolitik aktivitesi cinslere ve türlere göre değişiklik göstermektedir (de Giori ve ark., 1985).

LAB' nin cins ve türlere göre değişmekle birlikte genel olarak kok, düzgün çubuk ve düzensiz çubuk olmak üzere üç farklı morfolojik yapıda mezofilik mikroorganizmalardır (Holt ve ark., 1994).

Sınıflandırmalarında LAB iki ayrı familyada toplanmıştır. *Streptococcaceae* familyasına ait *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* cinsleri yer alırken; *Lactobacillaceae* familyasına ait *Lactobacillus* cinsi bulunmaktadır (Daeschel, 1989). Gıda endüstrisi ve biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan başlıca LAB cinsleri ise; *Aerococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Melisococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella*'dır ve bunlar arasındaki en geniş cins *Lactobacillus*' tur (Axelsson, 2004). *Bifidobacterium* cinsi de LAB arasında yer almaktadır (Axelsson, 1998).

LAB'nin farklı cinslerine ait birçok tür ve suş, probiyotik olarak kullanılmaktadır. Özellikle *Lactobacillus* cinsi probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların başında olmak üzere *Enterococcus* ve *Bifidobacterium* cinsleri de bilinmektedir (Salminen ve ark., 2002; Soomro ve ark., 2002). Probiyotik olarak kullanılan LAB'nin sağlığa faydalı etkileri suşlara özgü olup, bu etkilerin ortaya çıkışı farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir (Mercenier ve ark., 2002) LAB probiyotik olarak laktoz intoleransının hafifletilmesi, barsak florası üzerinde olumlu etkisi, intestinal sistem infeksiyonlarının engellenmesi, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi ve buna benzer klinik etkilerin önlenmesinde büyük öneme sahiptir (Heyman ve Menard, 2002). Laktik asit bakterilerinin *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Enterococcus* cinsi mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösterdiği bildirilmektedir (Keppler, 1994).

LAB' nin başta fermente süt ürünleri olmak üzere diğer fermente gıdalarda özellikle *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* gibi patojen bakterilerin gelişimleri üzerine antibakteriyal etkileri olduğu bilinmektedir (Jay, 1992). *L. rhamnosus* ve *L. reuteri*' nin *Fusarium*, *Aspergillus* ve *Penicillium* üzerine antifungal etkileri araştırılmış ve iki laktik asit bakterisinin sözkonusu küf suşları üzerinde antifungal etkisi olduğu tespit edilmiştir (Plockova ve ark., 2001).

1.2. LAB Türlerinin Doğal İzolasyonu ve Endüstride Kullanım Alanları

LAB, et ve balık ürünleri (sucuk, balık sosu vb.), süt ürünleri (yoğurt, peynir, kefir, tereyağı vb.), tahıl ürünleri (ekmek, boza, oğuz vb.), fermente edilmiş içecekler ve sebzeler (lahana ve salatalık turşusu vb.), gibi bir çok gıda doğal olarak ya da sonradan starter kültür olarak ilave edilerek gıdaların olgunlaştırılması, üretimi ve dayanıklılığının sağlanmasında önemli rol oynarlar ve bu materyallerden izole edilirler (Hayaloğlu ve Erginkaya, 2001).

LAB gıdanın bozulmasına neden olan mikroorganizmalar ve insanlarda hastalıklara

neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde ürettikleri organik asitler, hidrojen peroksit, laktoperoksidaz, diasetil ve bakteriyosinler gibi maddeler nedeniyle antagonistik etkiye sahiptirler. Bu nedenle, bu mikroorganizmaların kullanılarak üretildiği gıdalar insan sağlığı açısından güvenilir olarak kabul edilmektedirler (Vescovo ve ark., 1997). Süt ürünleri, et ürünleri, sebze, tahıl ve alkollü içecekler gibi fermente edilmiş ürünlerde fermentasyonu gerçekleştiren LAB Çizelge 1.1’de listelenmiştir (Leroy ve de Vuyst, 2004).

Çizelge 1.1. Fermente edilmiş bazı gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri.

FERMENTE EDİLMİŞ ÜRÜNLER	LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ
SÜT ÜRÜNLERİ	
Peynirler	<i>L. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Leuconostoc dextranicum</i> , <i>L. mesenteroides</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
Yoğurt	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. durans</i> <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> ,
Fermente edilmiş probiyotik süt	<i>B. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>
Kefir	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofacies</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. casei</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>L. mesenteroides</i>
Kımız	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i>
Tarhana	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
ET ÜRÜNLERİ	
Fermente edilmiş sosis (Avrupa)	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i>
Fermente edilmiş sosis (ABD)	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Fermente edilmiş balık ürünleri	<i>Lb. alimentarius</i> , <i>C. Piscicola</i>
Sucuk	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. agilis</i> , <i>L. carnis</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. viridescens</i>
Pastırma	<i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. sakei</i>

Çizelge 1.1 (devamı)

SEBZE ÜRÜNLERİ	
Lahana turşusu	<i>Leuc. mesenteroides, Lb. plantarum, P. acidilactici</i>
Salatalık turşusu	<i>Leuc. mesenteroides, P. cerevisiae, Lb. brevis, Lb. plantarum</i>
Fermente edilmiş zeytin	<i>Leuc. mesenteroides, Lb. pentosus, Lb. plantarum,</i>
Fermente edilmiş sebzeler	<i>P. acidilactici, P. pentosaceus, Lb. plantarum, Lb. fermentum</i>
Soya sosu	<i>T. halophilus</i>
TAHİL ÜRÜNLERİ	
Hamur Mayası	<i>Lb. sanfransiscensis, Lb. farciminis, Lb. fermentum, Lb. brevis, Lb. plantarum, Lb. amylovorus, Lb. reuteri, Lb. pontis, Lb. panis, Lb. alimentarius, W. Cibaria</i>
İÇECEKLER	
Şarap	<i>O. oeni</i>
Pirinç Rakısı	<i>Lb. sakei</i>
Şalgam	<i>L. sanfranciscensis, L. pontis, L. brevis, L. plantarum, L. alimentarius, L. fructivorans, L. reuteri, L. fermentum</i>
Boza	<i>Leuconostoc para mesenteroides, L. mesenteroides ssp. mesenteroides, , L. mesenteroides ssp. dextranicum, L. oenos, Lb. safrancisco, L. coryniformis, L. fermentum</i>

LAB'nin sık olarak endüstriyel uygulamalarda seçilen gıda ve içerdiği türler genel olarak şöyle özetlenebilir: *Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc* cinsi türleri süt fermentasyonunda kullanılırlar (de Vuyst ve Tsakalidou, 2008). *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsi türleri etten; *Pediococcus pentosaceus, Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus plantarum* türleri sebzelerden (Plengvidhya ve ark., 2007; Chamkha ve ark., 2008); *Oenococcus oeni* türü ise şaraplardan izole edilmektedir .

Yoğurt üretiminde *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* türlerinin (Riemelt ve ark., 1996) yanısıra son yıllarda probiyotik olarak kullanılan yoğurtlarda *L. acidophilus, L. rhamnosus, L. fermentum, Bifidobacterium bifidum, B. longum,* ve *Streptococcus filant* türlerinin kullandığı belirtilmektedir (Vinderola ve ark., 2000). *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* cinsine ait türlerin laktoz metabolize yetenekleri sayesinde asitleşme değerlerinin düşük olduğu bildirilmektedir (Herreros ve ark., 2003; Badis ve ark., 2004).

Enterokoklar fonksiyonel özelliklerinden yani asitlik, proteoliz ve lipolitik aktiviteleri, sitrat metabolizması, probiyotik özellikleri ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal aktiviteye sahip proteinleri sentezleme yeteneklerinden dolayı fermente gıda endüstrisinde önemli yer tutan laktik asit bakterilerinden birisidir (Andrighetto ve ark. 2001; Sarantinopoulos ve ark., 2001; Giraffa 2003; Franz ve ark., 2003; Moreno ve ark., 2006; Ogier 2008). Enterococcus cinsi içinde şu ana kadar 32 tür rapor edilmiştir. Bunlardan *E. faecalis* and *E. faecium* en önemli iki tür olup insanların gastrointestinal sisteminin doğal florasında bulunmaktadır. *Streptococcus faecalis* ve *S. faecium* türleri *Enterococcus faecium* ve *E. Faecalis* olarak değiştirilmiştir (Simon ve ark., 1982). Bazı peynir ve sosislerin olgunlaştırılmasında starter kültür olarak kullanılırlar ve zayıf hijyene sahip ya da iyi işlenmemiş gıdalarda bulunurlar. Deniz ve tatlı su örneklerinde enterokoklar önemli bakteriyel indikatör olarak analiz edilirler. İnsan ve hayvanların sindirim sisteminde ya da doğada yaygın olarak görülebilirler. Karbonhidratları fermente ederler ve esas ürün olarak laktik asiti verirler.

Leuconostoc doğal olarak bitkilerde ve sütlerde yoğun miktarda bulunurlar. *L. cremoris* süt ürünlerinde aroma maddesi oluşturur özellikle asetaldehiti etil alkole dönüştürerek tereyağında yoğurt aroması oluşumunu engeller. *L. dextranicum* ve *L. mesenteroides* türleri turşu fermentasyonunda büyük rol oynar ve halofilik mikroorganizmalar olmalarından dolayı salatalık turşularında ilk olarak bu türlere rastlanır. Şeker fabrikalarında, kek, dondurma ve şurup gibi ürünlerde üretimleri sırasında kolayca gelişebilmekte ve ürettikleri mukoz nedeniyle sorun oluşturabilmektedirler (Marino ve ark., 2000).

Lactococcus lactis türleri *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. cremoris* ve *L. lactis ssp. hordniae* olmak üzere üç alt türe ayrılmaktadır. Peynir, yayıkaltı, ekşi krema ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadırlar. *Pediococcus* cinsi türleri ise laktozu kolayca kullanamadıklarından ve gelişimleri için uygun faktörleri bulunduramadıklarından dolayı süttten ziyade bitkilerde bulunmaktadır. *P. acidilactici* sosis ve sucuk üretiminde (Liu ve ark., 2008), *P. cerevisiae* soya sosu üretiminde kullanılmaktadır. *P. halophilus* yüksek tuz içeren ürünlerde serbest amino asitleri dekarboksile ederek gıda bozulmalarına yol açmaktadır.

Weissella cinsi Yunan fermente sucuğundan izole edilen bakterinin normalde *Leuconostoc* 'lara benzer olduğu ancak yapılan genetik çalışmalar sonucunda farklı bir yapıya sahip olduğu anlaşılmış ve bazı *Lactobacillus* türlerini de içeren *Weissella* adlı yeni bir grup oluşturulmuştur. *Weissella cibaria* türü mayalı ürünlerin yapısal özelliklerinin değiştirmek için kullanılır (Cagno ve ark., 2006).

Lactobacillus plantarum salatalık, lahana ve zeytin fermentasyonunda sık olarak kullanılan ticari starter kültürleridir (Vega Leal-Sanchez ve ark., 2003). Özellikle *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus pentosus* zeytin fermentasyonunda starter olarak kullanılan ana türlerdir (Ercolini ve ark., 2006; Chamkha ve ark., 2008; Hurtado ve ark., 2008). Yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda ekşi hamurda *L. plantarum*, *L. brevis*, *Weissella cibaria* ve *P. pentosaceus* türlerinin baskın LAB türleri olduğu tespit edilmiştir (Iacumin ve ark., 2009).

Oenococcus cinsi alt türü olan *Oenococcus oeni* malolaktik fermentasyon özelliğinden dolayı şarap yapımında büyük öneme sahiptir (Hernández ve ark., 2007). Bu türün şaraplarda bulunan bazı suşlarının histidini dekarboksile edip histamin ürettiği tespit edilmiştir (Lonvaud Funel ve ark., 1994).

1.3. Yoğurt Bakterileri

Laktik asit bakterilerinden *Streptococcus thermophilus* ve *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* suşları yoğurt üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Tamime ve Robinson, 1999). Termofilik karakterde bulunan bu bakterilerin en önemli teknolojik özellikleri laktik asit üretebilme yetenekleridir (Suarez ve ark., 2002). Bunun yanı sıra starter kültür olarak kullanıldıkları üründe standart kalitenin eldesi için proteolitik ve antimikrobiyal aktiviteleri, asetaldehit üretim yetenekleri belirlenmelidir. Bu özellikleri sayesinde *Streptococcus thermophilus* ve *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* suşları arasında oluşan simbiyotik ilişki sayesinde yoğurda özgü koku, tat, aroma ve yoğunluk oluşmaktadır (Rimelt ve ark., 1996). Yoğurdun aromasında karbonil bileşiklerden asetaldehit, diasetil, aseton ve asetoin belirleyici olarak rol oynar (Davies ve Law, 1984).

Yoğurt sütteki proteinlerin (kazein ve serum proteinleri) laktik asit fermentasyonu sonucu oluşan pıhtıdan ibarettir. Yoğurt pıhtısının oluşumu starter kültürlerin oluşturduğu asiditenin etkisiyle gerçekleşir (Tekinşen, 1996). Yoğurt bakterileri olan *Streptococcus thermophilus* ve *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* çoğalmaları ve gelişmeleri için ihtiyaç duydukları enerjiyi karbonhidrat fermentasyonu ile sağlamaktadır. Örneğin *Streptococcus thermophilus* laktoz, sakkaroz, glikoz ve fruktozu fermente edebilir; kısmen de maltoz ve rafinozu da parçalarlar (Kavas ve Çelebi, 1991).

Besinsel özellikler açısından yoğurt, süte benzer kompozisyonda olup, mükemmel bir protein, kalsiyum, fosfor, riboflavin, tiamin ve B12 vitamin kaynağıdır. Aynı zamanda folat, nisin, magnezyum ve çinko açısından değerli bir kaynaktır. Protein içeriği, sağlık için

gerekli bütün aminoasitleri içerdiği için yüksek biyolojik değere sahiptir. Vitamin ve mineral açısından ise vücuttaki absorpsiyonu ve kullanımı açısından biyoyararlılığı yüksektir (Akalin ve ark., 2004; Mckinley, 2005).

1.3.1. *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus süt ürünleri üretiminde yaygın kullanıldığından, gıda endüstrisi için büyük önem taşımaktadır (Hols ve ark., 2005). Starter kültür olarak kullanımı sayesinde teknolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir LAB türüdür. Yoğurtta *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* ile birlikte geleneksel kullanımı yanında İsviçre, Mozarella, Permasan ve Tuğla peynirleri gibi birkaç çeşit peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Parente ve Cogan, 2004).

Streptococcus thermophilus homofermentatiftir ve optimum büyüme sıcaklığı 42-52 °C arasındadır (Axelsson, 1993). Optimum gelişme pH'ı 6.0-6.5 arasında olup aerobik ve fakültatif anaerob özellik göstermektedir. DNA' sındaki G+C içeriği % 37-40 moldür (Marshall, 1987) ve *Streptococcus thermophilus* ' un genom büyüklüğü 1.75 ve 1.82 Mb arasında değişmektedir (Davidson ve ark., 1996).

