



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL *Lactobacillus plantarum* İZOLATLARININ
GIDA GÜVENLİĞİ VE AROMATİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YUSUF ALAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2014

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞAL *Lactobacillus plantarum* İZOLATLARININ
GIDA GÜVENLİĞİ VE AROMATİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YUSUF ALAN

Bu tez,
Biyoloji Anabilim Dalında
DOKTORA
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2014

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Yusuf ALAN tarafından hazırlanan “Doğal *Lactobacillus plantarum* İzolatlarının Gıda Güvenliği ve Aromatik Özelliklerinin Araştırılması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 06/01/2014 tarihinde oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Metin DİĞRAK (DANIŞMAN)

Biyoloji Anabilim Dalı, KSÜ

Doç. Dr. İsmail AKYOL (ÜYE)

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, KSÜ

Doç. Dr. Ashabil AYGAN (ÜYE)

Biyoloji Anabilim Dalı, KSÜ

Doç. Dr. Uğur ÇÖMLEKCİOĞLU (ÜYE)

Biyoloji Anabilim Dalı, KSÜ

Yrd. Doç. Dr. Yekta GEZGİNÇ (ÜYE)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, KSÜ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. M. Hakkı ALMA

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.

Yusuf ALAN

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.

DOĞAL *Lactobacillus plantarum* İZOLATLARININ GIDA GÜVENLİĞİ VE AROMATİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(DOKTORA TEZİ)

Yusuf ALAN

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden rastgele toplanan doğal turşu örneklerinden izole edilen *Lactobacillus plantarum* izolatları biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Moleküler tanımlama *recA* gen dizisi ve 16S rRNA kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu metodu ile yapılmıştır. Tanımlanan 63 *L. plantarum* izolatının plazmit DNA izolasyonları yapılmış, tüm izolatlar içerisinde *L. plantarum*'ların 74 farklı plazmit taşıdığı belirlenmiştir. İzolatlarda antibiyotik dirençliliği ortaya koymak üzere; penicillin, eritromisin, amikasin, rifampisin ve trimethoprim antibiyotikleri kullanılmıştır. İzolatların en fazla dirençliliği amikasin (%92)'e gösterdiği, trimethoprim (%98)'e karşı ise duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Antibiyotik direnç özelliklerinin, izolatların plazmit içeriği ile doğrusal bir ilişkisi tespit edilememiştir. İzole edilen *L. plantarum* 3 farklı biyojen amin (putresin, kadaverin, histamin) üretme özellikleri 3 farklı amino asit (lizin, histidin, ornitin) ekli besi ortamında incelenmiş *L. plantarum* izolatlarında 115-1332 mg/lt oranında biyojen amin ürettiği tespit edilmiştir. İzole edilen *L. plantarum*'lar 5 farklı aromatik madde (format, pürivat, laktat, etanol ve 2,3-bütandiol) üretme özellikleri incelenmiş, Araştırma bulgularına göre, Türkiye genelinden toplanan doğal turşu örneklerindeki mikroorganizmaların gıda kalite ve güvenliği açısından risk etmeni taşıyabildiği, gıdalarda kullanılacak kültürlerin kalite ve güvenlik sağlama adına teyitlerinin yapılmasının gerekli ve yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Laktik Asit Bakterileri, Starter Kültür, *Lactobacillus plantarum*, Moleküler Tanımlama, Plazmit İçeriği, Antibiyotik Dirençlilik, Biyojen Amin Üretimi, Aromatik Madde.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Ocak / 2014

Danışman: Prof. Dr. Metin DİĞRAK

Sayfa sayısı: 100

**INVESTIGATION OF AROMATIC AND FOOD SAFETY PROPERTIES IN
NATURAL *Lactobacillus plantarum* ISOLATES**

(PhD THESIS)

Yusuf ALAN

SUMMARY

In this study, *Lactobacillus plantarum* species isolated from natural pickle samples that randomly collected from different region of Turkey and then identified by using chemical and molecular methods. The molecular identification, using recA gene index and 16S rRNA has done by method of polymerase chain reaction. The isolation plasmid DNA of the identified 63 *L. plantarum* species carried on, and among the all isolates the *L. plantarum* containing 74 several of plasmids determined. In order to reveal of antibiotic resistance of isolates, the penicillin, erythromycin, amikacin, rifampicin and trimethoprim used. It was found that in isolated species has high resistance toward to amikacin (92%) but less resistance has been determined towards trimethoprim (%98). There is not any linear correlations were found between antibiotic resistance and plasmid contents of isolated species. 3 different biogenic amines (putrescine, cadaverine, histamine) production of isolates were examined in three different amino acid (lysine, histidine, and ornithine) containing medium. Biogenic amines production of *L. plantarum* species was found to be 115-1332 mg/l respectively. 5 different aromatic substances (formate, pyruvate, lactate, ethanol and 2,3-butanediol) production of isolates were examined. According to the results, isolated microorganism from traditional pickles samples which are collected from different region of Turkey may carry risk factors for food quality and safety. Thus, in food industry before using them, confirmation of the quality and safety of cultures will be necessary and useful.

Key Words: Lactic Acid Bacteria, Starter Culture, *Lactobacillus plantarum*, Molecular Identification, Plasmid Content, Antibiotic Resistivity, Biogenic Amin Production, Aromatic Substances.

UNIVERSITY of KAHRAMANMARAŞ SUTCU IMAM

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, January / 2014

Supervisor: Prof. Dr. Metin DIĞRAK

Page number: 100

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında göstermiş oldukları her türlü yardım, rehberlik ve çok değerli katkılarından dolayı başta danışman hocam Prof. Dr. Metin DIĞRAK olmak üzere, tez izleme komisyonu üyeleri Doç. Dr. İsmail AKYOL ve Doç. Dr. Ashabil AYGAN hocalarıma, laboratuvar çalışmalarına desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Sedat BOZARI, Arş. Gör. Ahmet SAVCI ve DNA dizi analizleri için yapmış oldukları yardımlardan dolayı Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkür ediyorum.

Bu çalışma ile birlikte hayatımın her anında bana gösterdiği anlayış ve sabırdan dolayı eşim Pınar ALAN'a ve bugünlere gelmemde çok emekleri olan anneme, babama ve abim Diyadin ALAN'a minnettar olduğumu bildirmek isterim.

Yusuf ALAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
SUMMARY	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
EKLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Sebzelerin Fermantasyon	1
1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri.....	2
1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Fermentasyondaki Önemi.....	2
1.4. Laktik Asit Bakterilerinde Pirüvat Metabolik Yol.....	3
1.5. Fermentasyon Sırasında Oluşan Aroma Maddeleri ve Önemleri	5
1.5.1. Esterler	6
1.5.2. Yüksek alkoller	6
1.5.3. Karbonil bileşikleri.....	6
1.5.4. Asitler.....	7
1.5.5. Diğer bileşikler	7
1.6. Endüstriyel Starter Kültürler.....	8
1.7. <i>Lactobacillus plantarum</i>	9
1.8. Laktik Asit Bakterilerinin Plazmit Özellikleri.....	10
1.9. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Özellikleri.....	10
1.10. Biyojen Aminler ve Genel Özellikleri	11
1.11. Biyojen Amin Oluşumuna Etki Eden Faktörler.....	13

1.12. Sağlık Açısından Biyojen Aminlerin Önemi	13
1.13. Biyojen Aminlerle İlgili Tavsiye Edilen Sınır Değerleri.....	15
1.14. Gıdalarda Biyojen Amin Analiz Yöntemleri	16
1.15. Çalışmanın Önemi ve Amacı	16
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	18
2.1. Biyojen Amin Üretimi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	18
2.2. Biyojen Amin Oluşumunu Etkileyen Faktörler	22
2.3. Sağlık Açısından Biyojen Amin Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	26
2.4. Aromatik İçerikler ve Gıda Güvenliği Üzerine Yapılan Çalışmalar	27
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1. Kimyasallar	30
3.2. Turşu Örnekleri.....	30
3.3. Besiyeri ve Hazırlanması	34
3.4. Çözeltiler ve Hazırlanması.....	34
3.5. <i>L. plantarum</i> Suşlarının İzolasyonu.....	35
3.6. Biyokimyasal Tanımlama	36
3.6.1. Koloni morfolojisi.....	36
3.6.2. Gram boyama.....	36
3.6.3. Katalaz testi.....	36
3.7. Moleküler Biyoloji Metotları	37
3.7.1. Oligonükleotit primerler.....	37
3.7.2. Kromozomal DNA izolasyonu	37
3.7.3. Polimeraz zincir reaksiyonu	37
3.7.3.1. Koloni PCR (<i>rec A</i> gen PCR)	37
3.7.3.2. 16S rRNA PCR ve DNA dizi analizi	38
3.7.4. Plazmit DNA izolasyonu.....	38

3.7.4.1. Hazır kit kullanılarak yapılan plazmit DNA izolasyonu	38
3.7.4.2. Geleneksel plazmit DNA izolasyonu	39
3.7.5. DNA'nın jel elektroforezi	39
3.8. İzolatların Stoklanması	40
3.9. İzolatlarının Antibiyotiklere Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi	40
3.9.1. Disk difüzyon metodu	40
3.10. Biyojen Aminlerin HPLC ile Belirlenmesi.....	41
3.10.1. HPLC cihazı	41
3.10.2. Biyojen amin standart çözeltilerinin hazırlanması	41
3.10.3. Mobil faz	42
3.10.4. İzolatların aminoasit içeren besiyerinde geliştirilmesi.....	42
3.10.5. Ekstraksiyon ve türevlendirme.....	43
3.11. Aromatik Maddelerin HPLC ile Belirlenmesi	43
3.11.1. HPLC cihazı	43
3.11.2. Standart çözeltilerin hazırlanması	44
3.11.3. Aromatik maddelerin üretilmesi.....	44
3.12. Sonuçların Değerlendirilmesi	44
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	45
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması	45
4.1.1. İzolatların biyokimyasal ve morfolojik olarak tanımlanması	46
4.1.2. İzolatların <i>rec A</i> gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması.....	47
4.1.3. İzolatların 16S rRNA gen bölgesi PCR sonuçları	50
4.1.4. İzolatların 16S rRNA PCR ürünlerinin DNA dizi analiz sonuçları	52
4.2. Plazmit İzolasyonu ve Antibiyotik Direnç Özellikleri	56
4.2.1. <i>L. plantarum</i> izolatlarından plazmit izolasyonu.....	56
4.2.2. İzolatların antibiyotik direnç özellikleri.....	60

	<u>Sayfa No</u>
4.3. İzolatlarının Biyogen Amin İçerikleri.....	65
4.4. İzolatların Aromatik Madde İçeriklerinin Belirlenmesi	73
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR.....	84
EKLER.....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. <i>L. plantarum</i> suşunun metabolik yolunun şematik gösterimi.	4
Şekil 1.2. Gıdalarda biyojen amin oluşumunun metabolik yolu	12
Şekil 3.1. Turşudan izole edilen LAB'ların MRS besi ortamında aktifleştirilmesi	36
Şekil 4.1. MRS agar petrilere aşılanan <i>Lactobacillus</i> 'a ait koloni görüntüsü	46
Şekil 4.2. Turşudan izole edilen <i>L. plantarum</i> suşunun gram boyama görüntüsü	46
Şekil 4.3. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (1-19. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü	48
Şekil 4.4. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (20-38. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü	48
Şekil 4.5. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (39-57. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü	48
Şekil 4.6. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (58-76. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü	49
Şekil 4.7. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (77-95. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü	49
Şekil 4.8. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (96-114. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü	49
Şekil 4.9. <i>L. plantarum</i> izolatlarının (1-19) 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü	51
Şekil 4.10. <i>L. plantarum</i> izolatlarının (20-39) 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü	51
Şekil 4.11. <i>L. plantarum</i> izolatlarının (40-59) 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü	51
Şekil 4.12. <i>L. plantarum</i> izolatlarının (60-78) 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü	52
Şekil 4.13. Doğal turşulardan izole edilen <i>L. plantarum</i> 3 nolu izolatın 16S rRNA genine ait dizi analizi sonuçları	53
Şekil 4.14. <i>L. plantarum</i> izolatlarının (1-20. izolat) plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü	56
Şekil 4.15. <i>L. plantarum</i> izolatlarının (21-44. izolat) plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü	57

Şekil 4.16. <i>L.plantarum</i> izolatlarının (45-60. izolat) plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü	57
Şekil 4.17. <i>L.plantarum</i> izolatlarının (62-78. İzolat) plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü	57
Şekil 4.18. 15 (A) ve 32 (B) nolu izolatların antibiyotik direnç özelliklerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen zon görüntüleri	61
Şekil 4.19. HPLC’de kullanılan biyojenik amin standart kromatogramı	66
Şekil 4.20. HPLC’de kullanılan aromatik standart kromatogramları	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Laktik asit bakterileri tarafından fermente edilmiş yiyecek ve içecekler.....	3
Çizelge 3.1. Farklı il ve ilçelerde temin edilen turşu örnekleri, turşudan izole edilen ve tanımlanan laktik asit bakteri listesi	30
Çizelge 3.2. Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan MRS besi ortamlarının kompozisyonu	34
Çizelge 3.3. <i>L.plantarum</i> 'ların <i>recA</i> ve evrensel 16S rRNA genleri tanımlanması için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri	37
Çizelge 3.4. Antibiyotikler ve konsantrasyonları	40
Çizelge 3.5. HPLC cihazının özellikleri ve biyojen amin analizi için kromatografi koşulları	41
Çizelge 3.6. Biyojen aminlerin ayrıştırılması için kullanılan HPLC gradient profili	42
Çizelge 3.7. HPLC cihazının özellikleri ve aromatik maddelerin analizi için kromatografi koşulları	43
Çizelge 4.1. Farklı yörelerden toplanan turşu örneklerinden elde edilen <i>L. plantarum</i> 'un izolat sayıları	45
Çizelge 4.2. Doğal turşulardan izole edilen <i>L. plantarum</i> suşlarının sekans analiz sonuçları	54
Çizelge 4.3. Doğal turşulardan izole edilen <i>L. plantarum</i> suşlarının plazmit içerikleri.....	58
Çizelge 4.4. Doğal turşulardan izole edilen <i>L.plantarum</i> suşların antibiyotik dirençlilikleri	61
Çizelge 4.5. Standart antibiyotiklerin karşılaştırma değerleri	64
Çizelge 4.6. Doğal turşulardan izole edilen <i>L. plantarum</i> suşlarının direnç-duyarlılık durumlarının standart antibiyotiklerle karşılaştırması.....	65
Çizelge 4.7. Lizin, histidin, ve ornitin eklenmiş MRS besi ortamında gelişen <i>L. plantarum</i> izolatları tarafından üretilen biyojen aminler	67
Çizelge 4.8. Doğal turşulardan izole edilen <i>L. plantarum</i> suşlarının aromatik madde (format, pürivat ve laktat) miktarları.....	75
Çizelge 4.9. Doğal turşulardan izole edilen <i>L. plantarum</i> suşlarının aromatik madde (etanol ve 2-3 bütanediol) miktarları.....	78