S. thermophilus suşunun proteolitik sistemi, laktoz- galaktoz metabolizması, üreolitik aktivitesi, metabolik taşıyıcılık gibi birçok faktörler peynirin olgunlaşması boyunca en hızlı ve en baskın şekilde etki sağlarlar (Iyer ve ark., 2009). *S. thermophilus*' un ana fonksiyonlarından biri süt fermentasyonunda hızlı asitleştirme sağlamaktır (Marino ve ark., 2003). *S. thermophilus* galaktozu metabolize edemez ve laktoz fermentasyonu boyunca ortama bu şekeri atar (Vaillancourt ve ark., 2004, 2008). Böylece *S.thermophilus*' un sadece süt fermentasyonu ve laktik asit üretimi ile ilgili değil aynı zamanda şeker metabolizması, galaktoz kullanımı (Mora ve ark., 2002) gibi birçok önemli teknolojik değeri vardır.

S. thermophilus, üreaz üreten tek LAB olmasına rağmen yoğurt ve peynir üretiminde kendi starter aktiviteleri için zararlı olarak kabul edilmiştir ve bu birçok özelliklerini etkileyebilmektedir (Mora ve ark., 2004; Monnet ve ark., 2005). *S. thermophilus*, BA' nın yanısıra aynı zamanda süt endüstrisi için oldukça önemli olan ekzopolisakkarit üretiminden sorumludur (Laws ve ark., 2001).

S. thermophilus sadece süt ürünlerinden değil aynı zamanda bitkisel kaynaklardan da izole edilebilmektedir (Michaylova ve ark., 2007). Bunun dışında su, toprak, insan ve hayvan bağırsak sistemlerinde bulunurlar. Bu türlerin antibiyotiklere karşı direnç özelliği gösterdikleri tespit edilmiştir (Tosi ve ark., 2007).

1.3.2. *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*

Laktobasiller, genellikle sütte doğal olarak varolduğundan yoğurt ve peynirlerde doğal olarak bulunurlar. Ayrıca starter kültür olarak kullanılmaları ve pastörizasyonun tam olarak sağlanamadığı durumlar ile pastörizasyon sonrası kontaminasyonlar, biyojen aminlere rastlama olasılıklarını arttırmaktadır. Laktobasillerin dekarboksilaz yeteneğine sahip karışık suşları proteinaz aktivitesine sahiptir. Bu nedenle aşırı proteolizis sonucu süt ürünlerinde tiramin, histamin ve pütresin oluşumundan sorumlu önemli ajanlar olarak kabul edilmektedirler (Joosten ve Northolt, 1987; Khalid ve Marth, 1990).

Tuza toleranslı laktobasillerin bazı saf kültürleri hem histidin ve tirozini dekarboksile etmekte, hem de pütresin ve kadaverini kütle halinde oluşturabilmektedir. Termofilik laktobasiller ise histaminin serbest hale geçişini arttırarak histamin oluşumunu pozitif yönde etkiler. Bu nedenle bu suşların starter kültür olarak kullanılmalarına dikkat edilmesi gerekir (Fox ve Law, 1991).

1.4. Laktik Asit Bakterilerinde Biyojen Amin Formasyonu

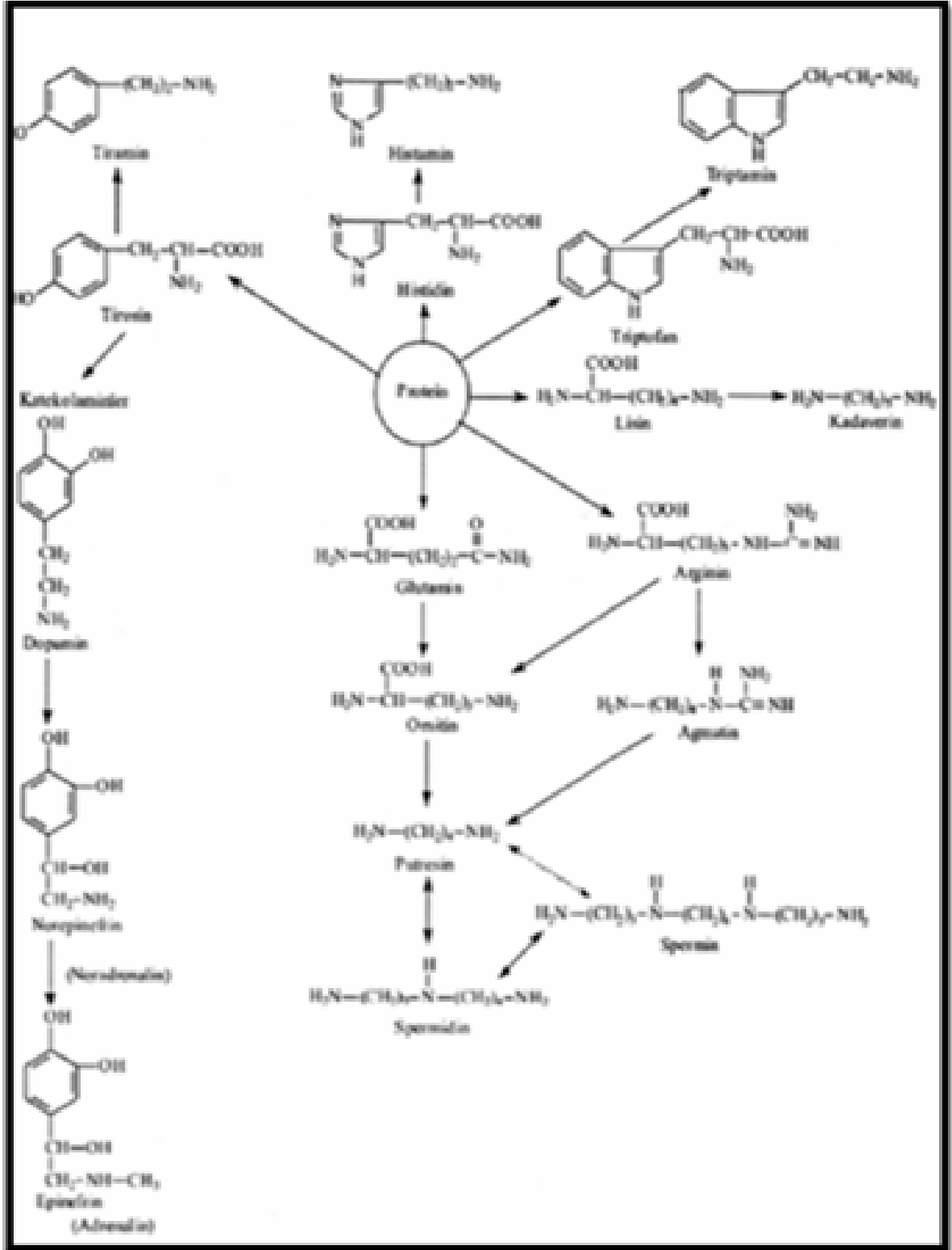
Biyojen aminler, doğal olarak hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda bulunan ve bunların metabolik aktiviteleri sonucu oluşan düşük moleküler ağırlıklı organik bazlardır (Hernandez ve ark., 1996). Farmakolojik ve fizyolojik olarak büyük etkiye sahip olmasına karşın, gıdalarla yüksek miktarda vücuda alındığında solunum sıkıntısı, baş ağrısı, hipo veya bhiper gerilim ve alerji gibi toksikolojik etkiye sahip olurlar (Ladero ve ark., 2010).

Biyojen aminler genellikle serbest amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır. Amino asit dekarboksilasyonu alfa karboksil grubunun amino asitten uzaklaştırılıp ilgili amine bağlanması ile gerçekleşmektedir (Şekil 1.1). Ortamdaki serbest amino asitlerin, dekarboksilazların oluşumu için pH ve sıcaklık gibi uygun çevre etmenlerinin, dekarboksilaz enzim aktivitesi gösteren mikroorganizmaların varlığı, gelişimi, enzim içeriği ve bunların sayısı biyojen amin oluşumunu etkilemektedir (Marcobal ve ark., 2006; Fernandez ve ark., 2007; Arena ve ark., 2008). Aminoasit dekarboksilaz aktivitesi optimum pH'ın 4 ve 5.5 arasında olduğu asidik ortamda çok güçlüdür (Teodorovic ve ark., 1994).

Biyojen aminler gıdalarda bazı spesifik aminoasitlerin dekarboksilasyonuna (glutamik asit ve arjininden pütresin, histidinden histamin, tirozinden tiramin, triptofandan triptamin, fenilalaninden feniletilamin, lizinden kadaverin, glutaminden ornitin, ornitinden pütresin, sperminden spermidin ve arjininden agmatin) veya aldehit ve ketonların transaminasyonuna bağlı oluşan temel azotlu bileşiklerdir (Maijala ve ark., 1995).

Poliaminler olarak nitelendirilen spermin ve spermidinin ise pütresinden meydana geldiği öne sürülmektedir (Kalac ve ark., 1999).

Şekil 1.1. Biyojen aminlerin oluşumunun metabolik yolla gösterimi (Halasz ve ark., 1994)



Biyojen aminler hormonlar, alkaloidler, nükleik asitler ve proteinlerin sentezinde azot kaynağı olarak rol almaları, gıdalarda aroma maddelerinin oluşumuna katkıda bulunmalarının yanı sıra insanlarda mide hacminin ve pH' ın düzenlenmesinde, vücut sıcaklığının ayarlanmasında ve beyin aktivitesinin yerine getirilmesi açısından son derece önemlidirler (Allen, 2004).

Proteolizis doku proteinlerin dokulardan salınımında önemli rol oynarlar ve dekarboksilasyon reaksiyonu için substrat oluşturmaktadır (Shalaby, 1996). Gıdalardaki biyojen aminler ise; gıdaların bozulması ve gıda güvenliği ile yakından ilişkilidir (Halasz ve ark., 1994). Biyojen aminlerin aroma ve lezzet maddeleri olmaları diğer fonksiyonları arasına girmektedir. Enzimatik olmayan esmerleşme olayında etkilidirler. Nükleik asit, alkaloid ve protein sentezinde azot kaynağıdır. Nitritle reaksiyona girerek kanserojen nitrozaminleri oluştururlar. Gıdaların kalite kontrolünde tamamlayıcı unsur olarak görev alırlar (Ölmez, 2000).

Biyojen amin içeren birçok gıda bulundurduğu amino asitlerin dekarboksilasyonunun gıdalarda bulunan mikroorganizmaların substrata özel enzimleri ile gerçekleşmektedir. Ancak aminoasit dekarboksilasyonu bakteri türleri arasında çok farklılık göstermektedir. Birçok tür bir veya daha fazla aminoasiti dekarboksile edebilmektedir. Ayrıca aynı türün farklı suşları farklı biyojen amin üretme yeteneğine sahiptir ve bu türden ziyade suşa bağımlıdır (De Las Rivas ve ark., 2005). Dekarboksilaz enzimini oluşturarak, amino asitlerin dekarboksilasyonunda rol alan mikroorganizmalar arasında *E. coli*, *Proteus morgani*, *P. Mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faceium*, *E. durans*, *Pseudomonas reptilivora*, *Salmonella*, *Shigella*, *Betabacterium*, *Photobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* türleri bulunmaktadır (Renata ve ark., 1999; Halasz ve ark., 1994; Brink ve ark., 1990; Suzzi ve Gardini, 2003).

Gıdalarda uygun ısı (20-37°C) ve pH (5-7) ile yeterli miktarda biyojen amin oluşturabilen mikroorganizma olması durumunda amin oluşumunun hızlandığı; ancak tuz oranının % 5'ten fazla olması durumunda ise biyojen amin oluşumunun azaldığı bildirilmektedir. Gıdaların uygun olmayan ortamlarda saklanması (sıcaklık, pH, karbon kaynakları, aerobik veya anaerobik şartlar) biyojenik amin üretimini etkilemektedir. Ayrıca fermente gıdalarda kullanılan starter kültürlerin de gıdadaki normal mikrobiyal flora ile etkileşimleri sonucu direkt ve indirekt olarak biyojen aminlerin oluşumunda etkili oldukları bildirilmektedir (Silla Santos, 1996).

Biyojen aminler süt ve süt ürünleri, balık ve balık ürünleri, et ve et ürünleri, çikolata, meyve sebzeler, şarap ve bira gibi fermente içecekleri kapsayan gıdalarda (Kalac ve ark., 2002; Marcobal ve ark., 2005) bulunup, bunların işlenmesi, olgunlaşması ve depolanması sırasında oluşur (Ten Brink ve ark., 1990; Halasz ve ark., 1994; Suzzi ve Gardini, 2003). Gıda varlığı açısından büyük öneme sahip olan biyojen aminlere; histamin, tiramin, kadaverin, triptamin, serotonin, putresin, spermin, spermidin, dopamin, agmatin, oktopamin, metilamin, etilamin, etanolamin, fenilettilamin, diaminobütan örnek gösterilebilir (Shalaby, 1996). Biyojen aminlerin isimlendirilmesi sentezlendikleri amino asite göre yapılmaktadır. Örneğin; histamin histidinden (Lonvaud-Funel ve Joyeux, 1994; Coton ve ark., 1998a, 1998b), tiramin tirozinden (Lucas ve ark., 2003) putresin ornitinden (Arena ve Manca de Nadra, 2001; Marcobal ve ark., 2004) meydana geldiği Şekil 1.1' de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

İnsan vücudu, biyojen aminlerin neden olduğu çeşitli toksik etkilerin ortaya çıkmasını önleyen kuvvetli bir detoksifikasyon sistemine sahiptir. Bu detoksifikasyon sistemi monoaminoksidaz (MAO), diaminoksidaz (DAO) ve histamin-N-metil transferaz (HNMT) dan oluşmaktadır (Stratton ve ark., 1991). Normal şartlarda, gıdalarla alınan biyojen aminler bu enzimlerle toksik olmayan ürünlere çevrilir. Fakat yüksek miktarda BA'ların alınması detoksifikasyon metabolizmasının çeşitli farmakolojik ajanlar tarafından inhibe edilmesi detoksifiye durumunu engelleyeceğinden gıda zehirlenmesine yol açabilmektedir. Ayrıca gıdalarda biyojen aminlerin bir arada bulunuşu da toksik etkilerin ortaya çıkmasında önemi büyüktür. Tiramin MAO, triptamin DAO, b-fenilettilamin DAO ve HNMT enzimlerini inhibe etmektedir. Spermin ve spermidin ise gastrointestinal duvardan histamin geçişini arttırmaktadır.

Biyojen aminler içerdikleri amin sayısına göre monoamin veya poliamin olarak adlandırılırlar. Genellikle, monoaminoksidaz (MAO) ve diaminoksidazlar (DAO) tarafından gerçekleştirilen oksidatif deaminasyonla bu aminlerin fizyolojik inaktivasyona uğradıkları bildirilmektedir. Monoaminler, monoaminoksidaz tarafından daha az toksik olan aldehit ürünlerine parçalanarak detoksifiye edilirler. Enzim bütün dokularda bulunmakla birlikte, aktivitesi gastrointestinal kanalda çok yüksektir. Ancak MAO inhibitörü ilaçlarla tedavi gören hastalarda, özellikle peynir tükettikleri zaman baş ağrısı, boyun sertliği, kalp çarpıntısı ve bazen de ölümlü sonuçlanabilen hipertansiyon krizleri meydana gelmektedir (Ramantanis 1984).