EKLER DİZİNİ

Sayfa No

EK-1. Agaroz jelde DNA'nın koşturulması sırasında yüklenen DNA standartları. A: 100 bç DNA ladder	103
EK-2. Agaroz jelde DNA'nın koşturulması sırasında yüklenen DNA standartları. A: 1000 bç DNA ladder	103
EK-3. Ornitin, lizin ve histidin besi ortamında geliştirilen <i>L. plantarum</i> 18 izolatının HPLC'de belirlenen biyojen amin kromatogramı	104
EK-4. Ornitin, lizin ve histidin besi ortamında geliştirilen <i>L. plantarum</i> 25 izolatının HPLC'de belirlenen biyojen amin kromatogramı	104
EK-5. Ornitin, lizin ve histidin besi ortamında geliştirilen <i>L. plantarum</i> 22 izolatının HPLC'de belirlenen biyojen amin kromatogramı	105
EK-6. MRS besi ortamında geliştirilen <i>L. plantarum</i> 18 izolatının HPLC'de belirlenen aromatik metabolitlerin kromatogramı	105

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrad derece
µl	: Mikrolitre
A	: Adenin
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
cm	: Santimetre
dH₂O	: Distile su
dk	: Dakika
dNTP	: Deoksi nükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
Et-Br	: Etidium bromür
G	: Guanin
gr	: Gram
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografi
kb	: Kilobaz
LAB	: Laktik asit bakterileri
M	: Markör
ml	: Mililitre
R	: Dirençli
rpm	: Dakikada devir
sp.	: Tür
ssp.	: Alt tür
T	: Timin
TBE	: Tris, borik asit, edta
UV	: Ultra viyole

1. GİRİŞ

Gıda maddelerini uzun süre saklayabilmek, az ya da hiç bulunmadıkları yer ve zamanlarda bu ürünlerden yararlanabilmek için kullanılan muhafaza yöntemleri arasında turşu yapımı yer almaktadır. Turşu, sebze ve meyvelerin belli konsantrasyonlarda tuz içeren salamura veya kendi öz suları içinde laktik asit bakterileri tarafından fermente edilmesiyle oluşan, laktik asit ve ortamdaki tuzun koruyucu etkisi sonucu dayanıklılık kazanan bir üründür (Aktan ve ark., 1998).

Türk Standartları Enstitüsü (TSE) turşuyu, sirke ve/veya salamura içindeki laktik asit fermentasyonu ile veya sulandırılmış asetik asit içinde bekletilerek çeşni ve katkı maddeleri ilavesiyle elde edilen ürün olarak tanımlanmaktadır (Anonymous, 1993).

Günümüzde tüketicilerin doğal ve katkısız ürünlere gösterdikleri talep artışı nedeniyle turşu üretiminde laktik asit bakterilerinin kullanılması, üretilen laktik asidin potansiyel gıda koruyucusu olarak ortamda bulunması nedeniyle doğal olarak yapılan turşuya talep artırmaktadır.

1.1. Sebzelerin Fermantasyon

Fermentasyon; gıdaların tat, aroma ve besleyici özelliklerinde önemli değişiklikler meydana getiren, patojen bakteri ve gıdaları bozan mikroorganizmaları kontrol altına alınmasında ekonomik ve etkili bir muhafaza yöntemidir (Holzapfel, 2002). Fermentasyon yoluyla gıdaların korunmasındaki temel prensip, karbonhidratların oksidasyonu ve son ürün olarak çeşitli organik asitler, alkol ve CO₂ türevlerinin üretilmesidir (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

Laktik asit fermantasyonunun gerçekleştiği önemli işlemlerden biri turşu üretimidir (Aktan ve ark., 1998). Turşu fermantasyonunda, hammaddeden gelen doğal flora içerisindeki laktik asit bakterilerinin, şekerleri asitlere dönüştürmesi ile laktik asit üretilmekte ve hammaddeye göre yeni ve farklı özellikte ürün elde edilmektedir (Hutkins 2006). Ayrıca, mikrobiyal bozulmaya ve toksinlerin gelişmesine karşı gıdalarda direnç sağlanmakta, patojenik mikroorganizmaların gelişimini engellenmesiyle, ürünün besinsel değeri artmaktadır (Steinkraus 1983).

Turşu fermantasyonunun başlangıç ve birincil aşamasında, ortama hakim olan laktik asit bakterileri *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*,

Pediococcus pentocaceus ve *Lactobacillus plantarum* türleridir. *L. plantarum* aside en dayanıklı tür olması nedeniyle tüm fermentasyon boyunca baskındır, genelde fermentasyon bu bakterinin etkinliğiyle sonlanmaktadır (Aktan ve ark., 1998).

1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri, “güvenli bakteriler” olarak kabul edilirler ve koruyucu kültürlerin özelliklerini taşırlar. Gıdalarda sadece gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etmek veya raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadır. Ayrıca gıdanın duyuşal özelliklerinde olumlu değişime neden olmasının yanı sıra antogonistik özelliklerinden dolayı birçok üründe starter kültür olarak kullanılmaktadır (Bergamini ve ark., 2009).

Genetik farklılıklarına rağmen bu grubun genel özellikleri gram pozitif, hareketsiz ve spor oluşturmeyen formda olmalarıdır. LAB türleri katalaz ve sitokrom üretemezler, anaerobik olarak gelişirler, fakat oksijene karşı toleranslıdırlar. Bu özellikleri ile LAB’lar doğal çevrede geniş bir alana yayılmış durumdadır. Karbonhidratları fermente ederek laktik asit ağırlıklı son ürünler oluşturmaktadırlar (Wright ve Bruce, 2003).

Sınıflandırmalarında LAB iki ayrı familyada toplanmıştır. *Streptococcaceae* familyasına ait *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* cinsleri yer alırken, *Lactobacillaceae* familyasına ait *Lactobacillus* cinsi bulunmaktadır (Daeschel, 1989).

LAB’ın çoğu biyosentez yeteneği olmadığından heterotrofik organizmalardır. Bu nedenle çoğu türler, büyüme faktörü olarak çeşitli amino asitler, peptitler, nükleotidler, vitaminler, mineral maddeler, yağ asitleri ve karbonhidratlara ihtiyaç duymaktadır (Reddy ve ark., 2008).

LAB’lar yaşadıkları ekosistemde özellikle heterofermantatiftirler. Tipik LAB türleri *L. fermentum*, *L. paralimentarius*, *L. plantarum* ve *L. sanfranciscensis*’lerdir. Fermentasyon sırasında LAB varlığı belirli çevresel ve teknolojik faktörlere bağlıdır (De Vuyst ve ark., 2014).

1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Fermentasyondaki Önemi

Laktik asit bakterileri ile fermente edilen gıdalar ve yemler insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir yere sahiptirler. Sağlık, beslenme, organoleptik özellik ve gıdaların korunmasında temel rol üstlenen LAB’ın dünya gıda üretimindeki işlevsellik ve

yarayışlılıkları nedeniyle araştırmacılar tarafından büyük ilgiyle takip edilmektedir (Siezen ve ark., 2002).

Fermentasyon sonucu oluşan ürünler gıdalarda patojenik flora ve bozulmanın gelişiminin önlenmesinde koruyucu etkiye sahiptirler. Diasetil, asetaldehit gibi aromatik bileşenler kaliteyi olumlu yönde etkilemekte, ayrıca vitaminler, antioksidanlar, biyoaktif peptitlerin oluşumu da insan sağığı üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Çeşitli fermente edilmiş ürünlerde LAB'ların kullanım alanları Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

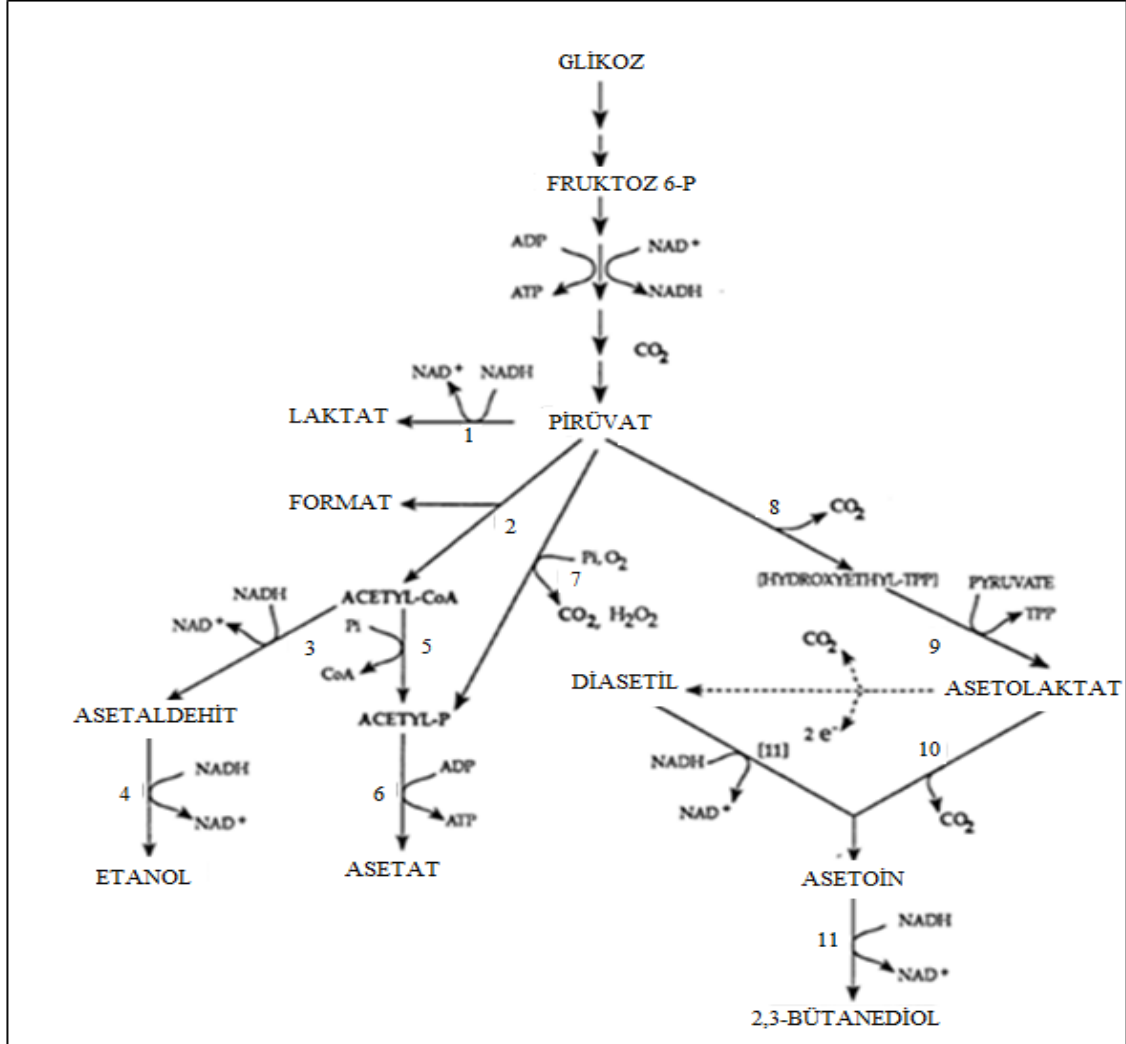
Çizelge 1.1. Laktik asit bakterileri tarafından fermente edilmiş yiyecek ve içecekler (Ross ve ark., 2002).

Fermente Ürünler	Mikroorganizma	Besin
Şarap, bira	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Oenococcus oeni</i>	üzüm, tahıl, şerbetçiotu
Ekmek	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	buğday, çavdar
Cheddar peyniri	<i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> , <i>Leuconostoc</i>	süt
İsviçre tipi peynir	<i>Lactobacillus (delbruckii, bulgaricus, helveticus)</i>	süt
Yoğurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	süt
Kefir	<i>Lactococci</i> , maya, <i>Lactobacillus kefir</i>	süt
Fermente etler	<i>Pediococci</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i>	sığır eti, tavuk eti
Lahana turşusu	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	lahana
Soya sosu	<i>Lactobacilli</i> , <i>Thiobacillus halophilus</i>	soya fasulyesi, buğday
Sebzeler	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus cremoris</i>	sebzeler
Balık	<i>Carnobacterium piscicola</i>	balık

1.4. Laktik Asit Bakterilerinde Pirüvat Metabolik Yol

Laktik asit bakterileri glikoz, laktoz, fruktoz, galaktoz, maltoz, mannoz ve selobiyoz gibi karbon kaynaklarını pirüvat metabolik yolu ile ağırlıklı olarak laktik aside fermente edebilen mikroorganizmalardır. Heterofermentatif LAB, glikoz fermentasyonunda bir molekül glikozdan bir molekül laktik asidin yanı sıra başka metabolitler de üretirler. Bu grupta bulunan LAB; *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* ve *Lactobacillus* cinsleridir. Homofermentatif LAB ise, glikoz fermentasyonu ile bir molekül

glikozdan iki molekül laktik asit oluşturan bakterilerdir ve *Lactococcus*, *Streptococcus* cinslerini içerirler (Caplice ve Fitzgerald, 1999).



Şekil.1.1. *L. plantarum* (NCIMB8826) suşunun metabolik yolunun şematik gösterimi (Ferain ve ark., 1996). LDH (1), pirüvat format-liyaz (2), asetaldehit dehidrojenaz (3), alkol dehidrojenaz (4), fosfotransasetilaz (5), asetat kinaz (6), pirüvat oksidaz (7), pirüvat dekarboksilaz (8), alfa asetolaktat sentaz (9), alfa asetolaktat dekarboksilaz (10), 2,3-bütanediol dehidrojenaz (11).

Homofermentatif olan *Lactococcus lactis* türleri süt şekeri olan laktozu fermente etme yeteneğine sahiptirler (Hugenholtz ve ark., 2002). Bu yolla hem gelişmeleri için gerekli enerjiyi, hem de hücrel aktiviteleri için zorunlu olan metabolitleri oluştururlar. Laktoz fermentasyonunun ana ürünü olan laktik asidin temel özelliği olan asitleşmeyi sağlamanın yanında, ekzopolisakkarit üreterek ürünün yapısal özelliklerini ve alkol,

ketonlar, aldehitler gibi aromatik bileşikler üreterek de ürüne aromatik özellikleri kazandırır (Smit ve ark., 2005).

Laktik asit fermentasyonunda L-Laktat, D-Laktat ve L-D laktat sentezlenmesi mümkündür. LAB, spesifik izomer enzimleri olan D-Laktat ve L-Laktat dehidrojenazı laktat izomerlerini üretmek için kullanırlar. L-Laktat büyümenin ilk safhalarında temel izomerdir, D-laktat ise büyümenin son safhalarına doğru artmaktadır. Aralarındaki oran büyümenin belirli fazlarında farklılık göstermektedir ve pirüvat konsantrasyonu ile pH farklılıkları LDH aktivitesini etkilemektedir (Garvie, 1980).

Karbon kaynağı olarak glikoz veya laktozun bulunduğu oksijenli besi ortamında, metabolik ürün olan pirüvat; LDH enzimi sayesinde %90'dan daha fazla oranda laktik aside dönüşmekte ve homofermentatif özellik kazanmaktadır (Garrigues ve ark., 1997). Şeker kaynağı kısıtlandığında veya oksijensiz besi ortamı şartlarına bağlı olarak *L. lactis*'in homofermentatif özelliği heterofermentatife dönüşmektedir. Heterofermentatif özellik taşıdıklarında; asetat, etanol, format, aseton, asetaldehit ve diasetil gibi diğer metabolitleri oluşturabilmektedirler. Oluşturulan bu metabolitler ve miktarları fermente ürünlerin yapısını, tadını ve aromasını belirlemektedir (Thomas ve ark., 1980).

Oksijensiz şartlarda diğer önemli bir enzim olan pirüvat format liyaz, pirüvatı formata ve asetil CoA'ya dönüştürmektedir. Metabolik yolun daha ileri aşamalarında asetil CoA asetaldehitten sonra alkol dehidrojenaz enzimi ile etanola dönüşmektedir. Sonuç olarak oksijensiz büyüme şartlarında pirüvat, ya pirüvat format liyaz ile formata ya da pirüvat dehidrojenaz ile CO₂'e dönüşmekte ve asetat, etanol ve laktik asit gibi metabolitler meydana gelmektedir (Kessler ve ark., 1991).

Doğal olarak bakteriler tek başlarına, ideal fermentasyondan beklenen metabolitleri üretememektedirler. Bu durum fermentasyon için birden fazla starter kültür kullanılarak veya kullanılacak bakterilerde genetik modifikasyon çalışmaları yapılarak aşılabilmektedir.

1.5. Fermentasyon Sırasında Oluşan Aroma Maddeleri ve Önemleri

Fermentasyon sırasında mayalar ve LAB tarafından çeşitli aromatik maddeler üretilmektedirler. Bunlar arasında en önemlileri; esterler, yüksek alkoller, uçucu asitler ve karbonil bileşikleridir (Cabaroğlu, 1995).

1.5.1. Esterler

Esterler, meyve-sebze ve fermente ürünlerdeki aromaların en önemli aromatik bileşenleri olup, genellikle belirli bir gıdanın karakteristik özelliğini tayin ederler. Esterler, meyvemsi aroma vermelerinden dolayı önemlidirler. Kimyasal veya biyokimyasal yollarla üretilirler (Calderbank ve Hammond, 1994).

Fermente ürünlerde en fazla bulunan etil esterleridir. Bunu izoamil ve propil esterleri takip etmektedir. Etil asetat, izoamil asetat, izobütil asetat, 2-feniletıl asetat ve etıl hekzonat oluşan en önemli esterlerdir (Stewart ve Russell, 1987).

1.5.2. Yüksek alkoller

Yüksek alkoller, karakteristik uçucu bileşiklerin temel gruplarındanır. Etil alkolden daha uzun zincirlidirler. Miktar olarak aroma maddeleri içerisinde önemli bir yere sahiptirler. C₂'den C₁₂'ye kadar olan aynı serideki, hatta daha çok karbon atomu olan bileşiklerdir. Bunlar metanol ve etanolden türemişlerdir. Alkol ve aldehytlerin aroma maddelerine dönüşümünde ortam pH'ının büyük etkisi vardır (Bayrak, 2006).

Etanol, LAB'ların asetaldehiti indirgemesiyle oluşan ve aromatik özelliği olan fermentasyon ürünüdür. Homofermantatif LAB'lar genellikle fazla oranda etanol üretmezler. Çünkü glikoliz sırasında oluşan laktat eşdeğer oranda pirüvatın azaltılmasında kullanılır. Bununla birlikte homofermantatif LAB'lardan genom dizilimleri tahmin edilen *L. lactis* ve *L. plantarum*'lar tarafından potansiyel olarak etanol üretmektedirler. LDH aktivitesi olmayan veya bastırılmış *L. lactis* mutantları sınırlı şeker fermentasyonlarında düşük oranlarda etanol sentezlemektedirler (Willem ve ark., 2004).

1.5.3. Karbonil bileşikleri

Karbonil bileşikleri pek çok meyve-sebze ve fermente ürünün koku maddelerinin önemli bir kısmını oluştururlar. Bu bileşikler, fermente ürünlerin aromasına önemli katkıda bulunurlar. Öte yandan, karbonil bileşikleri karbonhidrat veya sitrat metabolizmasıyla, lipit oksidasyonu ve amino asit indirgenmesinden oluşabilir (Bayrak, 2006). Aldehyt ve ketonları içeren karbonil bileşikler, fermentasyon sırasında oluşan en uçucu bileşiklerdir. Fermentasyon sırasında şekerin parçalanması sonucunda açığa çıkan başlıca karbonil bileşiği asetaldehittir (Cabaroğlu, 1995).

Ketonlardan diasetil (2,3-bütanedion) ve 2,3-pentanedion önemlidir. Diasetil ve 2,3-pentanedion, fermente içeceklerin uçucu bileşikleri arasında büyük bir öneme sahip temel diketonlardır (Nykanen ve Suomalainen, 1983).

Laktik asit bakterileri vasıtasıyla gerçekleşen asetaldehit üretimi, mikroorganizmanın türüne bağlıdır. Bazı araştırmacılar *L. bulgaricus*'un *S. thermophilus*'a göre daha fazla asetaldehit ürettiğini bildirmelerine rağmen (Marshall ve Tamime 1997), bazıları ise bunun tersini savunmaktadırlar (Ott ve ark., 1999). Gıda aroması açısından önemli olan bu bileşikler gıdaya meyvemsi aroma vermekte ve nispi miktarları ürünün muhafaza şartlarına bağlı olarak değişmektedir (Toso ve ark., 2002).

1.5.4. Asitler

Mikroorganizmalarca üretilen asitler bir çok gıdanın aroması için çok önemlidir. Laktik asit, fermentasyon yoluyla elde edilen fermente ürünlerin aroması için en önemli asit olup bununla beraber, fermentasyon sırasında asetik asit, propanoik asit, bütanoik asit, izovalerik asit, pentanoik asit, heptanoik asit, oktanoik asit'de üretilmektedir (Bayrak, 2006).

1.5.5. Diğer bileşikler

Fermente ürünlerde yukarıda belirtilen aroma maddelerinden başka uçucu fenoller, laktonlar, terpenler, norizoprenoidler ve hidrokarbon bileşikleri de bulunur (Cabaroğlu, 1995). Uçucu fenoller aroma maddelerinin kalitatif ve kantitatif olarak küçük bir miktarını oluşturmalarına rağmen fermente içeceklerin aroması üzerine önemli katkıda bulunurlar. Uçucu fenollerin kaynağı, hammaddeye uygulanan işlemler olmakla beraber mikroorganizmalarda (özellikle mayalar), fenolik asitleri uçucu fenollere dönüştürebilirler (Lehtonen ve Juonela- Eriksson, 1983).

Biyokimyasal reaksiyonların büyük bir kısmı enzimatik yolla gerçekleşmektedir. Buradaki enzimler, şekerleri, yağ asitleri ve yağları, amino asitler ve proteinler gibi biyomolekülleri parçalayarak, gıda maddesinin aroması, tekstürü ve lezzeti üzerine etkili olan daha küçük molekül ağırlığına sahip maddeleri oluşturmaktadırlar. Laktik asit bakterilerinin çoğu amino asitlerden aroma bileşenleri sentezleme yeteneğine sahiptirler. Örneğin, *Lactobacillus lactis* spp. *lactic*, *L. lactis* spp. *cremoris*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ve *L. casei* metiyoninden metanetiyoil, dimetilsülfid ve dimetiltrisülfid oluşturma yeteneğine sahiptir (Selgas ve ark., 1993).

1.6. Endüstriyel Starter Kültürler

Doğal ürünlere gösterilen yoğun ilgi nedeniyle; nitrit, nitrat ve sülfatların kullanımı gibi kimyasal koruma yöntemleri yerine fonksiyonel starter kültür ya da laktik asit bakterilerinin bazı suşlarının kullanımı gibi yeni bazı alternatif koruma yöntemlerinden gıdaların raf ömürlerini uzatmak için yaygın şekilde yararlanılmaya başlanmıştır. Yoğurt, peynir gibi fermente süt ürünleri ile bazı sosis, salam ve ekmek gibi fermente ürünlerin üretiminde laktik asit bakterileri starter kültür olarak kullanılan en önemli grubu oluşturmaktadır. Belirtilen grupta yer alan bakteriler asidifikasyon, proteoliz ve aroma oluşumu teşvik gibi çok önemli fonksiyonel ve teknolojik özelliklere sahiptirler. Laktobasillerden, *L. acidophilus*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* ile Bifidobakterilerden *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* gibi özellikle birçok gelişmiş ülkede probiyotik karakteristikleri sertifikaya edilmiş laktik asit bakterilerinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (Gürsoy ve Kınık, 2006).

Starter kültür olmayan laktik asit bakterileri, gıdaların fermentasyonunda oluşan aromanın gelişiminde starter kültürler ile beraber rol almaktadırlar. Bunlar, starter kültürle birlikte laktozu fermente ederek süt proteinlerini peptitlere ve serbest amino asitlere dönüştürmektedirler. Sitratı da lipid, ester ve uçucu metabolitlere parçalayarak aroma maddelerini oluşturmaktadırlar (Fitzsimons ve ark., 1999).

Sosislerde teknolojik ve güvenlik gibi özelliklere sahip starter kültürler elde etmek için laktik asit bakterilerini (*L. plantarum*, *L. paracasei*, *E. faecium* ve *L. sakei*) izole etmişlerdir. Sonuç olarak, *L. paracasei* Al-128 ve *L. sakei* Al-143 suşları yeterli ve güvenli starter kültür olarak seçilebilecek en iyi özelliklere sahip izolatlar olduğunu belirlemişlerdir (Landeta ve ark., 2013).

Bir probiyotik bakteri suşunun seçiminde önemli kriterlerden biride mukozal yüzeye yapışma yeteneğidir. Yapışma süresi, bakterinin hücrenin dış yüzeyinde bulunan protein ya da diğer birleşiklerden kaynaklanmaktadır. Probiyotik bakteri olan *L. plantarum* 299V suşunun hücre dış yüzeyindeki gliseraldehit 3- fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ve enolaz dehidrojenaz (ENO) enzimleri hücre içi yapışma özellikleri ile karakterize edilmektedir. *L. plantarum* 299V suşu glikolitik enzimler sayesinde konakçının mide-bağırsak yoluna yapışmada bir rol oynayabileceği gözlemlenmiştir. Probiyotik olan laktobasillus'lar ile probiyotik olmayan türler hücrenin dış yüzeyindeki GAPDH ve ENO enzimlerinin varlığının belirlenmesinde bir dizi analiz yapılmıştır. Ancak bu enzimlerin

hücre dışı konumu ve uygulanan suşların probiyotik durumu arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Glentinga ve ark., 2013).

1.7. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum diğer laktik asit bakterilerine göre daha yüksek asit toleransına sahip olduğu için meyve ve sebze fermentasyonunu tamamlayan bakteridir. Salatalık ve lahana fermentasyonunda son ürünün kalitesinde ve mikrobiyel dengenin sağlanmasında önemli bir etkiye sahiptir (Lu ve ark., 2003). Büyük çoğunluğu glikoz, mannoz, galaktoz, arabinoz, sakkaroz, maltoz, laktoz, salisin ve rafinozu kullanmaktadır. Bazıları da sorbitol, mannitol, dekstrin, gliserol ve ksilozu kullanarak asit meydana getirmektedir. Ramnoz, nişasta ve inülini, genellikle, fermente edememektedirler. En iyi gelişme sıcaklığı 30-35 °C arasında olmakla birlikte 10-40 °C arasında gelişebilmektedir. Termal ölüm sıcaklığı 65-75 °C'de 15 dakikadır. Süt, peynir, tereyağı, kefir, fermente mısır, hıyar turşusu, domates turşusu gibi gıdalardan izole edilebilmektedir (Pederson, 1938).

Lactobacillus plantarum salatalık, lahana ve zeytin fermentasyonunda sık olarak kullanılan ticari starter kültürlerdir. Özellikle *L. plantarum* ve *L. pentosus* zeytin fermentasyonunda starter olarak kullanılan ana türlerdir (Hurtado ve ark., 2008). Aynı zamanda ekşi hamurda *L. plantarum*, *L. brevis*, *Weisella cibaria* ve *P. pentosaceus* türlerinin baskın LAB türleri olduğu belirtilmiştir (Iacumin ve ark., 2009).