Biyojen aminler arasında histamin; potansiyel olarak çok tehlikelidir. Histaminin gıdalardaki yıkım olaylarının indikatörü olarak ve gıda zehirlenmelerinden sorumlu bir madde olarak önemi büyüktür. Bu biyojen amin, gıdalardaki histidin dekarboksilaz enzimine sahip mikroorganizmaların serbest histidini histamine çevirmesi sonucu oluşmaktadır (Stratton 1991). Balık ve balık ürünlerindeki biyojen amin konsantrasyonu (özellikle histamin), insan sağlığı ve ürün kalitesini etkilediğinden dolayı bu değerlerin tespiti büyük önem taşımaktadır (Özoğul ve ark., 2004; Shalaby, 1996). Peynirlerde histamin zehirlenmesinde asıl rol alan bakterinin *Lactobacillus buchneri* olduğu belirtilmektedir. Bunun yanında *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. tactsis*, *Enterococcus faecium* gibi bakterilerin de peynirlerde histamin ürettiği saptanmıştır. Putresin ve kadaverin gibi biyojen aminlerin histamin toksitesini arttırıcı etki yaptığı bildirilmiştir. Özellikle barsak ortamında pütresin ve kadaverin gibi aminlerin bulunması histamini detoksifiye eden enzimlerin inhibisyonuna neden olup toksiteyi arttırıcı özellik göstermektedir (Gürbüz ve Değirmencioğlu, 2003).

Tiramin, gıdalardaki tirozin dekarboksilaz enzimine sahip mikroorganizmaların serbest tirozini tiramine çevirmesi sonucu oluşmaktadır. *Lactobacillus brevis* (Lucas ve ark., 2003), *Enterococcus faecalis* (Connil ve ark., 2002) ve *Cornobacterium divergens* (Coton ve ark., 2004) *Streptococcus* ssp., *Lactococcus* ssp., *Pediococcus* ssp. tarafından üretildiği bildirilmektedir (Ten Brink ve ark., 1990; Bunkova ve ark., 2009). Farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen tirozin dekarboksilaz gen dizileri karşılaştırıldığında bunların gen dizilimi ve organizasyonunda büyük benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Fernandez ve ark., 2004). Fermente edilmiş gıdalarda veya olgunlaştırılmış gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Peynir, salamura et ve balık, şarap, bira, turşu ve maya ekstraktlarının tüketilmesine bağlı olarak ciddi tiramin zehirlenmesi hatta ölümler görüldüğü bildirilmektedir (Jones JM., 1994). Tiramin ayrıca MAO inhibitörü alan hastalarda baş ağrısı ve hipertansiyon krizlerine yol açan biyojen amin olarak sorumlu tutulmaktadır (Kalac ve ark., 1999; Bodmer ve ark., 1999) ve tiramin kan basıncını arttırdığı bilinen bir biyojen amindir (Maijala, 1994).

Pütresin, gıdalardaki ornitin dekarboksilaz enzimine sahip mikroorganizmaların serbest ornitini pütresine çevirmesi sonucu oluşmaktadır (Marcobal ve ark., 2004). histamin ve tiramine oranla daha az farmakolojik etkiye sahip olmasına rağmen histamin ve tiramin detoksifikasyonunu etkilediği bildirilmektedir. Buna ilave olarak pütresin nitrit ile reaksiyona girerek kanserojenik nitrozamin oluşturmaktadır. Bu sebepten dolayı gıdalardaki biyojen amin oluşumunun önlenmesi önemlidir. Pütresin aynı zamanda

şaraplarda *O. oeni*' nin bazı suşları tarafından üretilen bir BA çeşididir (Marcobal ve ark., 2004). Son zamanlarda elma şaraplarından *Lactobacillus brevis* ve *Leuconostoc mesenteroides* türleriyle beraber potansiyel olarak izole edilen BA üreticisi olarak tespit edilmişlerdir (Coton ve ark., 2010)

Kadaverin ise; lizin dekarboksilaz enzimine sahip mikroorganizmaların serbest lizini kadaverine çevirmesi sonucu oluşmaktadır. Histamin toksisitesini artırıcı özelliği olmasına rağmen tek başına toksik özellik gösteremeyen bir biyojen amindir. *Enterobacteriaceae* sayısının yüksek olduğu peynir örneklerinde kadaverin konsantrasyonu daha yüksektir. Kadaverin konsantrasyonu ile *Enterobacteriaceae* sayısı arasındaki korelasyon nedeni ile bu biyojen amin, hijyenik peynir yapımı kalite indikatörü olarak kullanılabilir (Schneller, 1997; Marino, 2000).

Genel olarak biyojen amin toksisitesi ile ilgili kesin limitler vermek oldukça zordur. Tüketilen gıdanın çeşidi, miktarı ve amin içeriği gibi faktörler ile inhibitörlerin varlığı biyojen amin toksisitesi limitlerinin belirlenmesini güçleştirmektedir. Buna karşılık gıdalarda bulunabilecek histamin miktarıyla ilgili sınır değerler 10-100 mg/100g olarak belirlenmiştir. Toksikasyonun başladığı eşik değerleri tiramin için 100-800 mg/kg olarak bildirilmektedir. Tiramin düzeyinin 10 mg/L' den fazla olmasının MAO inhibitörü ilaçlar alan hastalar için güvenli olmadığı belirtilmektedir (Izquierdo ve ark., 1996).

1.5. Çalışmanın Amacı

İnsan ve hayvan vücudunda biyolojik olarak önemli olan biyojen aminler, fazla miktarda alındıklarında herhangi bir nedenden dolayı büyük konsantrasyonlarda oluştuklarında veya organizmadaki indirgenmeleri engellendiğinde toksik etkileri sebebiyle sağlığı tehlikeye sokabilmektedirler. Bu nedenle gıda güvenliğini kontrol altına almadaki en önemli etkenlerden olan limit değerlerinin belirlenmesi çok büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, yoğurtlardan izole edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* suşlarında bulunan, histamin, tiramin, kadaverin ve pütresin olmak üzere dört biyojen aminin üretim potansiyellerinin moleküler olarak belirlenmesi ve HPLC yöntemi ile mg/L cinsinden limit değerlerinin ölçülmesi hedeflenmiştir. HPLC ile miktar olarak belirlenen sonuçlar ile moleküler sonuçlar arasında bir ilişki araştırılmıştır. Moleküler sonuçların gıda güvenliği açısından erken tespit için kullanılıp toksisiteyi en aza indirmek amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Steidlova ve Kala (2002) 113 adet mısır silajında 7 biyojen amin tespiti yapmışlardır. Biyojen aminler misel elektrokinetik kapiler kromatografi ile N-benzamidler ile ölçülmüştür. Tiramin, pütresin, kadaverin ve spermidinin tüm örneklerde olmasına rağmen triptamin, spermin ve histamin çok düşük düzeyde ve silajların bir parçasında rastlanmıştır. Ortalama tiramin, pütresin, kadaverin ve spermidin içeriği sırasıyla 482, 98, 48 ve 17 mg /kg olarak gözlenmiştir.

Marcobal ve arkadaşları (2004) gıdalardaki Histamin, Tiramin ve Ornitin üreten laktik asit bakterilerinin eş zamanlı tespitlerinde kullanılan multiplex polimeraz zincir reaksyonunun incelenmesi, bu metodu tanımlayan ilk yaklaşımdır. Fermente gıdalarda Histamin, Tiramin ve Ornitin üreten LAB soyunun eş zamanlı tespitinde kullanılan çoklu polimeraz zincir reaksiyonu analizleri hakkında üç çift primer tasarlamışlar ve en uygun koşullarda Histidin dekarboksilazlardan 367 bç, Tirozin dekarboksilazlardan 924 bç ve Ornitin dekarboksilazlardan 1446 bç DNA fragmenti üretmişlerdir. Amaçlanan mikroorganizmaların DNA'ları aynı tepkimeye konulduğunda farklı iki ya da daha fazla boyuta karşılık gelen çoğalmalar tespit edilmiştir. Bu analizin kontrollü koleksiyon cinslerindeki amin üreten bakterilerin tespitinde ve LAB koleksiyonunda faydalı olduğu ve LAB'nin bu biyojen aminleri üretmeyen cinslerin DNA'sında hiçbir ayrıntı gözlenmediği bildirilmektedir. Bu çalışmada öncül LAB'ın doğru seçilmesinde yapılan rutin taramalarda ve gıda içi kontrol laboratuvarlarına kolaylıkla dahil edilebileceği bildirilmektedir.

Marcobal ve arkadaşları (2005) LAB' nin iki suşu *L. brevis* CECT 4669 ve *E. faecium* BIFI-58' in hücre büyümesi ve beş fizikokimyasal faktörlerin etkisi (inkübasyon sıcaklığı ve süresi, çevre pH' ı ve tirozin konsantrasyon eklenmesi, piridoksal-5-fosfat (PLP) takviyesi) tiramin üretimi için aerobik ve anaerobik koşullar altında incelenmiştir. pH en yüksek katkıyı *E. faecium*' da gösterirken, inkübasyon süresi *L. brevis*' in büyümesinde önemli değişiklik göstermiştir. Tiramin üretimine ise tirozin konsantrasyonu ve inkübasyon süresi bağlı olmuştur. Öngörülen MLR modelinin de *Lactobacillus brevis* CECT 4669 ve *Enterococcus faecium* BIFI-58' in büyümelerine ve tiramin üretimine maksimum yanıt verdiği ve iki suş için bu modelin yüksek tirozin konsantrasyonunun varlığında asidik pH' da (4.4) anaerobik koşulda etkili olduğu tespit edilmiştir.

Landete ve ark. (2006) şaraplardan izole edilen çeşitli asetik asit bakterileri, maya bakterileri ve laktik asit bakterilerinde biyojen amin tespiti yapılmıştır. LAB grubu içerisinde bulunan 155 adet *Lactobacillus* ssp., *O.oeni* ve *Pediococcus* ssp. türlerinde tiramin (*tdc*), histamin (*hdc*) ve pütresin (*odc*) genleri tespit edilmiştir.

Burdychova ve Komprada (2007) Hollanda tipi yarı sert peynirde olgunlaşma süresince BA üretimi için starter kültür kaynaklı tür olarak 13 adet *Enterococcus* ve 3 adet *Lactobacillus* cins türleri izole edilmiştir. PCR yöntemi ile tiramin (*trydc*) ve histamin (*hdc*) dekarboksilaz enzimlerini kodlayan spesifik DNA dizilerinin varlığı tespit edilmiş ve bu HPLC yöntemiyle doğrulanmıştır. *Enterococcus*'larda tiramin ve histamin dizi karşılaştırılmasında %89 *Lactobacillus*'larda ise %99 oranında benzerlik tespit edilmiştir. *Enterococcus* cinsinden *E. durans* türünden 7 adet, *E. faecalis* türünden 3 adet, *E. faecium* türünden 1 adet, *E. casseliflavus* türünden 3 adet, *L. curvatus*, *L. lactis* ve *L. helveticus* türlerinden 1'er adet izole edilmiş ve bunlardan sadece *E. durans* türünde tiramin üretimi gözlenmemiştir.

Li Zhijunli ve ark. (2007) Çin' de üretilen kırmızı şarabın 38 örneğinde 8 adet BA analiz edilmiştir. Bu analiz floresans dedektör ve dansil klorür precolumn türetme ile ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografi ile yürütülmüştür. Örneklerin hiçbirinde triptamin rastlanmamasına rağmen pütresin örneklerin hepsinde % 100 olarak tespit edilmiştir ve bunlar sırasıyla feniletiamin için % 84.2, spermidin için % 60.5, histamin için % 57.8, tiramin için % 57.8, kadaverin için % 47.4 ve spermin için bu değer %36.8 olarak tespit edilmiştir. Tüm örneklerde toksik etkileri olan aromatik ve heterosiklik amin düzeyleri sırasıyla feniletiaminde 0-4.58 mg/l, histaminde 0-10.51 mg/l ve tiraminde 0-9.13 mg/l oranında belirlenmiştir. Sağlık koşulları ile ilişkili amin düzeyleri ise pütresinde 0-19.01 mg/l, kadaverinde 0-12-.98 mg/l, spermin ve spermidin gibi diğer aminlerin seviyesi oldukça düşük olması halinde bunlar sırasıyla 0-3.82 ve 0-2.64 mg/l olarak belirlenmiştir.

Yongmei ve ark. (2008) Çin soya sosunun farklı 40 örneğinde BA içeriği dansil klorür ile ön sütun türevlendirmesinden sonra HPLC kullanılarak belirlenmiş ve bu örneklerin amino azot düzeyleri ve pH değerleri karşılaştırılmıştır. Çalışma kapsamında beş biyojen amin içerisinden tiraminin en yaygın amin olduğu gözlenmiş ve örneklerin % 97.5' inde tespit edilmiştir. Bunlarda aynı şekilde örneklerde spermidin % 95, histamin %92.5, kadaverin %82.5 ve spermin %80 oranında tespit edilmiştir. Bu örneklerde beş BA için toplam içerik 497 mg/l ile 41.7 mg/l ve 1357 mg/l aralığında bir dizi olarak belirlenmiştir.

Victor Ladero (2010) İspanya ve Fransa’ da piyasada bulunan 43 doğal elma şarabındaki BA içeriği tespit etmişlerdir. Şaraptaki BA üreticilerinin kantitatif tespiti için qPCR araçları geliştirilmiş ve BA içerik ve BA üreten mikroorganizmaların varlığı arasında iyi bir bağlantı gözlenmiştir. Elma şarabında farklı bir profil ve BA konsantrasyonu varlığı gözlenmiştir. Özellikle potansiyel olarak histamin ve pütresin üreten *Lactobacillus paracollinoides* suşu elma şarabından izole edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Tez çalışması Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmanın temel kimyasalları aksi belirtilmedikçe, Merck (Almanya) ve Sigma (Almanya) grubundan; moleküler biyoloji sarf malzemeleri Fermentas (USA), Promega (UK)' dan temin edilmiştir.

3.1.2. Laktik Asit Bakterileri

Bu tez çalışmasında kullanılan *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* bakteri suşları Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. 118 adet *S. thermophilus* ve 32 adet *L. bulgaricus* suşu olmak üzere toplam 150 izolat bu çalışmada kullanılmış ve Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* bakteri türleri.