Et ve et ürünleri, süt, peynir, fermente tahıl hamurları, ananas, greyfurt suyu ve silaj gibi çoğu yiyeceklerde bakteriyosin üreten *L. plantarum* suşları olduğu bildirilmiştir (McKay ve Baldwin, 1990; Kelly ve ark., 1996). Belirtilen bakterinin laktik asit üretimi fazla olduğundan silaj materyalinin korunması amacıyla da kullanılmaktadır (Badii ve ark., 1989). Son yıllarda genetiksel olarak geliştirilen *L. plantarum* suşları gıda fermentasyonunda kullanılmaktadır (Duckworth ve ark., 1993). Ayrıca, ürettikleri antimikrobiyal birleşikler Gram (+) ve Gram (–) bakterilerin gelişmelerini inhibe etmektedir (Lash ve ark., 2005). Laktoz, sükroz, glikoz ve fruktoz'un laktik aside dönüşümünde kullanılan en avantajlı bakteridir. Çünkü, sadece yüksek dönüşüm oranlarında şekerleri değil aynı zamanda bitkisel ürünlerde bulunan pektin gibi diğer bileşikler de kullanılmaktadır (Demir ve ark., 2006).

L. plantarum probiyotik aktivite gösteren türler arasında yer almaktadır. Probiyotikler patojen ve kommensal kolonilerin konak dokulara yapışması sürecinde önemli bir adımı temsil etmektedir. Çünkü bu bakteriler konak seçiminde önemli katkılarının olduğu tespit edilmiştir. *L. plantarum* LM3 suşunun pirüvat dehidrojenaz kompleks birleşeni olan pirüvat dehidrojenaz El beta (PDHB) alt biriminin bağlanmasında katkıda bulunan önemli bir faktör olduğunu belirtmişlerdir (Vastanoa ve ark., 2014).

1.8. Laktik Asit Bakterilerinin Plazmit Özellikleri

Çoğu bakterilerde, bazı maya ve mantarlara özgü kromozomlardan ayrı olarak bulunan bir başka kalıtsal yapıya plazmit adı verilmektedir. Plazmitler temelde hücre kromozomlarından ayrılarak oluşan sirküler kalıtsal yapılardır. Hücre bölüneceği zaman genomik DNA gibi plazmitler de replike olur (Dilsiz, 2009).

Lactobacillus türleri içerisinde plazmitlerin varlığı, bu cinslerin ilk keşfinden beri bildirilmektedir. Laktobasil türlerinin bir kaçında bakteriyosin üretimi, bağışıklık, laktoz metabolizması ve antibiyotik dirençliliği gibi fenotiplerin ekstra kromozomal DNA'ya bağlı olduğu bilinmesine rağmen plazmitlerin varlığı halen tam olarak açıklanmamıştır. *L. plantarum*'da plazmit sayısının 5-16 arasında değiştiği boyutlarının ise genellikle 2-68 kb arasında olduğu bildirilmiştir (Ruiz-Barba ve ark., 1991).

Bakterilerin fermentasyon yetenekleri yalnızca kromozom üzerindeki genlerden kaynaklanmamaktadır. Bakteriler gelişme sürecinde zamanla diğer mikroorganizmalardan genetik materyal olan plazmitleri kazanabilmektedirler. Bu plazmitler bakterilere olumsuz şartlarda dayanıklılık sağladıkları gibi aroma sebebi olarak tarif ettiğimiz metabolitleride üretebilecek genleri de taşıyabilmektedirler (Aşlın ve Beyatlı, 2004).

1.9. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Özellikleri

Antibiyotik dirençlilik doğal olarak bulunabildiği gibi sonradan da kazanılmış olabilmektedir. LAB'ın doğal olarak bazı antibiyotiklere direnç kazanmıştır. Probiyotik suşların seçilmesi ve güvenliği, sindirim sisteminin sağlığı için patojenik olmayan ve antibiyotik direnç geni taşımayan bakteriler tercih edilmelidir. *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Leuconostoc* ve diğer gram pozitif bakterilerden bazıları doğal olarak basitrasin, sefoksitin, siproflaksasin, fusidik asit, kanamisin, gentamisin, metronidazol, nitrofuratoin,

norflaksasin, streptomisin, sülfadiazin, teikoplanin, trimetoprim ve vankomisine dirençlilik göstermektedir (Hamilton Miller ve Shah, 1998; Danielsen ve Wind, 2003).

Lactobacillus, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait 45 LAB suşunun eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin ve β -laktam (%7)'a, buna karşılık gentamisin, streptomisin ve siprofloksasine karşı %70'den fazla direnç gösterdikleri belirtilmiştir (Hummel ve ark., 2007).

Antibiyotiklerin klinik kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra bakterilerde direnç ortaya çıkmıştır. Geliştirilen her yeni antibiyotikle birlikte bakterilerde de yeni direnç mekanizmaları tanımlanmıştır. Bugün çok iyi bilinmektedir ki; antibiyotiklerin bilinçsiz kullanılması dirençli bakteri kökenlerinin hızla yaygınlaşmasına yol açan en önemli faktördür.

1.10. Biyojen Aminler ve Genel Özellikleri

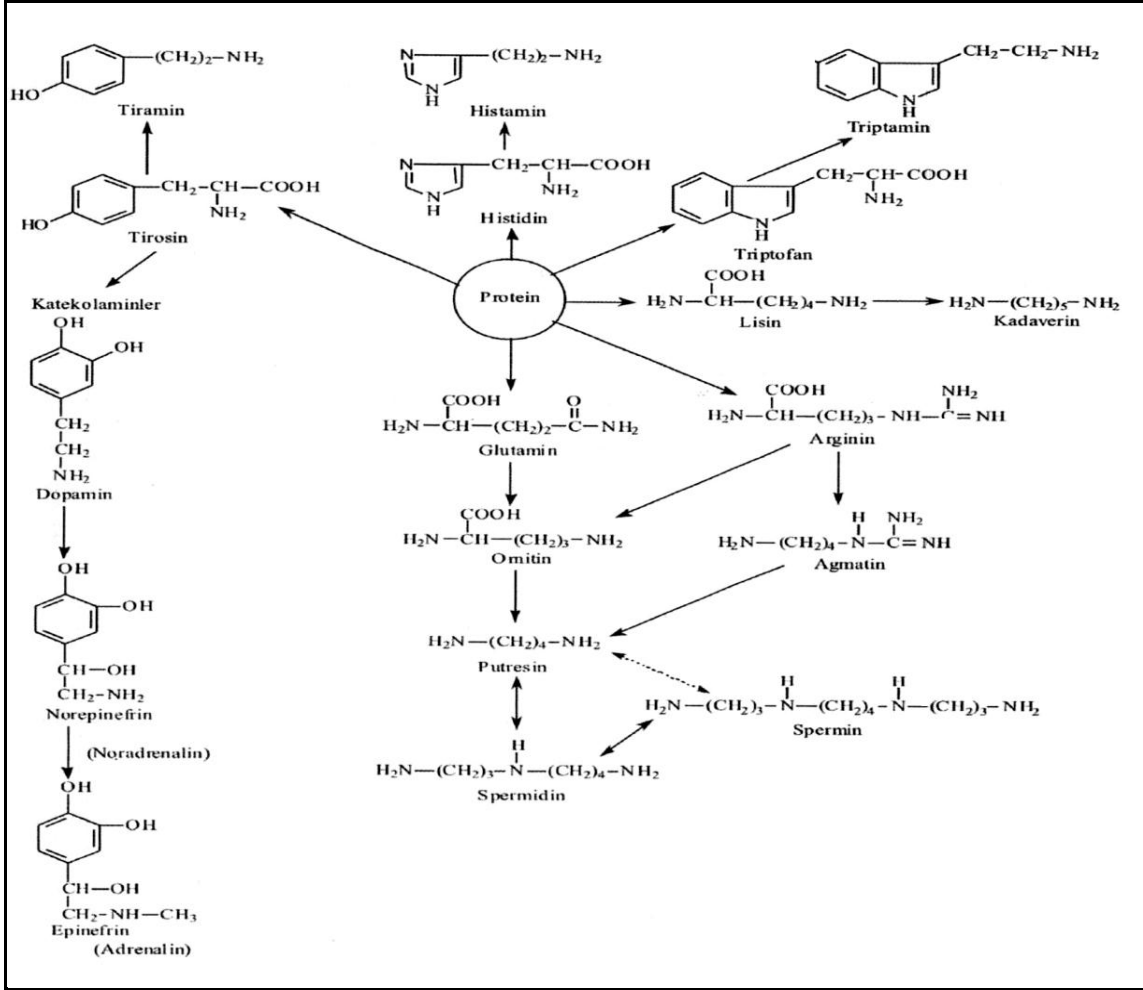
Biyojen aminler doğal olarak bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunan organik bazlı, küçük molekül ağırlıklı azotlu bileşiklerdir ve canlı hücrelerde önemli metabolik işlevleri vardır (Ten Brink ve ark., 1990; Maijala ve Eerola, 1993).

Biyojen aminler, aminoasitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve keton gruplarının transaminasyonu ile oluşan azotlu bileşiklerdir. Gıdalarda biyojen amin oluşumu, gıdalarda var olan aminoasitlerin dekarboksilasyonu ve enzimatik aktivite için uygun koşulların oluşmasıyla dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip mikroorganizmaların faaliyeti sonucu meydana gelmektedir (Shalaby, 1996).

Biyojen aminler, gıdalarda bazı spesifik amino asitlerin dekarboksilasyonuna (glutamik asit ve arginininden putresin, histidinden histamin, tirozinden tiramin, triptofandan triptamin, fenilalanininden feniletilamin, lisinden kadaverin (mono aminler)) veya aldehit ve ketonların transaminasyonuna bağlı olarak oluşan temel azotlu bileşiklerdir. En yaygın olarak histamin ve tiramin bilinmesine rağmen triptamin, putresin, kadaverin, serotonin, spermidin, spermin, agmatin ve feniletilamin gibi aminler de birçok gıdada dekarboksilaz aktiviteleri sonucu oluşmaktadır (Maijala ve ark., 1995).

Balık ve ürünleri, et ve ürünleri, süt ürünleri, şarap, bira, meyve ve sebzeler, çikolata, fermente sebze ürünleri gibi gıdalarda biyojen aminler meydana gelebilmektedir (Silla-Santos, 1996).

Kadaverin, putresin, histamin, tiramin, triptamin gibi biyojen aminler Şekil 1.1.'de gösterdiği biçimde sırasıyla lisin, ornitin, histidin, tirozin ve triptofan aminoasitlerinin dekarboksilasyonu sonucu oluşmaktadır (Moret ve Conte, 1996).



Şekil 1.2. Gıdalarda biyojen amin oluşumunun metabolik yolu (Halasz ve ark., 1994).

Gıdalarda aminoasitleri dekarboksilaz enzimi ile indirgeyen ve biyojen amin oluşumuna neden olan birçok mikroorganizma izole edilmiştir. Patojenlerin yanı sıra patojen olmayan ve starter kültür özelliği taşıyan türlerin de bulunduğu bildirilmektedir. Bu mikroorganizmalardan *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Photobacterium* türleri, Enterobakterilerden; *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* ve *Shigella* türleri, mikrokok ve stafilokoklardan; *Staphylococcus* ve *Micrococcus* türleri, laktik asit bakterilerinden; *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* türleri ile mayalardan; *Debaryomyces* ve *Candida* türleri sayılabilir (Suzzi ve Gardini, 2003).

1.11. Biyojen Amin Oluşumuna Etki Eden Faktörler

Gıdalarda biyojen aminlerin üretimi, hem dekarboksilaz enzim üretme yeteneği olan mikroorganizmaların varlığına, hem de uygun kofaktör ve/veya bir indükleyici ile dekarboksilaz enzim sentezi için şartların uygunluğuna bağlıdır. Bu nedenle tehlikeli düzeyde biyojen amin oluşumundan sakınmak amacıyla oluşumu etkileyen kritik faktörlerin mutlaka bilinmesi gerekmektedir (Maijala ve ark., 1995). Serbest amino asitlerin varlığı, dekarboksilaz pozitif mikroorganizmaların varlığı, bakteriyel gelişim, dekarboksilaz sentezi ve aktivitesine izin veren şartların olması ile biyojen amin üretimi gerçekleşmektedir (Silla-Santos, 1996).

Yüksek sıcaklık, serbest amino asit varlığı, tuz miktarı, başlatıcı kültür konsantrasyonu, olgunlaşma, ısıtma işlemi ve oksijenin gıdalarda biyojen amin oluşumunu etkileyen önemli faktörler arasında olduğu belirtilmektedir (Halász ve ark., 1994).

Gıdalarda uygun sıcaklık (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) biyojen 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).

1.12. Sağlık Açısından Biyojen Aminlerin Önemi

Biyojen aminler gıdalarda iki nedenden dolayı önem arz etmektedirler. Birincisi, biyojen amin miktarının kalite indikatörü olarak kabul edilir olması, ikincisi ise sağlığı etkileyen toksik etkilerinin bulunmasından ileri gelmektedir. Gıdaların mikrobiyel bozulması sırasında dekarboksilaz aktivitesi arttığından biyojen aminlerin varlığı gıda bozulmasının göstergesi olması açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle amin miktarı mikrobiyel bozulmanın bir indikatörü olarak değerlendirilmektedir (Bardöcz, 1995).

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).

Gıdalarda biyojen aminlerin varlığı hijyen kalitesinin bir göstergesidir. Biyojen aminler, özellikle hassas bireylerde toksik etkileri nedeniyle sağlık yönünden tehlikeli sonuçlara neden olabilmektedir. Bu nedenle biyojen aminleri kontrol etmek ve azaltmak önem arz etmektedir (Ercan ve ark., 2013).

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 ve ark., 1991).

Gıdalarda düşük seviyedeki biyojen aminler ciddi bir risk olarak görülmez. Ancak, tüketilen miktar yüksek ise veya amin katabolizmasının normal rotasını inhibe ediyorsa, hipotansiyon (histamin, putresin, kadaverin varlığında), hipertansiyon (tiramin varlığında), mide bulantısı, baş ağrısı, kızarıklık, baş dönmesi, kalp çarpıntısı, kusma ve hatta beyin kanaması, anafilaktik şok sendromu ve ölüm gibi çeşitli fizyolojik etkilerle sonuçlanabilir (Lonvaud-Funel, 2001; Lange ve ark., 2002). Biyojen aminlerden;

Histamin: Damarları genişleterek kan basıncını düşürür. Hipotansiyon, mide bulantısı, kusma, yüz kızarması, baş ağrısı, karın ağrısı, boğaz yanması, susuzluk, dudak şişmesi ve vucutta kızarıklık meydana getirir (Shalaby, 1996).

Putresin: Hipotansiyona neden olur. Diğer aminlerin toksisitesini artırır (Shalaby, 1996).

Kadaverin: Çene kilitlenmesine diğer aminlerin toksisitesini artırır (Shalaby,1996).

Putresin, kadaverin, spermin ve spermidin gibi poliaminler, nitrit varlığında kanserojenik nitrozaminleri de oluşturabilmektedir (Izquierdo ve ark., 1996). Bir diamin olan putresin ve kadaverinin nitrit ile reaksiyona girerek heterosiklik kanserojenik nitrozamin olan nitrozoprolidin ve nitrozopiperidini oluşturduklarını belirtmişlerdir (Warthesen ve ark., 1975).

Biyojen aminlerin toksikolojik etkileri, Food and Drug Administration (FDA) kodeksinde belirtilen (50 mg/kg) miktardan fazla alındığı takdirde, sindirim sisteminde bulunan mono diaminooksidaz ve diaminooksidaz enzimlerinin genetik olarak eksikliğinde, bu enzimleri inhibe edici ilaçlar kullanıldığında (ağrı kesiciler, stres ve

depresyon ilaçları, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar), gastrointestinal rahatsızlık durumunda veya yüksek miktarlarda alkol tüketildiğinde artmaktadır (Lonvaud-Funel, 2001).

1.13. Biyojen Aminlerle İlgili Tavsiye Edilen Sınır Değerleri

Biyojen aminlerle ilgili sınır değerlerinin belirlenmesi oldukça zordur, çünkü detoksifikasyon mekanizması kişiden kişiye değişmektedir (Halasz ve ark., 1994). Amerika Birleşik Devletlerinde FDA tarafından scombroid veya scombroid benzeri balıklarda histamin için maksimum izin verilebilir düzey 50 mg/kg olarak belirlenmiştir. Aynı sınır Avrupa Birliği yönetmeliklerinde 100 mg/kg'dır. Almanya'da balık ve balık ürünlerinde histamin için yasal sınır olarak maksimum izin verilebilir limit 200 mg/kg olarak belirtilmiştir. Kanada, Finlandiya ve İsviçre'de ise bu sınır değeri 100 mg/kg'dır (Lange ve Wittmann, 2002).

Avrupa Birliği'nin 91/493 CEE kodlu direktifinde histaminin toksik limit değeri balıklarda 10-20 mg/100g olarak bildirilmiştir (Anonymous, 1991). Türk Gıda Kodeksinde sadece balıklar ve şaraplar için ve yalnız histamine ait kabul edilebilir en yüksek değerler ppm olarak yer almaktadır. Balıklar için 200 mg/kg, şaraplarda ise 10 mg/l sınır değeri verilmiştir (Anonymous, 1997). Toksik doz tamamen bireyin detoksifikasyon mekanizmasına bağlı olmakla birlikte, gıdalar için > 100 mg/kg, içecekler için > 20 mg/l olarak belirtilmektedir (Ayhan ve Durlu-Özkaya, 2007).

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 monoaminooksidaz (MAO) inhibitör ilaçları alan hastalar için güvenli olmadığı belirtilmektedir (Izquierdo ve ark., 1996). Bu nedenle biyojen amin indeksinin (BAI) resmi bir kalite kriteri olarak kullanılması ve biyojen aminlerin toksik limitlerinin ürün etiketleri üzerinde belirtilmesi önerilmektedir (Ayhan ve Durlu-Özkaya, 2007).

1.14. Gıdalarda Biyojen Amin Analiz Yöntemleri

Histamin ve diğer biyojen aminlerin nitel ve nicel tayinleri için florimetri, kromatografi, kapiler elektroforez v.b. gibi teknikler kullanılmaktadır. Bunların içerisinde kromatografik yöntemler en uygun yöntemlerdir. İnce tabaka kromatografisi (TLC), gaz-sıvı kromatografisi (GLC) ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) biyojen amin analizlerinde yoğun bir şekilde kullanılan kromatografik yöntemlerdir (Shakila ve ark., 2001). Bunlar içinde HPLC analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen bileşiklerin ayırt edilmesine olan uygunluğudur. Bu tip bileşiklere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, ilaçlar ve pestisitler verilebilir (Önal, 2006).

1.15. Çalışmanın Önemi ve Amacı

Doğal fermente gıdalar aromatik özellikleri nedeniyle severek tüketilen yöresel ürünlerdir. Geleneksel metotlarla yapılan turşular, mikrobiyal içeriği tam olarak bilinmeyen birden fazla tür ve alt türün karışık olarak kullanıldığı fermente ürünlerdir. Aromatik olarak istenilen bazı özellikleri ürüne kazandıran bu karışık mikroorganizma kültürlerinin genetik içeriklerinin ve metabolik kapasitelerinin tür ve suş düzeyinde belirlenerek endüstriye kazandırılması ekonomik açıdan önem arz etmektedir.

Doğal mikroorganizmalar istenilen aromayı oluşturmada önemli starter kültürler olarak görülmekte ve halk tarafından kabul görmektedir. Bu starter kültürlerin genetik özellikleri, ekstra kromozomal yapı olan plazmitler tarafından belirlenebileceği gerçeği unutulmamalıdır. Çünkü bu mikroorganizmalar bulundukları doğal ortamlarda komşu oldukları patojen mikroorganizmalar ile karşılıklı olarak yatay gen transferi yapabilmektedirler. Bu nedenle gıda kalite ve güvenliğinin sağlanması ve sürekliliği açısından, özellikle gıda endüstrisinde rol alan laktik asit bakterilerinin özelliklerinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde fermente et ürünlerinden sucuk ve çeşitli peynirlerde biyojen amin miktarları konusunda yapılmış çeşitli araştırmalar bulunmakla birlikte Türk mutfağında kış mevsiminde yaygın olarak tüketilen turşuların üretim sürecinde biyojen amin oluşumu ve piyasada satışa sunulan turşuların biyojen amin içerikleri ile ilgili yapılmış birkaç çalışma mevcuttur.

Bu çalışmada geleneksel olarak üretilen çeşitli tipteki turşu örneklerinin, mikrobiyolojik, biyojen amin ve aromatik içeriklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırma sonuçlarının, sağlık açısından önem taşımakla birlikte, pratikte turşu üretimi yapan firmalara yönelik bilgiler açısından yararlı olacağı düşünülmektedir. Pek çok ülkede biyojen amin indeksi uygulamaları başlamışken, ülkemizde geleneksel ve ticari olarak üretilen çeşitli fermente ürünlerindeki biyojen amin miktarlarının belirlenmesi için çalışmaların yapılması son derece önemlidir.

Bu çalışmanın temel amacı, gıda endüstrisinde kullanılan starter kültürlerden *L. plantarum* suşlarını Türkiye genelinden rastgele toplanan geleneksel turşu örneklerinden izole etmektir. Daha sonra bu izolatları kimyasal ve moleküler olarak tür düzeyinde tanımlamalarını yapmak ve aromatik profile olumlu katkı sağladığı bilinen plazmit içerikli laktik kültürleri belirlemektir.

Ayrıca *L. plantarum* suşlarında bulunan, histamin, kadaverin ve putresin olmak üzere üç biyojen aminin üretim potansiyellerinin HPLC yöntemi ile mg/L cinsinden ölçülmesi hedeflenmektedir. Son olarak bu kültürlerin aromatik madde (format, pirüvat, laktat, etanol, 2,3-bütanediol) içeriklerini ve miktarlarını HPLC cihazı ile belirlemek ve böylece bu kültürlerin bazı kalite kriterlerine göre (biyojen amin üretimi, antibiyotik dirençlilik, aromatik madde...) uygunluğunu tespit etmektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Biyojen Amin Üretimi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Fermente sosislerde biyojen amin oluşumu üzerine bir amin-negatif karışık starter kültürün (*L.plantarum* ZY40+ *S. cerevisiae* 18 JM19) etkisi araştırılmıştır. Putresin, kadaverin ve tiramin sosis fermantasyon sırasında oluşan ana aminler olarak tespit etmişlerdir. Bu sosisler starter kültür katılmamış sosislerle karşılaştırıldığında tiramin, putresin ve kadaverin içeriğinde büyük ölçüde azalma olduğunu gözlemlemişlerdir (Nie ve ark., 2014).

Avrupada at, sığır ve hindi etinden yapılan olgunlaşmış sosisler 4 °C’de 28 gün depolanarak oluşabilecek serbest amino asitler ve biyojen aminlerin konsantrasyonu izlenmiştir. Putresin için maksimum seviyeler, hindi sosisinde 285 mg/kg ve dana sosisinde 278 mg/kg, kadaverin için maksimum seviyeleri, hindi sosisinde 6 mg/kg iken sığır sosisinde ise 9 mg/kg ve histamin için maksimum seviyeler ise hindi sosisinde 263 mg/kg ve sığır sosisinde 26 mg/kg olarak tespit edilmiştir (Rabie ve ark., 2014).

Belicova ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, on adet *L. plantarum* suşu dekarboksilaz ortamı içinde histamin, tiramin ve putresin sentezleme potansiyelleri incelenmiştir. Bu suşlardan *L. plantarum* CK06, *L. plantarum* LM11 ve *L. plantarum* ZS11 tirozini dekarboksile ederek ilgili biyojen amin olan tiramini sentezlemiştir. Hiçbir izolat histamin ve putresin sentezlememiştir. Bu çalışmada, test edilen *L. plantarum* izolatlarının çoğu bu biyojen aminleri oluşturma yeteneğine sahip olmadıkları belirlenmiştir.

Fermente sosislerde biyojen amin birikimini azaltmak için bir amin-negatif *L. plantarum* ZY-40 suşunun yeteneği incelenmiştir. Bu çalışmada mikrobiyolojik büyüme, pH ve serbest amino asit üretimi gibi parametreler değerlendirildi. Sosis fermantasyonu sırasında putresin, kadaverin ve tiramin biyojen aminleri tespit edilmiştir. *L. plantarum* ZY-40 suşu % 70 oranında putresin ve kadaverin sentez oranını azaltırken, tiramin sentezide herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir (Zhang ve ark., 2013).

Laktik asit bakterilerinin (LAB) iki farklı amino asit (histidin ve tirozin) içeren sıvı besiyerinde biyojen amin üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bakteriler tarafından üretilen biyojen amin üretimi bakımından önemli farklılıklar gözlenmiştir. LAB üyeleri histidin dekarboksil sıvısında tiramin, tirozin dekarboksil sıvısında ise dopamin ve serotonin üretiminde artırıcı özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Toy ve ark., 2013).

Callejon ve ark. (2013), şaraptaki enzimatik faaliyetlerin yıkımından sorumlu laktik asit bakterilerinin (LAB) biyojen amin sentezleme oranlarının azaltılması için çalışmışlardır. Toplamda 76 LAB suşu % 53 oranında histamin, tiramin ve putresin ile oluşan bir karışım karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu izolatlardan *L. plantarum* J16 ve *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 suşunda amin dehidrojenazından sorumlu enzimlerin varlığı belirlenmiştir.

Çin’de geleneksel olarak düşük tuzda fermente edilen balıklardan izole edilen toplam 21 *L. plantarum* suşunu biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması yapılmıştır. İzolatlardan starter kültür olabilecek suşların belirlenmesi için asitleştirici, proteoliz, lipoliz, antimikrobiyal aktivite ve biyojen amin üretim yetenekleri araştırılmıştır. İzolatların çoğu negatif-dekarboksilaz aktiviteye sahip olduğu, ancak *L. plantarum* 10 suşu L-tirozin’e karşı bir dekarboksilaz aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir (Zeng ve ark., 2013)

Ikoni ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, Sırp geleneksel kuru fermente sosislerini 120 gün boyunca süren olgunlaşma dönemindeki proteolitik değişiklikler ve biyojen aminlerin oluşumunu incelemişlerdir. Toplam biyojen aminler 113-332 mg/kg arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Gıda güvenliği açısından en önemli biyojen amin olan histaminin varlığı tespit edilmemiştir.

Elma suyu ve şaraptaki laktik asit bakterilerinin (LAB) özellikle putresin üretimini incelemişlerdir. Farklı habercilerden putresin üretimini belirlemek için, PCR ve TLC tekniklerinin kullanılmıştır. LAB’lar arasında, tek bir *L. hilgardii* ve bir *Pediococcus pentosaceus* suşunun putresin ürettiğini tespit etmişlerdir (Costantini ve ark., 2013).

Gezginç (2010) yaptığı çalışmada, yoğurttan izole edilen laktik asit bakterilerinin (*S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*) amonyak ve 12 farklı biyojen amin (putresin, kadaverin, spermidin, triptamin, 2-feniletülin, spermin, histamin, serotonin, tiramin, trimetil amin, dopamin, agmatin) üretme özelliklerini 5 farklı amino asit (tirozin, lizin, histidin, ornitin, arjinin) ekli besi ortamında incelenmişlerdir. *S. thermophilus*’lar 0.03-12487.99 mg/l, *L. bulgaricus*’ların ise; 0.2-6153.36 mg/l biyojen amin ürettiği tespit edilmiştir. Biyojen amin üretme özelliğinin türler arasında ve tür içinde farklılık gösterdiğini belirlemişlerdir.