BGML İzolat Numaraları	İzolat Türü
BGML 1	<i>S. thermophilus</i>
BGML 2	<i>S. thermophilus</i>
BGML 3	<i>S. thermophilus</i>
BGML 4	<i>S. thermophilus</i>
BGML 5	<i>S. thermophilus</i>
BGML 6	<i>S. thermophilus</i>
BGML 7	<i>S. thermophilus</i>
BGML 8	<i>S. thermophilus</i>
BGML 9	<i>S. thermophilus</i>
BGML 10	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 11	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 12	<i>S. thermophilus</i>
BGML 13	<i>S. thermophilus</i>
BGML14	<i>S. thermophilus</i>
BGML 15	<i>S. thermophilus</i>
BGML 16	<i>S. thermophilus</i>
BGML 17	<i>S. thermophilus</i>
BGML 18	<i>S. thermophilus</i>
BGML 19	<i>S. thermophilus</i>
BGML 20	<i>S. thermophilus</i>
BGML 21	<i>S. thermophilus</i>
BGML 22	<i>S. thermophilus</i>
BGML 23	<i>S. thermophilus</i>
BGML 24	<i>S. thermophilus</i>
BGML 25	<i>S. thermophilus</i>
BGML 26	<i>S. thermophilus</i>

Çizelge 3.1. (devam)

BGML İzolat Numaraları	İzolat Türü
BGML 27	<i>S. thermophilus</i>
BGML 28	<i>S. thermophilus</i>
BGML 29	<i>S. thermophilus</i>
BGML 30	<i>S. thermophilus</i>
BGML 31	<i>S. thermophilus</i>
BGML 32	<i>S. thermophilus</i>
BGML 33	<i>S. thermophilus</i>
BGML 34	<i>S. thermophilus</i>
BGML 35	<i>S. thermophilus</i>
BGML 36	<i>S. thermophilus</i>
BGML 37	<i>S. thermophilus</i>
BGML 38	<i>S. thermophilus</i>
BGML 39	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 40	<i>S. thermophilus</i>
BGML 41	<i>S. thermophilus</i>
BGML 42	<i>S. thermophilus</i>
BGML 43	<i>S. thermophilus</i>
BGML 44	<i>S. thermophilus</i>
BGML 45	<i>S. thermophilus</i>
BGML 46	<i>S. thermophilus</i>
BGML 47	<i>S. thermophilus</i>
BGML 48	<i>S. thermophilus</i>
BGML 49	<i>S. thermophilus</i>
BGML 50	<i>S. thermophilus</i>
BGML 51	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 52	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 53	<i>S. thermophilus</i>
BGML 54	<i>S. thermophilus</i>

Çizelge 3.1. (devam)

BGML İzolat Numaraları	İzolat Türü
BGML 55	<i>S. thermophilus</i>
BGML 56	<i>S. thermophilus</i>
BGML 57	<i>S. thermophilus</i>
BGML 58	<i>S. thermophilus</i>
BGML 59	<i>S. thermophilus</i>
BGML 60	<i>S. thermophilus</i>
BGML 61	<i>S. thermophilus</i>
BGML 62	<i>S. thermophilus</i>
BGML 63	<i>S. thermophilus</i>
BGML 64	<i>S. thermophilus</i>
BGML 65	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 66	<i>S. thermophilus</i>
BGML 67	<i>S. thermophilus</i>
BGML 68	<i>S. thermophilus</i>
BGML 69	<i>S. thermophilus</i>
BGML 70	<i>S. thermophilus</i>
BGML 71	<i>S. thermophilus</i>
BGML 72	<i>S. thermophilus</i>
BGML 73	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 74	<i>S. thermophilus</i>
BGML 75	<i>S. thermophilus</i>
BGML 76	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 77	<i>S. thermophilus</i>
BGML 78	<i>S. thermophilus</i>
BGML 79	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 80	<i>S. thermophilus</i>
BGML 81	<i>S. thermophilus</i>
BGML 82	<i>L. bulgaricus</i>

Çizelge 3.1. (devam)

BGML İzolat Numaraları	İzolat Türü
BGML 83	<i>S. thermophilus</i>
BGML 84	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 85	<i>S. thermophilus</i>
BGML 86	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 87	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 88	<i>S. thermophilus</i>
BGML 89	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 90	<i>S. thermophilus</i>
BGML 91	<i>S. thermophilus</i>
BGML 92	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 93	<i>S. thermophilus</i>
BGML 94	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 95	<i>S. thermophilus</i>
BGML 96	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 97	<i>S. thermophilus</i>
BGML 98	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 99	<i>S. thermophilus</i>
BGML 100	<i>S. thermophilus</i>
BGML 101	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 102	<i>S. thermophilus</i>
BGML 103	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 104	<i>S. thermophilus</i>
BGML 105	<i>S. thermophilus</i>
BGML 106	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 107	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 108	<i>S. thermophilus</i>
BGML 109	<i>S. thermophilus</i>
BGML 110	<i>S. thermophilus</i>

Çizelge 3.1. (devam)

BGML İzolat Numaraları	İzolat Türü
BGML 111	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 112	<i>S. thermophilus</i>
BGML 113	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 114	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 115	<i>S. thermophilus</i>
BGML 116	<i>S. thermophilus</i>
BGML 117	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 118	<i>S. thermophilus</i>
BGML 119	<i>S. thermophilus</i>
BGML 120	<i>S. thermophilus</i>
BGML 121	<i>S. thermophilus</i>
BGML 122	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 123	<i>S. thermophilus</i>
BGML 124	<i>L. bulgaricus</i>
BGML125	<i>S. thermophilus</i>
BGML 126	<i>S. thermophilus</i>
BGML 127	<i>S. thermophilus</i>
BGML 128	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 129	<i>S. thermophilus</i>
BGML 130	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 131	<i>S. thermophilus</i>
BGML 132	<i>S. thermophilus</i>
BGML 133	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 134	<i>S. thermophilus</i>
BGML 135	<i>S. thermophilus</i>
BGML 136	<i>L. bulgaricus</i>
BGML 137	<i>S. thermophilus</i>
BGML 138	<i>S. thermophilus</i>

Çizelge 3.1. (devam)

BGML İzolat Numaraları	İzolat Türü
BGML 139	<i>S. thermophilus</i>
BGML 140	<i>S. thermophilus</i>
BGML 141	<i>S. thermophilus</i>
BGML 142	<i>S. thermophilus</i>
BGML 143	<i>S. thermophilus</i>
BGML 144	<i>S. thermophilus</i>
BGML 145	<i>S. thermophilus</i>
BGML 146	<i>S. thermophilus</i>
BGML 147	<i>S. thermophilus</i>
BGML 148	<i>S. thermophilus</i>
BGML 149	<i>S. thermophilus</i>
BGML 150	<i>S. thermophilus</i>

3.2. Metot

3.2.1. Bakteriye besiyerinin hazırlanması ve inkübasyon koşulları

Streptococcus thermophilus suşları SM17 besiyerinde büyütülmüştür. 1000 ml saf su içerisinde 42,5 g M17 (Terzaghi ve Sandine, 1975) ve %1 (w/v) sükröz eklenerek sıvı besi ortamı hazırlanmıştır. Katı SM17 hazırlamak için besiyerine %1,5 agar ilave edilmiştir. *S. thermophilus* suşları 42 °C’de kültüre alınmıştır (Nüve EN110).

Lactobacillus bulgaricus suşları MRS besiyerinde büyütülmüştür. 62,8 g MRS Agar besiyeri 1000 ml saf su içerisinde çözündürülüp katı besi ortamı hazırlanmıştır. Sıvı besiyeri ise 1000 ml saf su içerisinde 62,8 g MRS broth çözündürülerek hazırlanmıştır. *L. bulgaricus* suşları 37 °C’de kültüre alınmıştır (Nüve EN110).

Hazırlanan SM17 ve MRS besiyerleri 121 °C’de 10 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Çalışmada kullanılan M17 ve MRS besi ortamlarının kimyasal içerikleri Çizelge 3.2 ve 3.3’ te verilmiştir.

Çizelge 3.2. Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan M17 besi ortamının kimyasal içeriği.

M17 BROTH (Merck)	Kimyasallar	Miktar (gr/l)
	Bacto tripton	5
	Bacto soyton	5
	Et özütü	5
	Maya özütü	2.50
	Askorbik asit	0.50
	Magnezyum sülfat	0.25
	Disodyum-β-gliserol-fosfat	19

Çizelge 3.3. Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan MRS besi ortamının kimyasal içeriği.

MRS BROTH (Merck)	Kimyasallar	Miktar (gr/l)
	Pepton	10
	Et özütü	8
	Maya özütü	4
	Glikoz	20
	Potasyum hidrojen fosfat	2
	Diamonyum hidrojen fosfat	2
	Sodyum asetat	5
	Mağnezyum sülfat	0.2

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR işlemi toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için; 2.5 µl buffer (10X) [500 mM Tris-HCl (25°C’de pH 8,0), 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT], 1 µl dNTP (1 mM), ileri ve geri primerlerden 1’er µl (20 pmol), 0,5 µl DNA polimeraz (5 u/µl) [25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT ve %50 (v/v) gliserol], 1 µl kalıp DNA (~400 ng/ml) ve 25 µl’ye tamamlamak üzere 18 µl dH₂O ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Primerlerin yapışma sıcaklıklarının hesaplanması ve dizi uygunlukları internet tabanlı program (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>) ile yapılmış ve daha sonra ticari firmalardan sipariş edilmiştir (İontek, İstanbul). Polimeraz zincir reaksiyonu işleminde, 94 °C DNA’nın denatürasyonu, 55 °C primerlerin yapışması, 72°C de uzama sıcaklığı olarak ayarlanmıştır ve PZR 35 döngü olarak yapılmıştır. Çalışmada kullanılan biyojen amin primerlerin detayları Çizelge 3.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* türlerinin biyojen amin üretme kapasitelerinin belirlenmesi için tasarlanan primerlerin nükleotid dizileri.

Gen ve BA	Primer adı	Dizilim (5'→3')	Uzunluk (bç)	Referans
<i>hdc</i> <i>Histamin</i>	HDC3 HDC4	AGATGGTATTGTTTCTTATG AGACCATACACCATAACCTT	435	Coton ve Coton (2005)
<i>tdc</i> <i>Tiramin</i>	TDC1 TDC2	CACGTTGACGCTGCTTACGGTGG ACATATCCCATCTTATGTGGATC	720	Fernández ve ark. (2004)
<i>ode</i> <i>Ornitin</i>	ODC1 ODC2	GTTTTCAACGCTGACAAACTTACTTCGT ATTGAATTTAGTTCACATTCTCTGG	972	Marcobal ve ark. (2005)
<i>ldc</i> <i>Lizin</i>	CAD2F CAD2R	CACATACCAGGACACAA GGTATACCAGGAGGATA	1098	De las Rivas ve ark. (2006, 2007)

3.2.3. DNA'nın Jel Elektrofrez

Agaroz jel hazırlamak üzere; %1 oranında agaroz, 1X Tris, Borik asit, EDTA (TBE) tampon çözeltisinde [1000 ml TBE (1X) tampon çözeltisi hazırlamak için; 5,5 g Borik asit, 10,8 g Trizma base ve EDTA (500 mM) çözeltisinden 4 ml eklenerek 1000 ml saf su ile karıştırılır] çözdürülmüştür. Analiz edilecek DNA örnekleri 1/5 (loading buffer/DNA) oranında yükleme solüsyonu [10 ml DNA loading buffer için; 0,025 mg bromophenol blue, %40 sükröz ve 2,5 ml EDTA (100 mM) (pH 8,0)] eklenerek yüklemeye hazırlanmıştır. λ DNA 100 baz çiftlik ya da 1000 baz çiftlik DNA markörleri (Favorgen) kullanılmıştır. Elektrofrez tankında (ATTO Corporation), jel 100 volt ve 500 mA'da koşturulmuştur. Koşturulan agaroz jel Et-Br (0,5 μ g/ml) ile 20 dakika boyanmıştır. DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.2.4. Bakterilerin stoklanması

Bakteriler kısa süreli stoklamalar için %15'lik gliserol içerisine alınarak -20°C'de saklanmıştır. Uzun süreli saklama ise, besiyerinde 16 saat büyütülen bakterilerden 200 μ l alınarak 12.000 rpm (14,515 g)'de 3 dakika çöktürülerek supernatant kısmının uzaklaştırılması ve peletlerin %30 gliserol içeren MRS veya SM17 besi yerinde çözdürüp, şok soğutma ile -80°C'de gerçekleştirilmiştir.

3.3. Örneklerin HPLC Analiz

3.3.1. HPLC Standartlarının Oluşturulması

HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) analizleri SPD-M20A diode array detektöre, iki kanallı gradient pompaya (Shimadzu LC-10AT), autosampler (SIL 20AC), kolon fırını (CTO-20AC), FCV-11AL dalga birimli bir communication bus module (CBM-20A) sahip Shimadzu Prominence HPLC cihazı (Shimadzu, Kyoto, Japan) ile gerçekleştirilmiştir. Metabolitler için Capcell Pak 5 μ C18 MG, 150X4.6 kolonu (Phenomenex, Macclesfield, Cheshire, UK) kullanılmıştır.

HPLC sistemi için standartlar sodyum pirüvat (10 mg/ml); sodyum laktat (10 mg/ml); sodyum format (10 mg/ml); sodyum asetat (10 mg/ml) ve asetoin (10 mg/ml) GM17 besiyerinde hazırlanmıştır. Oluşan piklerin yükseklik ve alan hesapları PC1000 kromatografik analiz sistemi ile (Thermo Separation Products) yapılmıştır.

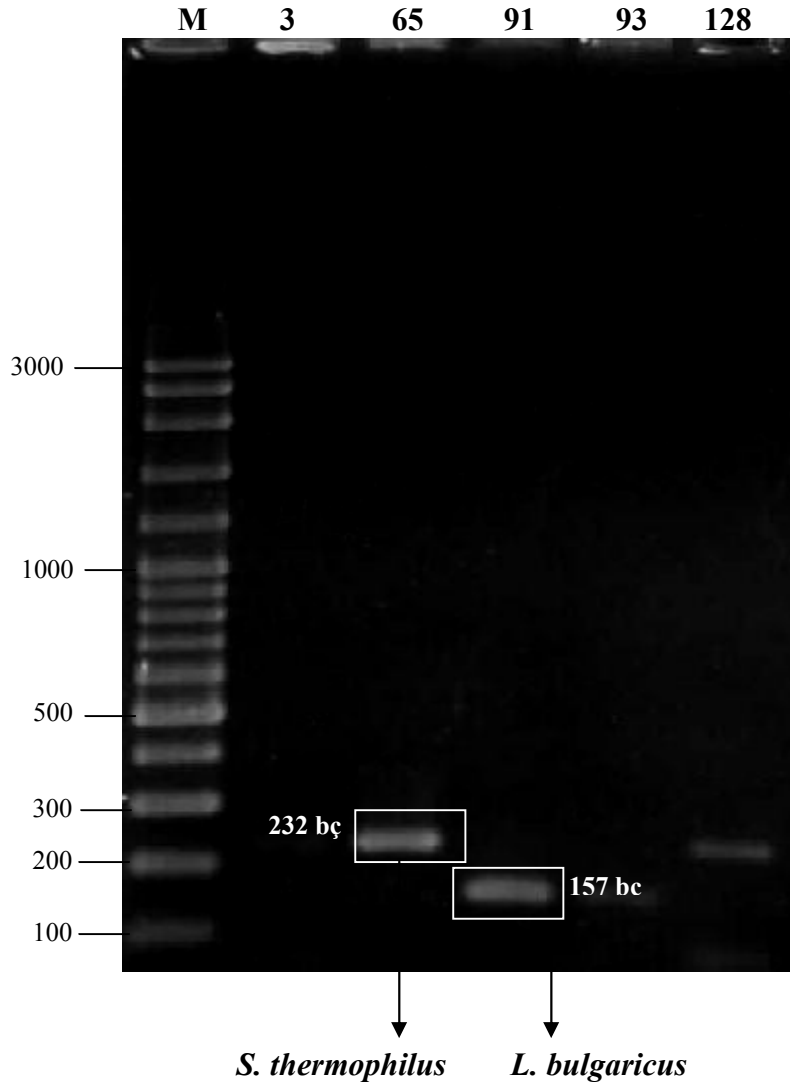
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Biyojen aminlerin belirlenmesi için kromatografi, florimetri, kapiler elektroforez v.b. teknikler kullanılmaktadır. Bunların içerisinde kromatografik yöntemler en uygun yöntemlerdir. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC) ve gaz-sıvı kromatografisi (GLC) BA analizlerinde yoğun bir şekilde kullanılan kromatografik yöntemlerdir (Shakila ve ark., 2001). Bu çalışmada biyojen amin içeriği Landete, Ferrer ve Polo tarafından önerilen HPLC tekniği ile belirlenmiştir (Landete ve ark., 2005).