Özdestan ve Üren (2010), Türkiye’de farklı üreticilerden aldıkları 20 şalgam örneğinin biyojen amin içeriğini araştırmışlardır. Putresin, kadaverin, histamin ve tiramin varlığını tüm şalgam örneklerinde tespit etmişlerdir. Putresin en yaygın bulunan biyojen

amin olup konsantrasyonu 5.0-42.3 mg/l aralığında olup, toplam biyojen amin içeriğinin ise 26.7-134.3 mg/l aralığında değişim gösterdiğini belirlemişlerdir.

Changyuan ve ark. (2010), biyojen amin üreten LAB'ın belirlenmesi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Fermente et ürünlerinden izole ettikleri *L. plantarum* suşundaki biyojen amin sentezini HPLC cihazı kullanarak tespit etmişlerdir. Histamin 211.03 µg/ml oranında sentezlenirken, tiramin'in ise 144.43 µg/ml oranında üretildiği tespit edilmiştir.

Özdestan ve Üren (2010), fermente bir süt ürünü olan kefirde tiramin, putresin, kadaverin ve spermidin varlığını tespit etmişlerdir. Kefir örneklerindeki toplam biyojen amin miktarı 2.4-35.2 mg/l arasında değişim gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Coşansu (2009) tarafından yapılan çalışmada, boza örneklerindeki biyojen amin oranları geniş bir varyasyon göstermiştir. Yirmibir boza örneğinin 18'inin en az bir biyojen amini içerdiği ve biyojen amin konsantrasyonlarının en yüksekten düşüğe doğru tiramin, kadaverin, triptamin, putresin, β-feniletilamin ve histamin şeklinde sıralandığını belirlemiştir.

Tamang ve ark. (2009), fermente sebzelerden izole ettikleri LAB'ların biyojen amin sentezi üzerine araştırma yapmışlardır. Bu izolatların dekarboksilaz aktivitelerini belirlemek için kullandıkları besiyerine histidin, lizin, ornitin ve tirozin ilave etmişlerdir. Birkaç suş haricinde çoğu laktik asit bakterisinin biyojen amin üretmediği sonucuna varmışlardır. *L. brevis*'in sekiz suşunda ve *Leuconostoc lactis* SdR2 (BFE926) suşu genel olarak ornitini dekarboksile ettikleri sonucuna varmışlardır.

Yeğin ve Üren (2008), benzoil klorür ile türevlendirdikleri boza örneklerini HPLC cihazı ile analiz etmişlerdir. Bütün boza örneklerinde tiramin, putresin ve spermidin varlığını belirlemişlerdir. En yüksek oranda tiramin varlığı gözlemlenmiştir. Boza örneklerinin toplam biyojen amin miktarı ise 13-65 mg/kg aralığında değişim gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Garai ve ark. (2007), doğal elma suyundan izole edilen LAB'larda histidin, tirozin ve ornitin dekarboksilaz enzim aktivitesi oluşumunu araştırmışlardır. Test edilen 54 adet laktik asit bakterisi arasında 6 suşun (5 adet laktobasil ve bir adet *Oenococcus* sp.) biyojen amin ürettiğini tespit etmişlerdir.

Landate ve ark. (2007), şaraptan izole edilen 155 laktik asit bakteri suşu, 40 asetik asit bakteri suşu ve 36 maya suşunun biyojen amin üretim oranlarını HPLC ile analiz etmişlerdir. Maya ve asetik asit bakterileri biyojen amin üretmezken, LAB'leri ise

histamin, tiramin, feniletilamin ve putresin sentezlediğini belirlemişlerdir. Buna bağlı olarak bu çalışmada LAB'lar şarapta histamin, tiramin, feniletilamin ve putresin oluşumundan sorumlu mikroorganizmalar olabileceğini düşünmüşlerdir.

Ergen (2006), sofralık yeşil ve siyah zeytin örneklerinde biyojen amin miktarlarının belirlenmesi üzerine yaptığı çalışmasında, zeytinlerde en yüksek konsantrasyona sahip biyojen aminler triptamin, tiramin ve feniletilamin olduğu belirlenmiştir. Belirlenen değerler içerisinde en düşük konsantrasyon aralığına sahip biyojen aminin histamin olduğu, rastlanma sıklığı bakımından en düşük biyojen aminin ise spermin olduğu görülmüştür. Zeytin örneklerinde belirlenen feniletilamin, putresin, histamin, tiramin ve toplam biyojen amin miktarlarının toksit limitlerin altında olduğunu bildirmiştir.

Akbaş (2006), değişik turşularda biyojen amin miktarları üzerine yaptığı çalışmasında en yüksek konsantrasyona sahip biyojen aminler putresin, kadaverin ve triptaminin olduğu, en düşük konsantrasyona sahip biyojen aminin ise spermin olduğunu belirlemiştir.

Ekici ve Coşkun (2004), Van ilindeki marketlerden toplanan 50 adet sebze turşusu örneğinde (28 adet karışık, 6 adet kırmızıbiber ve 7 adet hıyar turşusu) histamin içeriğini fluorometrik yöntem kullanarak araştırmışlardır. Turşu örneklerinde histamin seviyesinin 16.54-74.91 mg/kg (ortalama 30.73 mg/kg) arasında değiştiğini belirlemişlerdir. En yüksek histamin konsantrasyonu ise 74.91 mg/kg ile kırmızıbiber turşusu örneklerinde belirlemişlerdir.

Spicka ve ark. (2002) tarafından 6 farklı çeşit lahanadan yapılmış 121 susuz lahana turşusunda (sauerkraut) gerçekleştirilen çalışmada, tiramin ve putresin konsantrasyonları yüksek seviyelerde tespit etmişlerdir. Kadaverin ve spermidin orta ve düşük düzeylerde, histamin, triptamin ve spermin daha düşük konsantrasyonlarda bulunmuştur. Bu çalışmada 3 farklı starter kültürün biyojen amin oluşumu üzerine etkileride tespit edilmiştir. *Lactobacillus buchneri* ve *Enterococcus faecium* bakterileri tirozini dekarboksile ederek tiramin amin oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir.

Yücel ve ark. (2001), işletmelerde ticari olarak üretilmiş 10 adet lahana turşusu örneğinde putresin, kadaverin, triptamin, spermin, spermidin, histamin ve tiramin biyojen aminlerini HPLC cihazı kullanarak araştırmışlardır. Bütün örneklerde bu biyojen aminlerden putresin, spermin ve tiraminin varlığını tespit etmişlerdir. En yüksek değerler açısından putresini 21.5 mg/kg, kadaverini 12.1 mg/kg, triptamini 14.3 mg/kg, spermini

11.8 mg/kg, spermidini 14.1 mg/kg, histamini 10.9 mg/kg ve tiramini 14.7 mg/kg oranında bulmuşlardır. Turşuların toplam biyogen amin içeriklerinin ise 15.85-89.50 mg/kg arasında değişiklik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Arena ve Manca de Nadra (2001), laktobasil suşlarının şarap ve meyve sularındaki ana aminoasitlerden ornitin ve arjininden putresin ve agmatin sentezi üzerine çalışmışlardır. *L. hilgardii* X1B suşunun şarapta arjinin ve ornitinden putresin ve agmatin üretebildiğini belirlemiştir. Meyve sularında zararsız bozulma etmeni olarak bilinen *L. plantarum* 'unda biyogen amin üretebildiğini tespit etmiştir.

Garcia-Garcia ve ark. (2000) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, paketlenmiş kapari turşusunda putresin, spermin, histamin ve tiramin varlığını tespit etmişlerdir. Histamin yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur. Ayrıca kapari meyvesinin turşusunda bu biyogen aminlere ek olarak kadaverinin varlığını gözlemlemişlerdir. Kadaverin birçok örnekte 0- 9.5 mg/kg arasında olduğunu bulmuşlardır.

Bover-Cid ve Holzapfel (1999), farklı orijinli LAB'lardan tiramin, putresin, histamin ve kadaverin oluşumu araştırılmıştır. Bazı laktobasil suşlarının, özellikle *L. curvatus*, *L. brevis* ve *L. buchneri*'nin önemli miktarda tiramin ürettikleri belirlenmiştir. Bazı *Leuconostoc* ve *Weissella* türleri ile pediokoklar herhangi bir amin üretimi göstermemiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan suşların histamin üretmediğini tespit etmişlerdir.

Sumner ve ark. (1990), çiğ süttten yapılan peynirden beş tane histidin ve bir tane tirozini dekarboksile eden suş izole etmişlerdir. Bu suşlardan histidini dekarboksile edebilen *Lactobacillus buchneri*, tirozini dekarboksile edebilen suşun ise *Lactobacillus brevis* olduğunu bildirmişlerdir.

Choudhury ve ark. (1990), *Leuconostoc oenos* DSM 20252 ve *Lactobacillus buchneri* (Lb14 veSt2A) nin iki suşu tarafından biyogen amin oluşumunu araştırmışlardır. Uygun şartlar altında *L. buchneri*' nin iki suşu 24 saat içinde %90 oranında histamin üretirken, *L. oenos* DSM 20252 ise sadece tirozin ürettiğini belirlemişlerdir.

2.2. Biyogen Amin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Gıdalarda biyogen amin varlığı serbest amino asitlerin durumuna, (özellikle hammadde ve/veya ilave başlatıcı kültürden) biyogen amin enzimleri üreten mikroorganizmaların varlığına, büyümeye (özellikle sıcaklık, pH) izin veren koşullar ve

enzim aktivitesini (özellikle düşük pH) etkileyen koşulları gibi temel ön şartlara bağlıdır (Loizzo ve ark., 2013) .

Anita ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, şarap yapımı sırasında uygulanan farklı maserasyon uygulamaları ile üzüm kabuklarındaki ekstre bileşiklerin biyojen amin oluşumu üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak, geleneksel ve genişletilmiş maserasyon uygulamalarıyla yüksek konsantrasyonlarda biyojen aminlerin varlığını tespit etmişlerdir.

Yaldırak (2011), geleneksel yolla ürettiği şalgam suyunda farklı sıcaklık konsantrasyonları uygulayarak biyojen amin oluşumu üzerine etkilerini incelemiştir. Triptamin, feniletilamin ve putresin oluşumu fermantasyonun 1. 2. ve 3. günlerinde 35°C'deki üretim 25°C ye oranla önemli miktarda az oluştuğu belirlenmiştir. Ancak triptamin ve putresin konsantrasyonundaki bu farkın fermantasyonun 4. ve 5. günlerinde ortadan kalktığı, feniletilamin konsantrasyonunun ise fermantasyonun 4. ve 5. günlerinde ise 35°C'deki üretim oranının daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Yüksel (2010), geleneksel yolla ürettiği şalgam suyuna farklı tuz konsantrasyonları uygulayarak biyojen amin oluşumu üzerine etkilerini incelemiştir. Toplam biyojen amin oluşumuna bakıldığında tuz konsantrasyonunun artışı ile biyojen amin oluşumunun azaldığı görülmüştür ve bu durum tuzun etkisiyle mikroorganizma gelişiminin ve mikrobiyel dekarboksilaz enzim aktivitelerinin azalması ile ilişkilendirilmiştir. Araştırmada, şalgam örneklerinde triptamin, putresin ve feniletilamin tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyona sahip biyojen aminin triptamin, en düşük konsantrasyona sahip biyojen aminin ise feniletilamin olduğu belirlenmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonunun en çok triptamin ve feniletilamin oluşumunu etkilediği saptanmıştır.

Gücükoğlu ve Küplülü (2010), Türk fermente sucuklarında olgunlaştırma esnasında farklı starter kültürlerin ve farklı fermantasyon sıcaklığının biyojen amin oluşumu üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında 2 farklı fermantasyon sıcaklığı (22 ve 26°C) kullanmışlardır. Olgunlaştırma süresince her iki sıcaklıkta da biyojen amin seviyesinde, mikrobiyal ve kimyasal analizlerde istatistiksel olarak bir farklılık bulunmadığını tespit etmişlerdir.

Kurt ve Zorba (2009), sucuklarda biyojen amin oluşumuna olgunlaştırma periyodunun, nitrit seviyesinin ve ısıl işlemin etkilerini incelemişlerdir. Olgunlaştırmanın ardından sucuklara buhar ile farklı sıcaklık derecelerinde (30, 40, 60, 80, 90°C) ısıl işlem

uygulamışlar ve bu sucuklarda biyojen amin oluşumunu analiz etmişlerdir. Olgunlaştırma periyodunun ardından uygulanan ısıtma işleminin sucuklarda biyojen amin oluşumunu önemsenecek miktarda etkilemediğini tespit etmişlerdir.

Yücel ve Üren (2008) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 8 farklı salatalık turşusunda biyojen amin analizleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerin tuz içeriği (%6, %8, %10 ve %12) ve sitrik asit konsantrasyonunun (0 veya %1) biyojen amin oluşumuna etkileri araştırılmıştır. Putresin, kadaverin, triptamin, spermidin, spermin, tiramin ve histamin gibi biyojen aminlerin varlığını tespit etmişlerdir. %10 tuz içeren ve hiç sitrik asit içermeyen örneklerde ise biyojen aminler en yüksek oranlarda bulunmuştur.

E. durans IPLA 655 suşunun; farklı biyoreaktör şartları altında, farklı karbon kaynakları, tirozin konsantrasyonu ve farklı pH'ların tiramin sentezi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Karbon kaynaklarının tiramin üretimi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte tirozinin, tiramin üretimi için gerekli olduğu, pH'nın tiramin sentezinde en büyük etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Fernandez ve ark., 2007).

Turgut (2006), starter kültür katılarak üretilen hıyar turşularında biyojen amin oluşumu üzerine bir araştırma yapmıştır. Starter kültür katılan örneklerde putresin, feniletilamin ve triptamin gözlemlenirken, kontrol örneklerinde ise feniletilamin, putresin ve triptaminin en yüksek konsantrasyona sahip biyojen aminler olduğu ve starter kültür ilavesinin biyojen amin oluşumunun engellendiği belirlenmiştir.

Bozkurt ve Erkmen (2004), sucuklarda sıcaklık, nem ve katkı maddelerinin biyojen amin oluşumu üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, sıcaklık ve nemin depolama süresince biyojen amin oluşumunda etkili oldukları tespit edilmiştir. Depolama sıcaklığının 20°C' den 40°C' ye yükselmesinin sucukta feniletilamin oluşumunu önemli miktarda arttırdığını ifade etmişlerdir. Benzer şekilde tiramin konsantrasyonu sıcaklığın artması ile 0.0' dan 433.6 mg/kg' a ulaştığını tespit etmişlerdir. Histamin içeriğinin ise 20°C ve 30°C' de 60 günlük depolama süresi sonunda 0.0 dan 35.6 mg/kg' a ulaşırken, 40°C'deki depolamada ise 5.3 den 71.7 mg/kg' a ulaştığını ifade etmişlerdir.

Spicka ve ark. (2002), hücresel elektrokinetik kapiler kromatografi cihazı kullanarak yaptıkları bir çalışmada, hem doğal yolla hem de starter kültür (*L. plantarum*) ilave ederek ürettikleri susuz lahana turşularındaki biyojen amin oluşumunu incelemişlerdir. Altı adet kıyılmış beyaz lahana çeşidinin 22 °C' de 14 gün süren başlangıç fermentasyonu ile hazırladıkları lahana turşularını, 5-6 °C' da depolamış ve 6. ay sonunda

analiz etmişlerdir. Çalışmada alınan sonuçlara göre starter kültür katkısının putresin, tiramin ve kadaverinin üretim oranlarını önemli ölçüde azaltıkları belirlenmiştir.

Çolak ve Uğur (2002), sucuk örneklerini buzdolabı ve oda sıcaklığında muhafaza etmişlerdir. Depolamanın 180. gününde yaptıkları analizde triptamin miktarının 23.4 -50.3 mg/kg, β -feniletilamin miktarının 33.1-60.6 mg/kg, putresin miktarının 223.5-351.5 mg/kg, histamin miktarının 188.3-426.4 mg/kg ve tiramin miktarının ise 245.1-351.0 mg/kg oranlarında değişim gösterdiğini belirlemişlerdir. Sonuç olarak oda sıcaklığında depolanan sucuk örnekleri, buzdolabında muhafaza edilenlere oranla daha yüksek miktarlarda biyojen amin oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Durlu-Özkaya ve ark. (2001), et ürünlerinden izole ettikleri *Enterobacteriaceae* familyası tarafından sentezlenen biyojen aminleri incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda, kültür ortamında ve et ürünlerinde oluşan başlıca biyojen aminlerin putresin, kadaverin, tiramin ve histamin olduğunu tespit etmişlerdir.

Pinho ve ark. (2001) Azeitao peynirinin depolama sırasında biyojen amin döngüsü üzerine sıcaklığın etkisini incelemişler ve oda sıcaklığında (25°C) tiramin ve putresin içeriğinin önemsenecek miktarda arttığını belirlemişlerdir.

Kalac ve ark. (2000), 3 adet beyaz lahana çeşidini kullanarak, 3 farklı susuz lahana turşusu hazırlamışlardır. Başlangıçta 22 °C’ da 14 gün fermentasyona bırakılan ve daha sonra 5-6 °C’ da depolanan örnekleri 6 ay sonunda analiz etmişlerdir. Araştırmada starter kültür katılmadan fermentasyona bırakılan kontrol örnekleri, starter kültür (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecium*) ve hazırlanan karışık ticari laktik asit bakteri türleri (her birindeki doz 5×10^6 kob/g lahana) ile inokule edilen örneklerdeki biyojen amin oluşumu hücrel elektrokinetik kapiler kromatografi cihazıyla analiz edilmiştir. Analiz sonucunda histamin, triptamin, spermidin ve spermin konsantrasyonlarını genellikle 10 mg/kg’ ın altında bulmuşlardır. Tiramin, putresin ve kadaverin oluşumunun toplam konsantrasyonu kontrol örneklerinde 450-780 mg/kg, *L. plantarum* kullanılan örneklerde 47.6-120 mg/kg ve karışık ticari laktik asit bakteri türleri kullanılan örneklerde ise 41.1-205.7 mg/kg olarak belirlemişlerdir. *L. plantarum* ve karışık ticari laktik asit bakteri türleri bu oranların düşüşünde önemli rol oynadıklarını istatistiksel olarak saptamışlardır.

Halasz ve ark. (1999), susuz lahana turşusunda biyojen amin oranının belirlenmesi için yaptıkları çalışmada, susuz lahana turşusunu %2 ve %5’lik tuz konsantrasyonlarında

hazırlamışlardır. Fermentasyonlar, starter kültür (*L. plantarum* ve *L. curvatus*) eklenmiş ve starter kültür eklenmemiş olarak gerçekleştirilmiştir. Kapalı kavanozlar 11 °C ve 30 °C’da 96 saat bekletilme sonucunda pH ve biyojen amin oranlarında değişim gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre starter kültür eklenmiş lahana turşularının toplam biyojen amin içeriği doğal susuz lahana turşusuna göre daha düşük konsantrasyonlarda bulunmuştur. Sıcaklık biyojen amin oluşumunda etkili bir faktör olarak gözlenmiş olup en yüksek biyojen amin konsantrasyonu doğal yolla 30 °C’de fermente edilmiş örneklerde bulunmuştur.

2.3. Sağlık Açısından Biyojen Amin Üzerine Yapılan Çalışmalar

Biyojen aminler sağlığa zararlı olan bileşikler ve bu bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarını ihtiva eden gıdaların tüketimi ise toksik reaksiyonlara sebep olabilmektedir. Özellikle, tiramin zehirlenme vakaları peynir tüketiminden sonra meydana geldiği belirlenmiştir (Loizzo ve ark., 2013) .

Biyojen aminler düşük miktarda alındıklarında vücut tarafından tolere edilebilirken yüksek miktarda alındıklarında intoksikasyona ve gıda zehirlenmesine neden olabilmektedirler (Ayhan ve Durlu-Özkaya, 2007). Yüksek dozda vücuda alınan biyojen aminler hipotansiyon (histamin, putresin, kadaverin), hipertansiyon (tiramin), anafilaktik şok sendromu, solunum zorluğu, alerjik reaksiyonlar, kalp ritmiyle ilgili rahatsızlıklar ve ölüm gibi ciddi problemlere sebep olabileceğini bildirmişlerdir (Kalac ve Krausova, 2005).

Histamin ve tiramin gibi aminler ise sinir sisteminin fonsiyonunu yerine getirmesinde, kan basıncının ayarlanmasında gereklidir. Feniletilamin ve tiramin kan basıncını artırırken histamin kan basıncını azalttığını belirtmişlerdir (Karovicova ve Kohajdova, 2005). Putresin, kadaverin, spermidin gibi bazı biyojen aminler serbest radikal temizleyici gibi davranabilmektedirler. Tiraminin dikkate değer oranda antioksidan aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir (Kalac ve Krausova, 2005).

Bazı hassas kişilerin peynir tüketiminden sonra migren ataklarına maruz kaldığı, böyle kişilerin genetik olarak monoaminooksidaz enziminden yoksun olma ihtimalinin yüksek olduğu; dolayısıyla, bu tip hastaların çoğunda 100 mg tiramin alımının şiddetli baş ağrısı meydana getirdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca tiramin, monoaminooksidaz tedavisi gören hastalarda hipertansif krizlere de neden olabileceği ifade edilmektedir. Aminlerin alkol ile birlikte veya bazı ilaçlarla alındığında sağlık üzerindeki olumsuz etkisi dahada

artmaktadır. Birçok araştırmacı şaraplardaki histamin miktarının maksimum düzeyi olarak 10 mg/l olduğunu belirtmişlerdir. Ancak, bazı araştırmacılar ise 8 mg/l düzeyindeki histaminin baş ağrısını tetiklediğini tespit etmişlerdir (Özkaya ve Tunail, 2000).

Biyojen aminler gıdaların bozulması ve güvenliği ile yakından ilgilidir. Histamin, tiramin, putresin gibi biyojen aminler canlılarda yaşamsal fonksiyonlar için gerekli olmasına rağmen, bu aminlerin yüksek miktarda tüketimi canlılarda toksik ve patojenik etki yaratmaktadır. Bu etkiler baş ağrısı, kalp çarpıntısı, kusma, ishal, stres, yorgunluk, düşük veya yüksek tansiyon, gıda zehirlenmesi gibi sıralanabilir. Tiramin, histamin, triptamin gibi aminlerin kan basıncını yükselttikleri, normal olarak vücutta ise monoaminooksidaz enzimler tarafından etkisiz hale getirilmektedirler. Ancak bu enzimi inhibe eden antidepresant ilaçlar alan hastalarda peynir tüketimi, tiramin birikiminden dolayı zehirlenmelere yol açabilmektedir (Bakırcı,2000).

Histamin zehirlenmesinde, inkübasyon süresi gıdanın alımıyla semptomların çıkışı arasındaki birkaç dakika ile birkaç saat arasında değişmektedir. Semptomlar spontan olarak kaybolabildiği gibi bazen bir veya bir kaç gün devam edebilmektedir. Genellikle, boyunda ve yüzde kırmızı lekeler, kaşıntı, ödem, yüksek ateş, ağız çevresinde sancı ve yanma hissi, mide bulantısı, kusma, ishal ve karın ağrısı, kramplar gözlenmektedir. Çarpıntı, titreme, heyecanlanma ve dilin şişmesi gibi semptomlara da sebebiyet verebileceği bildirilmiştir (Leuschner, 1998).

2.4. Aromatik İçerikler ve Gıda Güvenliği Üzerine Yapılan Çalışmalar

Siragusa ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, *L. plantarum* suşları MRS besi ortamındaki gelişmeleriyle, gıda benzeri maddelerin (peynir altı suyu, süt ve domates suyu gibi) olduğu ortamdaki gelişmelerinde bazı metabolik özelliklerde (karbonhidrat ve organik asitlerin üretimi ve tüketimi) değişimlerin varlığı gözlemlenmiştir. *L. plantarum* suşları yüksek karbon kaynağı, düşük glikoz konsantrasyonu ve hiç glikoz içermeyen ortamlardaki fermantasyon profilleri analiz edilmiştir.

Rubio ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, İspanyol fermente sucuk ve nihai ürünlerinin hijyenik ve duyuşal nitelikleri üzerindeki etkisini artırmak amacıyla probiyotik olan *Lactobacillus* suşlarını (*L. plantarum* 299V ve *L. rhamnosus* GG) starter kültür olarak kullanıp değerlendirmesini yapmışlardır.

Ji ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, Kimchi’de fonksiyonel özellikleri olan beş farklı *L. plantarum* ve bir *Leuconostoc citreum* suşlarını izole etmişlerdir. Bu izolatların antibiyotik direnci, hemoliz, jelatinaz etkinliği ve biyojen amin üretimleri gıda güvenliği açısından incelenmiştir.

Essid ve Hassouna (2013) yaptıkları çalışmada, geleneksel Tunus sucuk üretiminde *L. plantarum* ve *Staphylococcus xylosus* suşlarını starter kültür olarak kullanmışlardır. Sosislerin olgunlaşma aşamasındaki mikrobiyolojik, biyokimyasal duyusal ve dokusal özelliklerindeki değişiklikler incelenmiştir.

Metabolik bazı özellikleri sayesinde LAB’lar genellikle, fermente gıdaların mikrobiyal güvenliğine, lezzetine, dokusuna, besin değerine önemli ölçüde katkıda bulundukları tespit edilmiştir (Settanni ve Corsetti, 2008).

Corsetti ve ark. (2005), çeşitli ürünlerde doğal olarak bulunan laktik asit bakterilerinin, geleneksel doğal ürünlerin biyolojik olarak muhafazasında, bakterilerin üretmiş oldukları organik asitler, karbon dioksit, etanol, hidrojen peroksit ve diasetillerin etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Fermente gıdaların üretiminin, ham materyalin hızlı asidifikasyonunun başlangıcı, LAB’ların starter kültür olarak kullanımının gerçekleştirilmesine bağlı olduğunu ve yakın geçmişte LAB’ın yeni starter kültürlerinin geliştirildiğini belirtmişlerdir. LAB’ın antimikrobiyal maddeler, şeker polimerleri, tatlandırıcılar, aromatik bileşikler, vitaminler ya da enzimler gibi faydalı probiyotik özelliklere genetiksel olarak sahip olması gerektiğini bildirmişlerdir (Leroy ve Vuyst, 2004).

Gıdalarda biyojen aminlerin belirlenmesi yalnızca toksikolojik açıdan önemli değildir. Aynı zamanda gıdalarda biyojen aminlerin varlığı tazelik ve bozulmanın indikatörü olması açısından da önemli olduğunu belirtmişlerdir (Alberto ve ark., 2002).

LAB’nin aminoasit metabolizması gıda kalitesi ve gıda güvenliği açısından da önemlidir. Çünkü bazı gıdalarda aminoasitler karakteristik aromanın oluşumuna katkıda bulunurlar. Yapılan çalışmalar, LAB’lar aminoasitleri tamamen metabolize edebildiklerini, ancak bu özelliğin türler arasında büyük ölçüde değiştiğini tespit etmişlerdir (Williams ve ark., 2001).

Caplice ve Fitzgerald (1999) yaptıkları çalışmada, eski teknolojilerde yiyeceklerin fermentasyonla korunduğunu, bazı yiyeceklerin sindirimini kolaylaştırmak için de

fermentasyonunun gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Laktik asit bakterileri et, süt, tahıl ve sebze gibi birçok fermentasyon sürecinde metabolik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Gıdalardaki biyojen aminler; gıdaların bozulması ve gıda güvenliği ile yakından ilişkilidir. 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 aldıklarını bildirmişlerdir (Halasz ve ark., 1994).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasallar

Tez çalışması Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (KSÜ), Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve KSÜ Üniversite Sanayi Kamu İşbirliği Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÜSKİM) Laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışmanın temel kimyasalları farklı firma belirtilmedikçe, Merck (Almanya) ve Sigma (Almanya) grubundan; moleküler biyoloji sarf malzemeleri Fermentas (USA), Thermo Scientific (USA) ve Favorgen'den (Tayvan) temin edilmiştir.