4.1. İzolat Türlerinin Teyit Edilmesi

Yoğurttan daha önce izole edilmiş 115 adet farklı *S. thermophilus* ve 35 adet farklı *L. bulgaricus* suşları -20 °C'de muhafaza halinden alınıp canlandırma işlemine tabi tutulmuş, ardından ekimleri *S. thermophilus* suşları için SM17 ve *L. bulgaricus* suşları için MRS besiyerlerine yapılarak büyüme sıcaklıklarına göre saf halde geliştirilmişlerdir. İzole edilen *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* türlerinin moleküler tanımlamalarının teyidi 16S rRNA gen bölgesi dizileri kullanılarak yapılmıştır. Primerler *L. bulgaricus* türü için 232 bç *S. thermophilus* türü için 157 bç bölgeyi çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır. *L. bulgaricus* ileri primeri LbF 5'→3' yönünde ACGCTGAAGAGAGGAGCTTG, geri primeri ise LbR 5'→3' yönünde GCAATTGCCCC-TTTCAAATA nükleotid diliminde tasarlanmıştır. *S. thermophilus* ileri primeri StF 5'→3' yönünde TCAAAGATTCCTTCGGGATG, geri primeri ise StR 5'→3' yönünde TACGCATCATTGCCTTGGTA nükleotid diziminde tasarlanmıştır. PCR işlemi 95 °C'de 4 dk. İlk ayrıştırma ile başlatılmış daha sonra 35 döngü olmak üzere 94 °C'de 1 dk. denatürasyon, primerler için uygun yapışma sıcaklığında (60 °C) 1 dk. ve 72 °C'de uygun sentez zamanı boyunca gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 1' lik jel hazırlanarak, elektroforeze yüklenmiş PCR ile çoğaltılan bölgeler UV ışığı altında gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır. İzolatlardan 39, 65 ve 128 *L. bulgaricus* 91 ve 93 *S. thermophilus* olmak üzere Şekil 4.1' de verilmiştir.

Şekil 4.1. İzolatların PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.



4.2. Biyojen Amin Üretim Potansiyellerinin Tespiti

Moleküler tanımlaması teyit edilen koloniler kullanılarak *hdc*, *tdc*, *odc* ve *ldc* gen bölgeleri spesifik primerler kullanılarak PZR tekniği ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan genlerin %1' lik agaroz jeldeki görüntüleri elde edilmiştir. Genetik olarak biyojen amin üretme potansiyeli olan izolatların biyojen amin üretimleri HPLC analizi uygulanarak, histamin, tiramin, pütresin ve kadaverin miktarlarının ortalama değerleri mg/L (mg/kg) olarak tespit edilmiştir. Böylece biyojen amin üretme kapasitelerinin moleküler olarak tespiti yapılmış olup, türler ve farklı biyojen aminler arasında farklılık gözlenmiştir.

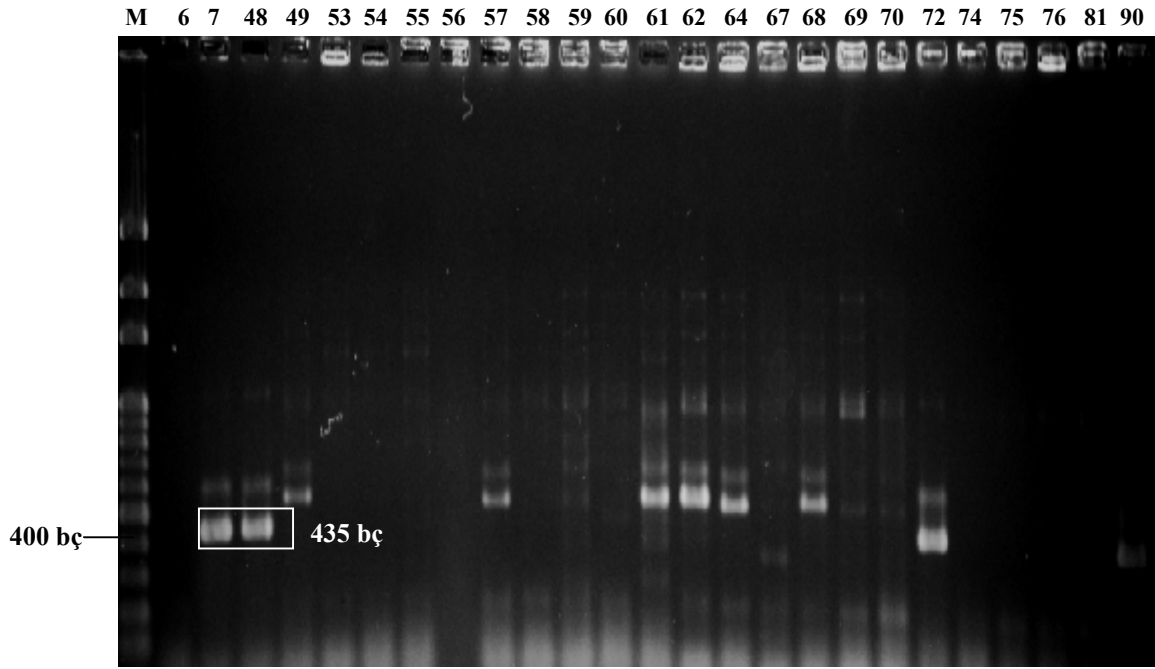
4.2.1. Histamin Üretiminin Moleküler ve Enstrümental İncelenmesi

Histamin üretimi *hdc* geninin HDC3 ve HDC4 primerleri ile çoğaltılarak 435 bç. uzunluğundaki bölgenin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Şekil 4.2' de ise 7, 48, 49, 57, 61, 62, 64, 68, 72 ve 90 numaralı izolatların histamin ürettiği fakat sadece 7, 48 ve 72 nolu izolatların istenilen uzunluklarda bant gösterdiği gözlenmiş, diğer izolatların ise yapışma sıcaklıklarının farkından dolayı bant boylarında değişiklik göstermiştir.

Şekil 4.2' de 91, 93, 99, 116, 118, 125, 131, 138, 139, 140, 143, 144, 145, 146 ve 147 numaralı *S. thermophilus* izolatlarının *hdc* genini içerdiği ve 435 bç bant uzunluğunda olduğu gözlemlenmiştir. Bu izolatlar histidini dekarboksile etme yeteneğine sahip olup histamin üretebildiğini göstermiştir.

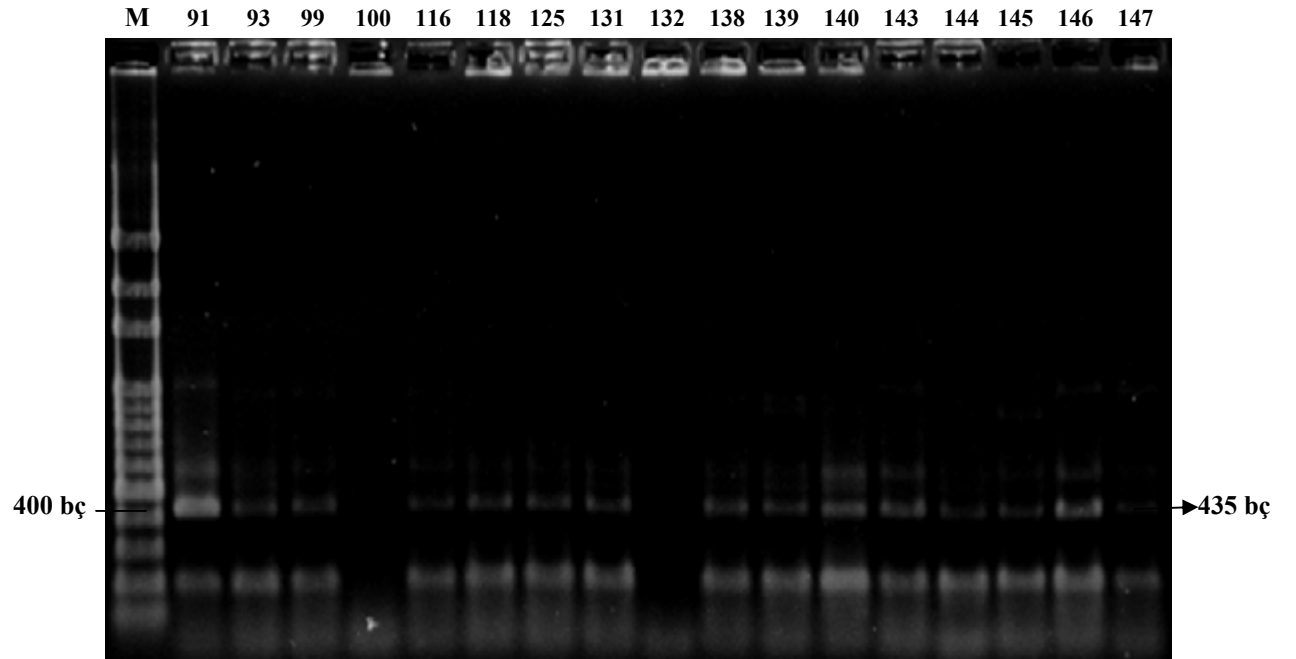
Şekil 4.2. Koloni PZR ile histidin (*hdc*) geninin çoğaltılmış ve %1'lik agaroz jel görüntüsü.

M; 100 bç markör (Favorgen)



Şekil 4.2. (devam) Koloni PZR ile histidin (*hdc*) geninin çoğaltılmış ve %1'lik agaroz jel

görüntüsü. M; 100 bç markör (Favorgen)



Çizelge 4.1. SM17 Histidin besi ortamında geliştirilen bazı *S. thermophilus* izolatlarının ürettiği Histamin miktarlarının HPLC ile belirlenmesi.

İzolat Numarası	Biyojen Amin miktarı (mg/L)
BGML 7 (St)	1881.93
BGML 48 (St)	1339.92
BGML 49 (St)	0.58
BGML 57 (St)	15.26
BGML 61(St)	0.51
BGML 62 (St)	0.70
BGML 64 (St)	0.54
BGML 68 (St)	12.17
BGML 72 (St)	9806.21
BGML 90 (St)	6974.67
BGML 91 (St)	12.62
BGML 93 (St)	3590.72
BGML 99 (St)	28.14
BGML 116 (St)	5.05
BGML 118 (St)	12.15
BGML 119 (St)	21.66
BGML 131 (St)	4.26
BGML 138 (St)	-
BGML 139 (St)	20.365
BGML 140 (St)	3.34

Yapılan HPLC analizine göre (çizelge 4.1) histidin eklenmiş SM17 besi ortamında geliştirilen 7 numaralı izolatın histamin üretim miktarlarındaki ortalama değeri 1881.93 mg/L olup, bunlar sırasıyla; 48 numaralı izolat için 1339.92 mg/L, 49 numaralı izolat için 0.58 mg/L, 57 numaralı izolat için 32.31 mg/L, 61 numaralı izolat için 0.51 mg/L, 62 numaralı izolat için 0.70 mg/L, 64 numaralı izolat için 0.54 mg/L, 68 numaralı izolat için 12.17 mg/L, 72 numaralı izolat için 9806.21 mg/L, 90 numaralı izolat için 6974.67 mg/L, 93 numaralı izolat için 3590.72 mg/L, 119 numaralı izolat için 21.66 mg/L, 121 numaralı izolat için 10.21 mg/L, 123 numaralı izolat için 14.06 mg/L, 125 numaralı izolat için 19.06

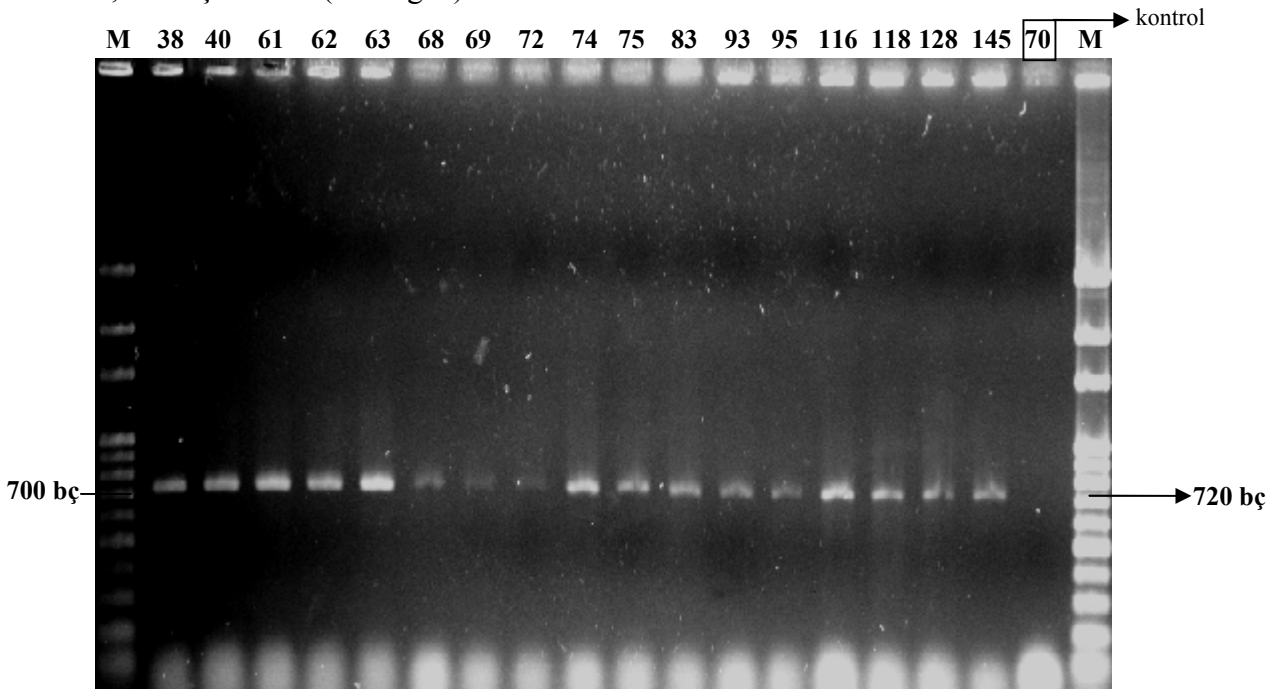
mg/L, 134 numaralı izolat için 359.60 mg/L, 138 numaralı izolat için 0 mg/L, histidin eklenmiş MRS besi ortamında geliştirilen 89 numaralı izolatın histamin üretim miktarlarındaki ortalama değeri ise 1.55 olarak tespit edilmiştir.

4.2.2. Tiramin Üretiminin Moleküler ve Enstrümental İncelenmesi

Şekil 4.3' te 38, 40, 61, 62, 63, 68, 69, 72, 74, 75, 83, 93, 95, 116, 118, 128 ve 145 numaralı *S. thermophilus* ve 128 numaralı *L. bulgaricus* izolatlarının yapılan koloni PZR sonucunda, *tdc* geninin 720 bç uzunluğunda bant verdiği gözlemlenmiştir. Bu izolatların tirozini dekarboksile edip tiramini meydana getirdiğini göstermektedir. 70 numaralı izolatın *tdc* genini içermediği ise kontrol grubu olarak tespit edildiği Şekil 4.3' te gösterilmiştir.

Lactococcus lactis ssp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarının tirozini dekarboksile ederek tiramini ürettiği bilinmektedir (Bunkova ve ark., 2009). Aynı şekilde Marino ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada *Streptococcus thermophilus*' un tiramini ürettiğini bulmuştur. Bu çalışmada şekil 4.3' te gösterilen izolatların çoğu *S. thermophilus* suşuna ait olup bunun yanısıra 128 numaralı *L. bulgaricus* izolatının tiramin üretme kapasitesine sahip olduğu bu literatürle desteklenebilir.

Şekil 4.3. Koloni PZR ile tirozin (*tdc*) geninin çoğaltılmış ve %1'lik agaroz jel görüntüsü. M; 100 bç markör (Favorgen)



Çizelge 4.2. SM17 ve MRS Tirozin besi ortamında geliştirilen bazı *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* izolatlarının ürettiği Tiraminin miktarının HPLC ile belirlenmesi.

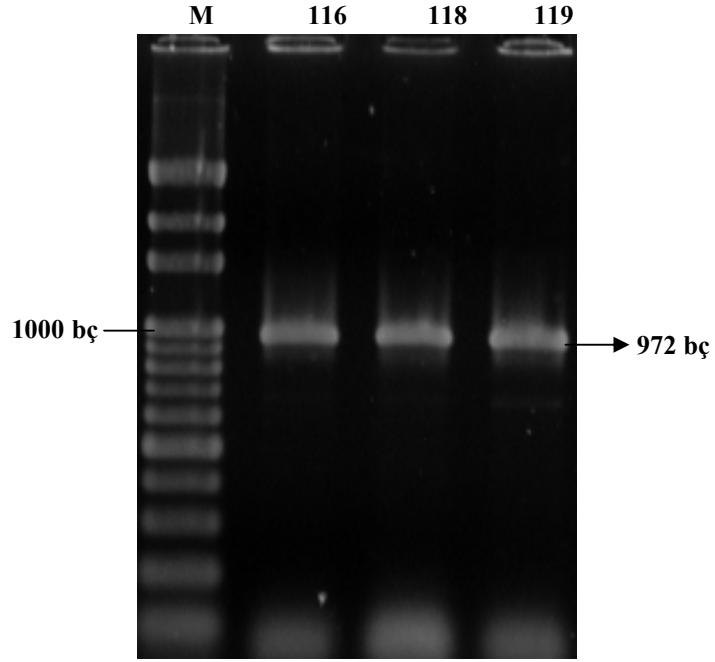
İzolat Numarası	Biyojen Amin miktarı (mg/L)
BGML 38 (St)	347.18
BGML 40 (St)	31.85
BGML 61 (St)	6512.59
BGML 62 (St)	10.45
BGML 63 (St)	6235.08
BGML 68 (St)	5906.61
BGML 69 (St)	634.25
BGML 72 (St)	5575.52
BGML 74 (St)	51.11
BGML 75 (St)	2.38
BGML 83 (St)	443.57
BGML 93 (St)	338.73
BGML 95 (St)	241.34
BGML 116 (St)	5.05
BGML 118 (St)	12.15
BGML 128 (Lb)	70.49
BGML 145 (St)	3871.46

Yapılan HPLC analizine göre çizelge 4.2’de de gösterildiği gibi; tirozin eklenmiş SM17 besi ortamında geliştirilen 38 numaralı izolatın tiramin üretim miktarlarındaki ortalama değeri 347.18 mg/L olup bunlar sırasıyla 40 numaralı izolat için 31.85 mg/L, 61 numaralı izolat için 6512.59 mg/L, 62 numaralı izolat için 10.45 mg/L, 63 numaralı izolat için 6235.08 mg/L, 68 numaralı izolat için 5906.61 mg/L, 69 numaralı izolat için 634.25 mg/L, 70 numaralı izolat için 1.91 mg/L, 72 numaralı izolat için 5575.72 mg/L, 74 numaralı izolat için 51.11 mg/L, 75 numaralı izolat için 2.38 mg/L, 83 numaralı izolat için 443.57 mg/L, 93 numaralı izolat için 338.73 mg/L, 95 numaralı izolat için 241.34 mg/L, 116 numaralı izolat için 6.888 mg/L, 118 numaralı izolat için 23.30 mg/L, 145 numaralı izolat için 3871.47 mg/L’ dir. Tirozin eklenmiş MRS besi ortamında geliştirilen 128 numaralı izolatın tiramin üretim miktarlarındaki ortalama değeri ise 70.50 mg/L olarak belirlenmiştir.

4.2.3. Pütresin Üretiminin Moleküler ve Enstrümental İncelenmesi

Şekil 4.4’ de 116, 118 ve 119 numaralı *S. thermophilus* izolatların yapılan koloni PZR sonucunda, *odc* geninin 972 bç uzunluğunda bant verdiği gözlemlenmiştir. Bu da *S. thermophilus*’ a ait izolatların ornitini dekarboksile edip pütresini meydana getirdiğini göstermiştir.

Şekil 4.4. Koloni PZR ile ornitin (*odc*) geninin çoğaltılmış ve %1’lik agaroz jel görüntüsü. M; 100 bç markör (Favorgen)



Çizelge 4.3. SM17 Ornitin ortamında geliştirilen bazı *S. thermophilus* izolatlarının ürettiği Pütresinin HPLC analizlerine göre elde edilen ortalama değerleri.

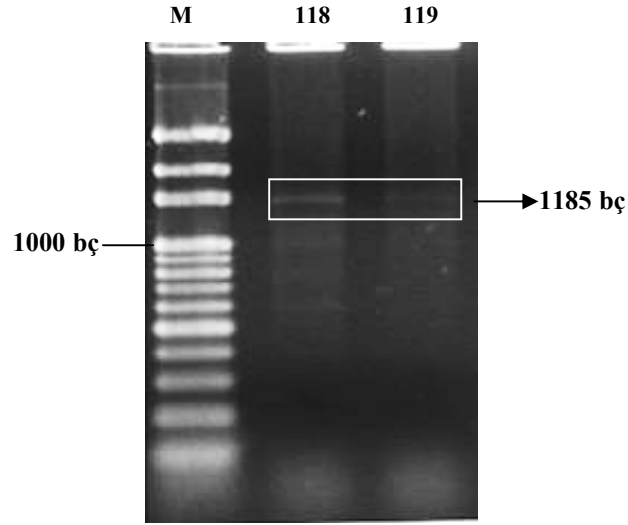
İzolat Numarası	Biyojen Amin miktarı (mg/L)
BGML 116 (St)	5342.35
BGML 118 (St)	850.87
BGML 119 (St)	2694.37

Yapılan HPLC analizine göre çizelgede 4.3’ te gösterildiği gibi; ornitin eklenmiş SM17 besi ortamında geliştirilen 118 numaralı izolatın pütresin üretim miktarlarındaki ortalama değeri 850.87 mg/L ve 119 numaralı izolat için bu değer 2694.37 mg/L olarak belirlenmiştir.

4.2.4. Kadaverin Üretimini Moleküler ve Enstrümental İncelenmesi

Şekil 4.5.'de 118 ve 119 numaralı *S. thermophilus* izolatların yapılan koloni PZR sonucunda *ldc* geninin 1185 bç uzunluğunda bant verdiği gözlemlenmiştir. Bu da bu izolatların lizini dekarboksile edip kadaverini meydana getirdiğini göstermiştir.

Şekil 4.5. Koloni PZR ile lizin (*ldc*) geninin çoğaltılmış ve %1'lik agaroz jel görüntüsü. M; 100 bç markör (Favorgen)



Çizelge 4.4. SM17 Lizin ortamında geliştirilen bazı *S. thermophilus* izolatlarının ürettiği Kadaverinin HPLC analizlerine göre elde edilen ortalama değerleri.

İzolat Numarası	Biyojen Amin miktarı (mg/L)
BGML 118 (St)	12487.99
BGML 119 (St)	5892.47

Yapılan HPLC analizine göre; lizin eklenmiş SM17 besi ortamında geliştirilen 118 numaralı izolatın kadaverin üretim miktarlarındaki ortalama değeri 12487.99 mg/L ve 119 numaralı izolat için bu değer mg/L 5892.47 olarak belirlenmiştir.

Ülkemizde dahil olmak üzere pek çok ülkede, 1990 yılından bu yana çeşitli gıdalarda biyojen amin oluşumu ve miktarları üzerine özellikle fermente et ürünlerinde ve çeşitli peynirlerde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Durlu- Özkaya 2002; Bruna ve ark., 2003). Bu gruptan laktik asit bakterilerinin çoğu biyojen amin üretebilmektedir (Arena ve ark., 2007; Arena ve de Nadra, 2001; Landete ve ark., 2008). Ülkemizdeki bu gıdaların biyojen amin miktarları konusunda yapılmış çeşitli araştırmalar bulunmakla birlikte, turşuların da üretim sürecinde biyojen amin oluşumu ve piyasada satışa sunulan turşuların biyojen amin içerikleri ile ilgili yapılmış birkaç çalışması mevcuttur (Yücel ve ark., 2001; Ekici ve Coşkun, 2004;).

Biyojen amin üretimi türden ziyade suşa bağımlıdır. Aynı türün farklı suşları farklı biyojen amin üretebilmektedir. Bir çok tür bir veya daha fazla amino asiti aynı anda dekarboksile edebilmektedir (De las Rivas ve ark., 2005).

Bu çalışmada biyojen amin üretimi için kullanılan *S. thermophilus* 'un 116 ve 118 numaralı izolatların histamin, tiramin, pütresin ve kadaverini aynı anda üretme özelliğine (histidin, tirozin, ornitin ve lizinin dekarboksile etme özelliğine) sahip oldukları tespit edilmiştir. Benzer şekilde 119 nolu izolatın pütresin ve kadaverini ürettiği (ornitin ve lizinin dekarboksile edildiği); 61, 62, 68, 72, 93 ve 145 numaralı izolatların ise hem tiramin hemde histamin üretebildiği tespit edilmiştir. Çalışmamız, Arena ve ark., 2007; Arena ve de Nadra, 2001; Landete ve ark., 2008 literatürlerindeki çalışmayla paralellik göstermektedir. *S. thermophilus* 'un farklı suşları ise farklı biyojen amin üretme yeteneğine sahiptir ve burda biyojen amin üretiminin türden ziyade suşa bağımlı olduğu gözlenmektedir.

Dekarboksilaz enzimini oluşturarak biyojen amin oluşumuna sebep olan mikroorganizmalar arasında *Streptococcus* ssp. ve *Lactobacillus* ssp. cinsi türleri bulunmaktadır (Suzzi ve Gardini, 2003). Tirozin dekarboksilaz aktivitesinin *Streptococcus* ssp. ve *Lactobacillus* ssp. cinslerin (Brink ve ark., 1990; Bunkova ve ark., 2009) ve histamin dekarboksilaz aktivitesinin *Lactobacillus* ssp. cinslerin (Coton and Coton, 2005) bakteriyel suşlarında tespit edilmesi, çalışmamızda kullanılan suşların biyojen amin üretme özellikte olması literatürlerle paralellik göstermektedir.

Pek çok ülkede biyojen amin indeksi (BAI) uygulamaları başlamışken, ülkemizde üretilen geleneksel ve ticari çeşitli fermente ürünlerin biyojen amin miktarlarının belirlenmesi son derece önemlidir. Yoğurtlarla ilgili yapılan bir çalışmada 0.21 mg/kg histamin ve 1.25 mg/kg tiramin bulunduğu tespit edilmiştir (Suhren ve ark., 1982). Başka bir araştırmada ise yoğurtta 0.1 mg/kg histamin, pütresin ve spermidin tespit edilmesine

karşın; tiramin, feniletilamin, kadaverin ve spermin saptanmadığı bulunmuştur. (Sieber ve Lavanchy, 1990). Pastörize süttten üretilen peynirlerin toplam biyojen amin içeriğinin 51-1096 mg/kg arasında değıştiğı, buna karşılık çığ süttten yapılanlarda bu değerin 1011-3133 mg/kg olduğı belirlenmiştir (Üçüncü, 2004).

Yoğurtlardan yapılan bu çalışmada, en yüksek biyojen amin konsantrasyona sahip izolatlar sırasıyla; 118 numaralı izolatın kadaverin içeriğı 12487.99 mg/L, 72 numaralı izolatın histamin içeriğı 9806.21 mg/L, 90 numaralı izolatın histamin içeriğı 6974.67 mg/L, 61 numaralı izolatın tiramin içeriğı 6512.59 mg/L, 63 numaralı izolatın tiramin içeriğı 6235.08 mg/L, 68 numaralı izolatın tiramin içeriğı 5906.61 mg/L, 119 numaralı izolatın kadaverin içeriğı 5892.47 mg/L, 72 numaralı izolatın tiramin içeriğı 5575.52 mg/L, 116 numaralı izolatın pütresin içeriğı 5342.35 mg/L, 145 numaralı izolatın tiramin içeriğı 3871.46 mg/L, 93 numaralı izolatın histamin içeriğı 3590.72 mg/L, 119 numaralı izolatın pütresin içeriğı 2694.37 mg/L, 7 numaralı izolatın histamin içeriğı 1881.93 mg/L ve 48 numaralı izolatın histamin içeriğı 1339.92 mg/L olarak tespit edilmiştir. Dekarboksilaz aktivitesi en fazla olan biyojen amin ise sırasıyla; kadaverin, histamin, tiramin ve pütresin olarak gösterilerbilir.

En düşük biyojen amin konsantrasyona sahip izolatlar ise, histamin üretme özelliğine sahip BGML 49, BGML 61, BGML 62, BGML64, BGML 68 olup bunlar 1.0 mg/L'nin altında değler göstermiştir. 138 numaralı izolatın histamin içeriğinin 0 olmasına karşılık, yapılan PZR sonuçlarında *hdc* genini taşıdığı gözlenmiştir. Bu izolatları takiben BGML75 izolatı 2.38 mg/L, BGML 116 izolatı 5.05 mg/L, BGML 118 izolatı 12.15 mg/L ve BGML 128 izolatı 70.49 mg/L oranında tiramin içermektedir.

1000 mg/kg oranında toplam biyojen aminin vücuda alınmasının insan sağlığı için tehlike taşıdığı düşünölmektedir. Söz konusu bu değler gıda kaynaklı histamin intoksikasyonları temel alınarak hesaplanmıştır (Silla-Santoz, 1996). 100 mg/kg gıda ve 2 mg/L alkollü içecek histamin için üst limit olarak önerilmiştir. Histamin dışında diğler aminlerin toksik dozlarının belirlenmesi için çok az bilgi olmasına rağmen 100-800 mg/kg tiramin için, 30 mg/kg ise feniletilamin için eşik doz olarak belirtilmiştir (Ten Brink ve ark., 1990).

Avrupa Birliğı balıklarda histamin oranının 10-20 mg/100 g' ı aşmamasını önermektedir (Silla-Santoz, 1996). Türk Gıda Kodeksi' ne göre histamin miktarının balıklarda 200 mg/kg' ı, şaraplarda ise 10 mg/kg' ı aşmaması gerekmektedir (Çolak ve Aksu, 2002). Fermente sucuklarda yüksek seviyelerde biyojen amin oluşumu rapor edilmesine rağmen bu ürün için yasal bir limit önerilmemesine rağmen (Çolak ve Aksu,

2002) süt ve süt ürünlerinde biyojen amin içeriği açısından herhangi bir yasal limit bulunmamaktadır.

Emmanuel ve Monika Coton' un 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada fermente gıda ve içeceklerden izole edilen gram pozitif (+) bakterilerinin histamin ve tiramin üretimi direkt koloni multiplex PZR yoluyla incelenmiştir. 4 farklı türün histamin gen bölgeleri karşılaştırma yapılmış ve hepsinde ortak gen bölgesi tespit edilmiştir. Literatürde kullanılan histamin ve tiramin primerleri, bu çalışmanın materyal metot kısmında verilen izelge 3.1' deki tasarlanan primerle tespit edilen baz çifti uzunlukları bu çalışmayla paralellik göstermektedir.

Peynirde, genellikle fazla miktarlarda tiramin, histamin, pütresin ve kadaverin bulunmaktadır (Vale ve Gloria 1998; Valsamaki , 2000). Peynirlerde en çok rastlanan biyojen amin tiramindir (Karahan, 2001). Peynirdeki BA miktarı peynir türü, imalat tekniği, olgunlaşma süresi, üretimden sonra geçen zaman (Ramantanis, 1984) olgunlaşma süresince katılan mikroorganizmaların bileşimi ve bunların dekarboksilaz aktivitesi (Pechanek ve ark., 1983) gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Aygün ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptığı çalışmaya göre; çeşitli sert peynirlerden alınan örneklerde tespit edilen histamin değeri 352 mg/kg olup bunlar sırasıyla tiramin için 173 mg/kg, pütresin için 74 mg/kg ve kadaverin için bu değer 123 mg/kg olarak bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyojenik aminler, gıdalarda mikroorganizma aktivitesine bağılı olarak oluşan düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Biyojen aminler mikrobiyal fermentasyonun ve bozulmanın gerçekleştiğini göstermektedir. Biyokimyasal olarak; putresin arjinin veya ornitin, histamin histidin, kadaverin lizin, tiramin trozin dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır. Amino asit dekarboksilasyonu türe, suşa ve çevre şartlarına göre farklılık göstermektedir. Dolayısı ile izole edilmiş türlerde biyojenik amin üretme özelliklerinin tespit edilmesi önemlidir.

Bu çalışmada, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının ürettikleri dört farklı biyojen amin olan; histamin (*hdc*), tiramin (*tdc*), pütresin (*odc*) ve kadaverinin (*ldc*) gen bölgelerine özgü primerler tasarlanarak bu bölgeler PCR ile tespit edilmiştir. PZR' da çoğaltılan bu bölgeler agaroz jelde görüntülenmiştir. Böylelikle moleküler olarak tespit edilen biyojenik amin genler, HPLC yöntemi ile BA üretme özellikleri mg/L cinsinden bulunmuştur. Yoğurt izolatlarında dekarboksilaz aktivitesini en yüksek gösteren biyojen amin sırasıyla; kadaverin, histamin, tiramin ve pütresin olarak tespit edilmiştir.

LAB, genel olarak patojen olmayan faydalı mikroorganizmalar olarak bilinmesine rağmen ekosistemde komşu olarak buldukları patojenlerden plazmit ve gen kazanmışlardır. Dolayısı ile biyojenik amin üretimleri hep göz ardı edilmiş olan LAB'nin bu yönleri çalışmamızda moleküler ve enstrümental olarak tespit edilmiştir. Türler ve farklı biyojenik aminler arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Yani aynı türün birden fazla BA geni taşıdığı ve bir BA çeşidinin farklı türler tarafından da üretebildiği tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında sonuç olarak; doğal izolatların, gıda güvenliği açısından biyojenik amin miktarları belirlenip daha sonra gıda endüstrisi için önerilmeleri gerekir. Gıdalarda BA derişimleri hijyenik koşullardan etkilenmekte, gıda işleme ve muhafaza sırasında değişime uğramaktadır. Bu nedenle gıdalardaki BA' ların belirlenmesi sonucunda gıda kalitesi hakkında bilgi edinilmesi mümkün olmakta ayrıca, erken ve hızlı olarak biyojenik amin belirlenmesi biyojenik aminlerin oluşumunun önlenmesi açısından önemlidir. Moleküler metotlar geleneksel metotlara oranla daha hızlı ve kesin sonuçlar vermesi nedeniyle önem arz etmektedir. Belirli bir düzeyin üzerinde tüketilen gıdalar insan sağlığında çeşitli rahatsızlıklara neden olmaktadır. BA içeren süt ürünleri ve diğer gıdaların zehirlenmelere neden olabilecek kadar amin içermeleri nedeniyle gıda toksikasyonları

açısından önemli rolünün olduğu göz ardı edilmemesini ve bu konudaki toksite başlangıcının limit değerlerine yönelik çalışmaların arttırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- AKALIN, A. S., GÖNÇ S., ve DİNKÇİ N., 2004. Liquid Chromatographic Determination of Thiamin in Dairy Products, *Int. J. Food Scie. Nutr.*, 55(4):345-349.
- AKTAN N., KALKAN H. Ve YÜCEL U., 1999. Turşu Teknolojisi. Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksek Okulu Yayınları No:23, 148s, İzmir.
- ALLEN, D.G.,JR. 2004. Regulatory Control of Histamine Production in North Carolina Harvested Mahi-Mahi (*Coryphaena Hippurus*) and Yellowfin Tuna (*Thunnus Albacares*): A HACCP-Based Industry Survey A thesis submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State Universty in partial fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science Department of Food Science, 91 p.
- ANDRIGHETTO, C., KNİJFF, E., LOMBARDİ, A., TORRIANI, S., VANCANNEYT, M., KERSTERS, K., SWİNGS, J., DELLAGLIO, F., 2001. Phenotypic And Genetic Diversity of Enterococci Isolated From Italian Cheeses. *J. Dairy Res.* 68, 303-316.
- ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., 2001. Biogenic amines productions by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 158e162.
- ARENA, M.E., FİOCCO, D., MANCA DE NADRA, M.C., PARDO, I., SPANO, G., 2007. Characterization of a *Lactobacillus plantarum* strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene. *Curr. Microbiol.* 55, 205e210.
- ASLİM, B., & BEYATLI, Y. (2004). Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish yogurts. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, 28, 257-263.
- AXELSSON L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*, S. Salminen and A. von Wright (eds), pp 1-72, Marcel Dekker Inc., New York.
- AXELSSON, L. 2004. *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology* (Salminen, S., von Wright, A. ve Ouwehand A. editörler). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3. baskı. Marcel Dekker, Inc., New York, s:1-66.
- AXELSSON, L. T., 1993. *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. In “*Lactic Acid Bacteria*” Salmina, S., Wright, A.V., pp. 1-63, Marcel Dekker Inc. USA.
- AYGUN, O., SCHNEIDER, E., SCHEUER, R., USLEBER, E., GAREIS, M., MARTLLBAUER, M: Comparison of Elisa and HPLC for the Determination of Histamine in Cheese. *J. Agric. Food. Chemistry*, 1999;47 1961-1964.
- BADİS, A., GUETARNİ, D., MOUSSABOUDJEMA, B., HENNİ, D.E., KİHAL, M., 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol.* 21, 579e588
- BODMER, S., IMARK, C., KNEUBÜHL, M., 1999. Biogenic amines in food. Histamine and food processing. *Inflammation Research* 48, 296–300.
- BRINK B.T., DAMINK, C., JOOSTEN, H.J., HUIS IN’T VELD, J. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiology* 11: 73-84.
- BRUNA, J.M., HIERRO, E.M., De la HOZ, I., MOTTRAM, D.S., FERNANDEZ, M. and BUNKOVA, L. BUNKA, F., HLOBILOVA, M., VANATKOVA, Z., NOVAKODA, D., DRAB, V. 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur Food Res. Technol.* 229: 533-538.
- CAROU, M.C., 1996. Biogenic amines in European beers. *J Agric Food Chem.* 44:3159-63.

- CHAMKHA, M., SAYADI, S., BRU, V., GODON, J.J., 2008. Microbial diversity in Tunisian olive fermentation brine as evaluated by small subunit rRNA — single strand conformation polymorphism analysis. *International Journal of Food Microbiology* 122, 211-215.
- COTON, E., ROLLAN, G. C., LONVAUD-FUNEL, A., 1998B. Histidine decarboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *J. Appl. Microbiol.* 84, 143e151.
- COTON, E., ROLLAN, G., BERTRAND, A., LONVAUD-FUNEL, A., 1998a. Histamine producing lactic acid bacteria: early detection, frequency and distribution. *Am. J. Enol. Vitic* 49, 199e204.
- ÇOLAK, H. ve AKSU, H., 2002. Gıdalarda biyojen amin varlığı ve oluşumunu etkileyen
- DAESHCEL, M. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75: 463-472.
- DAVIDSON, B. E., KORDIAS, N., DOBOS, M., HILLIER, A. J. 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70:161-183.
- DE GIORI, G.S., DE VALDEZ, G.F., DE HOLGODO, A.P.R. and OLIVER, G., 1985, Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria, *J. Dairy Scienc.*, 68, 2160-2164
- DE LAS RÍVAS, B., MARCOBAL, A., MUNOZ, R., 2005. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiology Letters* 244, 272–367.
- DE VUYST, L., TSAKALİDOU, E., 2008. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *Int. Dairy J.* 18, 476e485.
- DE VUYST, L., ZAMFİR, M., MOZZI, F., ADRIANY, T., MARSHALL, V., DEGEEST, B., ET AL. (2003). Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy Journal*, 13, 707-717
- DEL CAMPO, G., LAVADO, I., DUENAS, M. T., IRASTORZA, A., 2000. Histamine production by some lactic acid bacteria isolated from ciders. *Food Sci. Technol. Int.* 6, 117e121.
- DELORME, C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 274-277
- DIEL, E., BAYAS, N., STIBBE, A., MULLER, S., BOTT, A., SCHRIMPF, D., DIEL, F., 1997. Histamine containing food: Establishment of a German Food Intolerance Databank (NFID). *Inflamm.*, 46: 87-88.
- DURLU-ÖZKAYA, F. 2002. Biogenic amine content of some Turkish cheeses. *Journal of*
- EKICI, K. and COSKUN, H. 2004. Histamine contents of some commercial vegetable
- ERCOLINI, D., VILLANI, F., APONTE, M., MAURIELLO, G., 2006. Fluorescence in situ hybridisation of *Lactobacillus plantarum* group on olives to be used in natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 112, 291–296.
- ETÖZ D., 2006. “Kefirden izole edilen maya ve bakterilerin bazı patojen mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkisi” Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 91s, Ankara.
faktörler. *YYÜ. Veterinerlik Fak. Dergisi* 13(1-2), 35-40.
- FERNANDEZ, M., LINARES, D. M., RODRIGUEZ, A., ALVAREZ, M. A. 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 1400-1406.
- FERNANDEZ, M., LINARES, D.M., ALVAREZ, M.A., 2004. Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a

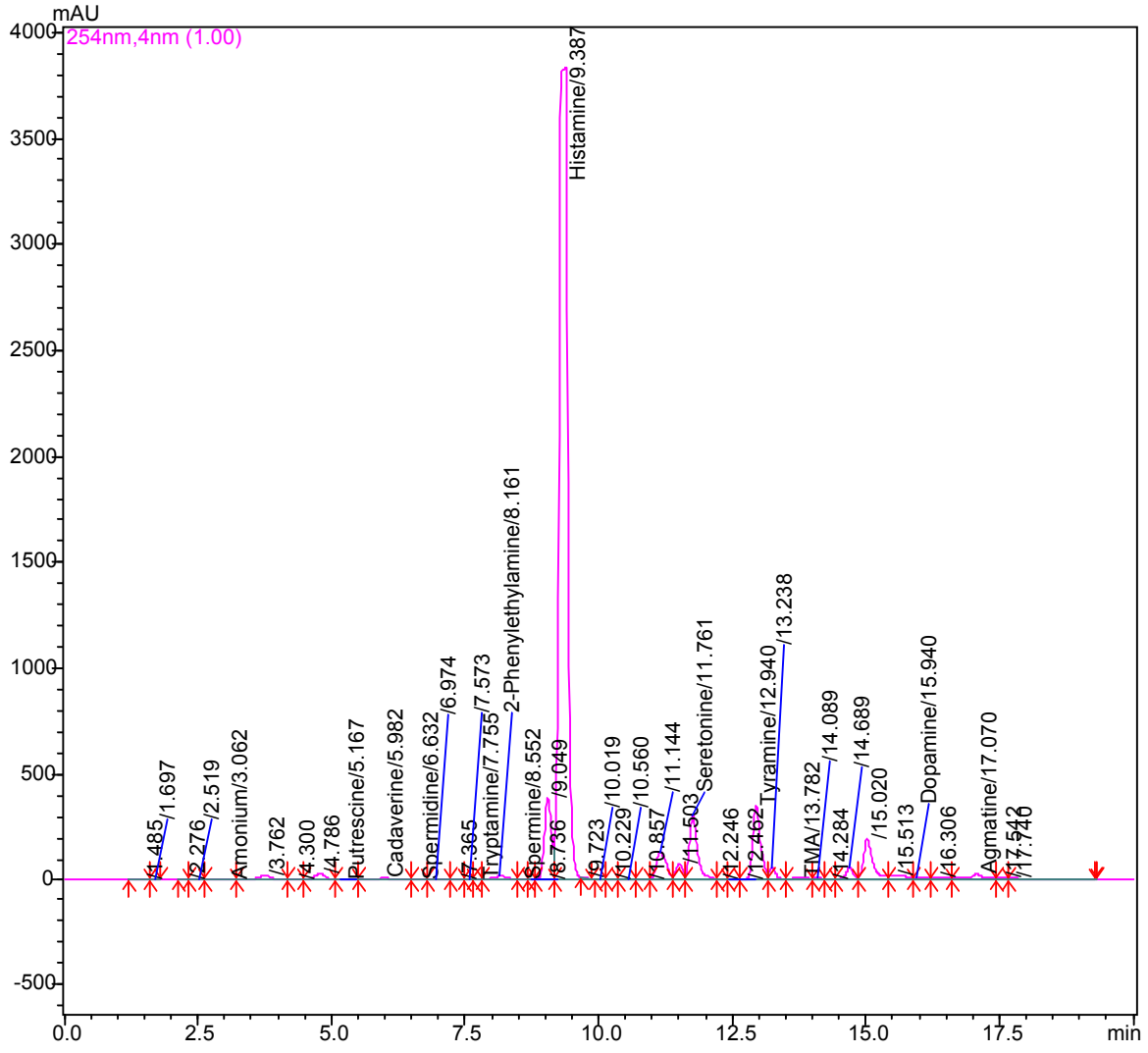
- PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 67, 2521–2529.
- Food Processing and Preservation*, 26(4); 259-265.
- GARDNER, N.J., SAVARD, T., OBERMIER, P., CALDWELL, G., CHAMPAGNE, C.P., 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int. Journal of Food Microbiology* 64,261-275.
- GIRAFFA, G. 2003. Functionality of Enterococci In Dairy Products. *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 215-222.
- GUERRINI, S., MANGANI, S., GRANCHI, L., VINCENZINI, M., 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr. Microbiol.* 44, 374e378.
- HALASZ, A., BARATH, A., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science Technology* 5, 42–49.
- HALKMAN, K., 1991, *Tarım Mikrobiyolojisi*, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No: 1214, 82s.,Ankara.
- HAYALOGLU AA, ERGINKAYA Z. (2001). Gıda Endüstrisinde kullanılan Laktik Asit Bakterileri. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 23, Bizim Büro Basımevi, 26 s, Ankara.*
- HERNANDEZ, T., ESTRELLA, I., PEREZ-GORDO, M., ALEGRIA, E. G., TENORIO, C., RUIZ-LARREA, F., MORENO-ARRIBAS, M. V. 2007. Contribution of Malolactic Fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the Changes in the Nonanthocyanin Polyphenolic Composition of Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* 55(13): 5260-5266.
- HERREROS, M. A., FRESNO, J. M., GONZALEZPRIETO, M, J., TORNADIJO, M. E., 2003. Techno-logical characterization of lactic acid bacteria isolated from Armadachese (a Spanish goats' milk cheese). *Int. Dairy J.* 13,469e479.
- HEYMAN, M., ME'NARD, S., 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 1151-1165.
- HOLS, P., HANCY, F., FONTAINE, L., GROSSIORD, B., PROZZI, D., LEBLOND-BOURGET, N., ET AL. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 435-463.
- HOLT, J.G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology* (Holt, J. G. Editör). 9. baskı, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, s:527-558.
- HURTADO, A., REGUANT, C., ESTEVE-ZARZOSO, B., BORDONS, A., ROZES, N., 2008. Microbial population Dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International* 41, 738-744
- IACUMIN, L., CECCHINI, F., MANZANO, M., OSUALDINI, M., BOSCOLO, D., ORLIC, S., COMI, G., 2009. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology* 26, 128-135.
- IYER, R., TOMAR, S. K., SINGH, R., & SHARMA, R. (2009). Estimation of folate in milk by microbiological assay using trienzyme extraction method. *Milchwissenschaft*, 64, 125-127
- IZQUIERDO-PULIDO, M., HERNANDEZ-JOVER, T., MARINE-FONT, A., VIDAL JAY, J. M.: 1992. *Modern Food Microbiology*. Chapman and Hall, London. S.675

- KARAHAN, A.G., ÖNER, Z., FİLİZ, H.N., 2001. Farklı depolama sürelerinde beyaz peynirlerde meydana gelen değişimler. II. Ulusal Kromatografi Kongresi Bildirisi. Kromatografik Yöntemler., 316-326.
- LADERO, V., MARTINEZ, N., MARTIN, M.C., FERNANDEZ, M and ALVAREZ, LANDETE, J. M., DE LAS RÍVAS, B., MARCOBAL, A., MUNOZ, R., 2007A. Molecular methods for the detection of biogenic amine- producing bacteria an foods. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 258e269.
- LANDETE, J.M., FERRER, S., POLO, I. (2005). Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 119-1124.
- LANDETE, J.M., PARDO, I., FERRER, S., 2007. Tyramine and phenylethylamine production among lactic acid bacteria isolated from wine. *International among lactic acid bacteria isolated from wine. International Food Microbiology* 115, 364-368.
- LAWS, A., GU, Y. C., & MARSHALL, V. (2001). Biosynthesis, characterization, and design of bacterial expolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 19, 597-625.
- LEROY, F., DE VUYST, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15:67-78.
- LIU, G. R., Lv, Y. N., LI, P. L., ZHOU, K., & ZHANG, J. L. (2008). Pentocin 31-1, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product. *Food Control*, 19, 353-359.
- LONVAUD-FUNEL, A., JOYEUX, A., 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 401–407.
- LUCAS, P., LANDETE, J., COTON, M., COTON, E., LONVAUD-FUNEL, A., 2003. The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 229, 65–71.
- M.A. (2010a). qPCR for quantitative detection of tyramine-producing lactic acid bacteria in dairy products. *Food Research International*. 43, 289-295.
- MAIJALA, R.L., 1993. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology* 17, 40–43.
- MARCOBAL, A., De Las RIVAS, B., MORENO-ARRIBAS, M.V., MUNOZ, R. 2006. Evidence for horizontal gene transfer as origin of putrescine production in *Oenococcus oeni* RM83. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:7954-7958.
- MARCOBAL, A., DE LAS RÍVAS, B., MORENO-ARRIBAS, M.V., MUNOZ, R., 2004a. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiol. Lett.* 239, 213e220.
- MARCOBAL, A., DE LAS RÍVAS, B., MORENO-ARRIBAS, M.V., MUNOZ, R., 2004b. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiology Letters* 239, 213–220.
- MCKINLEY, M. 2005. The nutrition and health benefits of yoghurt. *Int. Journal of Dairy Technology*. 58: 1-12.
- MERCENIER A, PAVAN S, POT B: PROBIOTICS AS BIOTHERAPEUTIC AGENTS: PRESENT KNOWLEDGE AND FUTURE PROSPECTS. *CURR PHARMACEUDES* 2002; 8:99
- MÍCHAYLOVA, M., MÍNKOVA, S., KÍMURA, K., SASAKÍ, T., & ISAWA, K. (2007). Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* and

- Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. FEMS Microbiology Letters, 269, 160-169
- MONNET, C., MORA, D., & CORRËU, G. (2005). Glutamine synthesis is essential for growth of *Streptococcus thermophilus* in milk and is linked to urea catabolism. Applied and Environmental Microbiology, 71, 3376-3378.
- MORA, D., MAGUÏN, E., MASÏERO, M., PARÏNÏ, C., RÏCCÏ, G., MANACHÏNÏ, P. L., ET AL. (2004). Characterization of the urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. Journal of Applied Microbiology, 96, 209-219.
- MORA, D., FORTÏNA, M. G., PARÏNÏ, C., RÏCCÏ, G., GATTÏ, M., GÏRAFFA, G., ET AL. (2002). Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. Journal of Applied Microbiology 93, 278-287
- MORENO-ARRÏBAS, M. V., POLO, M.C., JORGANES, F., MUNOZ, R, 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. Int. J. Food Microbiol. 84, 117e123.
- MORENO-ARRÏBAS, M. V., TORLOÏS, S., JOYEUX, A., BERTRAND, A., LONVAUND-FUNEL, A., 2000. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. J. Appl. Microbiol. 88, 584e593.
- NANNELLÏ, F., CLAÏSSE, O., GÏNDREAU, E., DE REVEL, G., LONVAUD-FUNEL, A., LUCAS, P. M, 2008. Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. Lett. Appl. Microbiol. 47, 594e599.
- OGÏER, J. C., SERROR, P. 2008. The Enterococcus genus. Int. J. Food Microbiol. (in pres)
- ORDONEZ, J.A. 2003. Changes in selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 85(1-2);111-125.
- ÖZDEMÏR H. 1999. Türk fermente sucuğunun florasındaki dominant laktobasil türlerinin sucuğun organoleptik nitelikleri ile ilişkisi. Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergi 46, 189-198.
- ÖZOĞUL F, KÜLEY E, ÖZOĞUL Y. 2004. Balık ve Balık Ürünlerinde Oluşan Biyojenik Aminler. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, Cilt/Volume 21, Sayı/Issue (3-4): 375-381.
- PARENTE, E., & COGAN, T. M. (2004). Starter cultures: general aspects. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.), Cheese: Chemistry, physics and microbiology (pp. 122-147). San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press.
- PECHANEK, U., PFANNHAUSER, W., WOÏDICH, H.: Untersuchungen über den Gehalt biogener amine in vier Gruppen von Lebensmitteln des österreichischen Marktes. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1983; 176:335-340.
- peynir, şarap ve lahana turşularında histamin miktarları. TÜBÏTAK-TOGTAK Proje no. 1726, s. 1-25, Mayıs, İzmir.
- pickles. Pakistan Journal of Nutrition, 3(3); 197-198.
- PLOCKOVA, M.: STÏLES, J.; CHUMCHAKOVA, J.;HALFAROVA,R., 2001.Control of Mould Growth by *L. rhamnosus VTI* and *L. reuteri CCM 3625* on Milk Agar Plates. Czerch J. Food Sci.Vol. 19(2):46-50.
- PRESCOTT, C.S. and DUNN, G.C. 1987. Industrial Microbiology, Published on Distributors, Delhi, India, pp.882.
- RAMANTANIS, S.: Histamin, Tyramin and Triptamin in Lebensmitteln. Arch. Lebensmittelhyg. 1984;35:75-80.
- Recombinant strain of *Streptococcus thermophilus*. Applied and Environmental Microbiology, 70, 4596-4603.
- S., & VADEBONCOEUR, C. (2004). Characterizati on of a galactokinase-positive

- SAĞDIÇ O., ARICI M., ŞİMŞEK O., 2002 Selection of starters for a traditional Turkish yayık butter made from yoghurt. *Food Microbiology*, 19, 303-312
- SALMINEN S, OUWEHAND AC, ISOLAURI E: PROBIOTICS:AN OVERVIEW OF BENEFICIAL EFFECTS. *ANTONIE VAN LEEUWENHOEK* 2002; 82: 279.
- SARANTINOPOULOS, P., ANDRIGHETTO, C., GEORGALAKI, M. D., REA, M. C., LOMBARDI, A., COGAN, T. M., KALANTZOPOULOS, G., TSAKALIDOU, E. 2001. Biochemical Properties of Enterococci Relevant to Their Technological Performance. *Int. Dairy J.*, 11: 621-647.
- SCHNELLER. R., GOOD, P., JENNY, M., 1997. Influence of pasteurised milk, raw milk and different ripening cultures on biogenic amine concentrations in semi-soft cheeses during ripening. *Z. Lebensmittel. Unters. Forsch.*, 204: 265-272.
- SETTANNI, L., and CORSETTI, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 123-138.
- SHAKILA RJ, VASUNDHARA TS, KURNUDAVALLY KV. 2001. A comparasion of the TLC densitometry and HPLC method fort he determinetion of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chemistry*, 75: 255-259.
- SHALABY, A.R., 1996. Significance of biogenic amines in food safety and human health. *Food Research International* 29, 675–690.
- SIEBER, R., LAVANCHY, P.: Geahalt and biogene aminen in Milchproducten and in Kase. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 1990; 81:82-105.
- SILLA SANTOS, M. H., 1996. Biogenic amines: their importance in food. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 213e231.
- SOOMRO AH, MASUD J, ANWAAR K., 2002: Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. *Pakistan Nutrition.* 1:20.
- STRATTON JE, HUTKINS RV & TAYLOR SL (1991) Biogenic amines in cheese and other fermented foods. A review. *J Food Prot* 54: 460-470.
- STRATTON, S., HUTKINS, R.W., & TAYLOR, S.L. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, 54, 460-470.
- SUHREN, G., HEESCHEN, W., TOLLE, A.: Untersuchungen zum Nachweis von Histamin and Tyramin in Milchproducten. *Milchwisswenschaft*, 1982; 37 (3): 143-147.
- SUZZI, G., GARDINI, F., 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* 88, 41-51.
- TAMIME, A. Y., ROBINSON, R. K. 1999. *Yoghurt Science and Technology*. Woodhead Publishing Limited. CRC pres. Cambridge England. P:619.
- TEKİNŞEN, O. C. 1996. *Süt Ürünleri Teknolojisi*, Selçuk Üniversitesi Vet. Fak. Yayını, Konya.
- TEN BRINK, B., DAMINK, C., JOOSTEN, H.M.L.J., HUIS IN'T VELD, J.H.J., 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 73e84.
- TEODOROVIC, V., BUNCIC, S., SMILJANIC, D. 1994. A study of factors influencing histamine production in meat. *Fleischwirtschaft.* 74:181-183.
- TOSI L., BERRUTI, G., DANIELSEN, M., WIND, A., HUYS, G., & MORELLI, L. (2007). Susceptibility of *Streptococcus thermophilus* to antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92(1), 21-28.
- VAÏLLANCOURT, K., BEDART, N., BART, C., ROBÍTAÏLLE, M. T. G., TURGEON, , VAÏLLANCOURT, K., LEMAY, J. D., LAMOUREUX, M., FRENETTE, M., MOÏNEAU, VEGA LEAL-SANCHEZ, M., RUÍZ-BARBA, J.L., SANCHEZ, A.H., REJANO, L., JIMENEZ-DÍAZ, R., GARRIDO, A., 2003. Fermentation

- profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology* 20, 421–430.
- VALE, S. ve GLORIA, B.A., 1998. Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chem.*, 63(3):343-348.
- VALSAMAKI, K., MICHAELIDOU, A., 2000 Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry.*, 71: 259-266
- VERGES, C. M. C., ZUNIGA, M., MOREL-DEVILLE, F., PEREZ-MARTINEZ, G., ZAGOREC, M., EHRLICH, S. D., 1999. Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 180, 297e304.
- VESCOVO M, TORRIANI S, ORSI C, MACCHIAROLO F, SCOLARI G. 1997. Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready to use vegetables. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 113-119.
- VOGEL, R.F., EHMANN, M.A., GANZLE, M.G., 2002. Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 631-638.
- YÜCEL, U., ÜREN, A., HOCALAR, B. ve TURANTAŞ, F. 2001. Fermente ürünlerden
- ZORBA M., HANCIOGLU O., GENÇ M. ve OVA G., 2003. The use of starter cultures in the fermentation of boza, a traditional Turkish beverage. *Process Biochemistry*, 38, 1405-1411.



Ek Şekil 1 : Histidin besi ortamında geliştirilen BGML 72 izolatının HPLC’de belirlenen biyojenik amin kromotogramı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, Soyadı : Öznur BUCAK
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 28.09.1985 Mersin
e-posta : oznur985@hotmail.com.

Eğitim

<u>Derece</u>	<u>Eğitim Birimi</u>	<u>Mezuniyet tarihi</u>
Yüksek lisans	KSÜ /Ziraat Fak. Zootekni-Biyometri ve Genetik	2011
Lisans	KSÜ/Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	İsa Öner Çok Programlı Lisesi	2002

Yabancı Dil

İngilizce