3.2. Turşu Örnekleri

Bu çalışmada *L. plantarum* izolasyonu için kullanılan turşu örnekleri Türkiye'nin farklı illerinden ve bu illere bağlı bazı ilçelerde (Çizelge 3.1) geleneksel olarak turşu yapan ailelerden rastgele toplanmıştır. Toplanan örneklerin detaylı bilgileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Toplanan turşu örnekleri steril kaplara alınmış ve mümkün olan en kısa sürede ve soğuk zincir takip edilerek laboratuvara getirilip hemen izolasyon yapılmıştır. İzolatlar turşu örneklerinin nereden temin edildiği ve izolasyon numaraları içerecek şekilde adlandırılmış ve -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Farklı il ve ilçelerde temin edilen turşu örnekleri, turşudan izole edilen ve tanımlanan laktik asit bakteri listesi

İzolat Adı	Turşu Çeşidi	Örnek Yeri
YAI1 (<i>L. plantarum</i> 1)	Salatalık	Mersin
YAI2	Salatalık	Mersin
YAI3 (<i>L. plantarum</i> 2)	Lahana Biber	Mersin
YAI4	Lahana Biber	Mersin
YAI5	Salatalık	Mersin
YAI6	Lahana	Mersin
YAI7	Lahana	Mersin
YAI8	Lahana	Mersin
YAI9	Salatalık	Mersin
YAI10	Salatalık	Mersin
YAI11	Salatalık	Mersin
YAI12	Salatalık	Mersin
YAI13	Lahana	Mersin

Çizelge 3.1'in devamı

İzolat Adı	Turşu Çeşidi	Örnek Yeri
YAI14 (<i>L. plantarum</i> 3)	Lahana	Mersin
YAI15	Lahana	Mersin
YAKE1 (<i>L. plantarum</i> 4)	Biber	K.Maraş/Elbistan
YAKE2	Biber	K.Maraş/Elbistan
YAKA1 (<i>L. plantarum</i> 5)	Karışık	Kars
YAKA2	Karışık	Kars
YAKA3	Karışık	Kars
YAKA4 (<i>L. plantarum</i> 6)	Karışık	Kars
YAMS1 (<i>L. plantarum</i> 7)	Karışık	Muş/Sungu
YAMS2	Karışık	Muş/Sungu
YAMS3 (<i>L. plantarum</i> 8)	Karışık	Muş/Sungu
YAMS4	Lahana	Muş/Sungu
YAMS5 (<i>L. plantarum</i> 9)	Lahana	Muş/Sungu
YAMS6	Lahana	Muş/Sungu
YAAG1	Salatalık, Havuç	Ağrı
YAAG2	Salatalık, Havuç	Ağrı
YAAG3 (<i>L. plantarum</i> 10)	Salatalık, Havuç	Ağrı
YAAG4	Salatalık, Havuç	Ağrı
YAIZ1	Biber	İzmir
YAIZ2	Biber	İzmir
YAAG5 (<i>L. plantarum</i> 12)	Pancar, Karnabahar	Ağrı
YAAG6	Pancar, Karnabahar	Ağrı
YAAG7	Pancar, Karnabahar	Ağrı
YAAG8 (<i>L. plantarum</i> 13)	Kavun, Havuç	Ağrı
YAAG9	Kavun, Havuç	Ağrı
YAAG10	Kavun, Havuç	Ağrı
YAAG11 (<i>L. plantarum</i> 14)	Kavun, Havuç	Ağrı
YAAG12	Fasulye, Acur, Biber	Ağrı
YAAG13 (<i>L. plantarum</i> 15)	Fasulye, Acur, Biber	Ağrı
YAAG14	Fasulye, Acur, Biber	Ağrı
YAAG15 (<i>L. plantarum</i> 16)	Biber	Ağrı
YAAG16 (<i>L. plantarum</i> 17)	Lahana, Havuç	Ağrı
YAAG17	Lahana, Havuç	Ağrı
YAAG18 (<i>L. plantarum</i> 18)	Cağ, Lahana	Ağrı
YAAG19	Cağ, Lahana	Ağrı
YAS1 (<i>L. plantarum</i> 19)	Karışık	Şanlıurfa
YAS2	Karışık	Şanlıurfa
YAS3	Karışık	Şanlıurfa
YAS4 (<i>L. plantarum</i> 20)	Karışık	Şanlıurfa
YAS5	Karışık	Şanlıurfa
YAS6 (<i>L. plantarum</i> 21)	Karışık	Şanlıurfa
YAS7	Karışık	Şanlıurfa
YAS8 (<i>L. plantarum</i> 22)	Karışık	Şanlıurfa
YAS9	Karışık	Şanlıurfa
YAS10	Karışık	Şanlıurfa
YAS11	Karışık	Şanlıurfa

Çizelge 3.1'in devamı

İzolat Adı	Turşu Çeşidi	Örnek Yeri
YAS12	Karışık	Şanlıurfa
YAS13	Karışık	Şanlıurfa
YAS14 (<i>L. plantarum</i> 23)	Karışık	Şanlıurfa
YAS15	Karışık	Şanlıurfa
YAS16	Karışık	Şanlıurfa
YAG1 (<i>L. plantarum</i> 24)	Karışık	Gaziantep
YAD1(<i>L. plantarum</i> 25)	Turşu Suyu	Diyarbakır
YAD2 (<i>L. plantarum</i> 26)	Turşu Suyu	Diyarbakır
YAM1	Salatalık, Biber	Mardin
YAM2	Salatalık, Biber	Mardin
YAM3 (<i>L. plantarum</i> 29)	Salatalık, Biber	Mardin
YAI16	Biber	Mersin
YAI17	Biber	Mersin
YAI18 (<i>L. plantarum</i> 31)	Biber	Mersin
YAD3 (<i>L. plantarum</i> 32)	Biber	Diyarbakır
YAD4	Biber	Diyarbakır
YAD5 (<i>L. plantarum</i> 33)	Biber	Diyarbakır
YAH1	Turşu Suyu	Hakkari
YAH2	Turşu Suyu	Hakkari
YAV1	Karışık	Van
YAV2	Karışık	Van
YAV3 (<i>L. plantarum</i> 35)	Karışık	Van
YAM1 (<i>L. plantarum</i> 36)	Karışık	Muş
YAM2	Karışık	Muş
YAM3	Karışık	Muş
YAM4	Karışık	Muş
YAM5 (<i>L. plantarum</i> 38)	Karışık	Muş
YAM6	Lahana	Muş
YAM7 (<i>L. plantarum</i> 39)	Acur	Muş
YAM8 (<i>L. plantarum</i> 40)	Karışık	Muş
YAM9 (<i>L. plantarum</i> 41)	Karışık	Muş
YABS1 (<i>L. plantarum</i> 42)	Karışık	Bingöl/Solhan
YABS2	Karışık	Bingöl/Solhan
YAIS1	Fasulye	İstanbul
YAIS2	Fasulye	İstanbul
YAIS3 (<i>L. plantarum</i> 43)	Fasulye	İstanbul
YAIS4	Biber, Domates	İstanbul
YAIS5 (<i>L. plantarum</i> 44)	Biber, Domates	İstanbul
YAIS6	Lahana, Domates	İstanbul
YAIS7 (<i>L. plantarum</i> 45)	Lahana, Domates	İstanbul
YAIS8 (<i>L. plantarum</i> 46)	Karışık	İstanbul
YAIS9 (<i>L. plantarum</i> 47)	Karışık	İstanbul
YAIS10	Karışık	İstanbul
YAK1	Biber	Kahramanmaraş
YAK2 (<i>L. plantarum</i> 48)	Biber	Kahramanmaraş
YAK3	Karışık	Kahramanmaraş

Çizelge 3.1'in devamı

İzolat Adı	Turşu Çeşidi	Örnek Yeri
YAK4 (<i>L. plantarum</i> 49)	Karışık	Kahramanmaraş
YAK5 (<i>L. plantarum</i> 50)	Karışık	Kahramanmaraş
YAK6	Karışık	Kahramanmaraş
YAK7 (<i>L. plantarum</i> 51)	Karışık	Kahramanmaraş
YAK8	Karışık	Kahramanmaraş
YAK9 (<i>L. plantarum</i> 52)	Biber-Acur	Kahramanmaraş
YAK10	Biber-Acur	Kahramanmaraş
YAK11	Karışık	Kahramanmaraş
YAK12 (<i>L. plantarum</i> 53)	Karışık	Kahramanmaraş
YAK13	Karışık	Kahramanmaraş
YAK14	Karışık	Kahramanmaraş
YAK15	Biber-Acur	Kahramanmaraş
YAK16 (<i>L. plantarum</i> 54)	Biber-Acur	Kahramanmaraş
YAK17	Biber-Acur	Kahramanmaraş
YAK18 (<i>L. plantarum</i> 55)	Biber-Acur	Kahramanmaraş
YAK19	Biber-Acur	Kahramanmaraş
YAK20 (<i>L. plantarum</i> 56)	Karışık	Kahramanmaraş
YAK21	Karışık	Kahramanmaraş
YAK22	Karışık	Kahramanmaraş
YAK23	Karışık	Kahramanmaraş
YAK24	Karışık	Kahramanmaraş
YAK25	Acur	Kahramanmaraş
YAK26	Acur	Kahramanmaraş
YAK27	Acur	Kahramanmaraş
YAK28	Karışık	Kahramanmaraş
YAK29 (<i>L. plantarum</i> 60)	Karışık	Kahramanmaraş
YABT1	Karışık	Bitlis/Tatvan
YABT2	Karışık	Bitlis/Tatvan
YABT3	Salatalık	Bitlis/Tatvan
YABT4 (<i>L. plantarum</i> 62)	Salatalık	Bitlis/Tatvan
YABT5	Salatalık	Bitlis/Tatvan
YABT6	Salatalık	Bitlis/Tatvan
YABT7 (<i>L. plantarum</i> 63)	Salatalık	Bitlis/Tatvan
YABT8 (<i>L. plantarum</i> 64)	Salatalık, Biber	Bitlis/Tatvan
YABT9	Salatalık, Biber	Bitlis/Tatvan
YABT10	Salatalık, Biber	Bitlis/Tatvan
YABT11	Salatalık	Bitlis/Tatvan
YABT12	Biber, Havuç	Bitlis/Tatvan
YABT13 (<i>L. plantarum</i> 67)	Karışık	Bitlis/Tatvan
YABT14	Karışık	Bitlis/Tatvan
YABT15	Karışık	Bitlis/Tatvan
YABT16 (<i>L. plantarum</i> 68)	Karışık	Bitlis/Tatvan
YAM10 (<i>L. plantarum</i> 69)	Karışık	Muş
YAM11 (<i>L. plantarum</i> 70)	Karışık	Muş
YAM12	Karışık	Muş
YAM13	Karışık	Muş

Çizelge 3.1'in devamı

İzolat Adı	Turşu Çeşidi	Örnek Yeri
YAM14	Karışık	Muş
YAM15 (<i>L. plantarum</i> 73)	Karışık	Muş
YAM16	Karışık	Muş
YAM17 (<i>L. plantarum</i> 74)	Karışık	Muş
YAM18	Karışık	Muş
YAM19 (<i>L. plantarum</i> 76)	Karışık	Muş
YAM20	Karışık	Muş
YAM21	Karışık	Muş
YAM22 (<i>L. plantarum</i> 77)	Karışık	Muş
YAM23 (<i>L. plantarum</i> 78)	Karışık	Muş

3.3. Besiyeri ve Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan MRS besi ortamının kimyasal kompozisyonu Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Laktik asit bakteri izolasyonu için kullanılan MRS besiyerinin kompozisyonu

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	2
	Magnezyum sülfat	0.2
	Mangan sülfat	0.04

Hazır besi ortamı litreye 52.2 gr olarak tartılmış ve otoklavda 121 °C de 15 dak. süre ile sterilize edilmiştir.

3.4. Çözeltiler ve Hazırlanması

%3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinin hazırlanışı: 100 g fenol üzerine 20 ml destile su ve 3 g NaCl aktarılarak 45 °C'deki su banyosunda çözülerek oda sıcaklığında tutulmuştur.

RNaz A çözeltisi: 5 ml steril destile su içerisinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat çözeltisinin üzerine 5 mg RNaz A ilave edilmiştir. Kaynar su içerisinde ortam 5 dak. tutulduktan sonra -20 °C'de saklanmıştır.

Sakkaroz çözeltisi

Tris	:	0.7 g
EDTA	:	0.05 g
Sakkaroz	:	6.5 g
Destile su	:	100 ml
pH 8.0 ± 0.02		

SDS çözeltisi

Tris	:	0.6 g
EDTA	:	0.8 g
SDS	:	20 g
Destile su	:	100 ml
pH 8.0 ± 0.02		

Lizozim çözeltisi

Tris	:	0.3 g
Lizozim	:	0.1 g
Destile su	:	10 ml
pH 8.0 ± 0.02		

Tris-EDTA-1

Tris	:	0.6 g
EDTA	:	9.5 g
Destile su	:	100 ml
pH 8.0 ± 0.02		

Tris-EDTA-2

Tris	:	0.15 g
EDTA	:	0.4 g
Destile su	:	100 ml
pH 7.5 ± 0.02		

Tris-HCl

Tris-HCl	:	31 g
Destile su	:	100 ml
pH 7.0 ± 0.02		

3.5. *L. plantarum* Suşlarının İzolasyonu

Laboratuvara getirilen turşu örneklerinden 5'er gr tartılarak 5 ml fizyolojik su içerisinde 3500 devir/dak. 2 dak. süre ile santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatant kısmından 1 ml alınarak 10 000 devir/dak. 30 sn santrifüjlenerek oluşan süpernatant kısmından 1ml alınmış ve 10000 devir/dak. 15 dak. santrifüjlenmiştir. Süre sonunda tüp içerisinde kalan çökelti 1 ml fizyolojik su ile çözülerek 10^{-5} e kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan *L. plantarum* suşlarının izolasyonu için MRS agara ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan plaklar 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan ve laktik asit bakteri kolonisi olduğu düşünülen koloniler alınıp stoklanmak üzere sıvı besiyerlerinde aktifleştirilmiştir (Şekil 3.1) (Mandel ve ark., 1970).



Şekil 3.1. Turşudan izole edilen LAB'ların MRS besi ortamında aktifleştirilmesi

3.6. Biyokimyasal Tanımlama

Turşu örneklerinden izole edilen LAB'ların tanımlanmasında izolatların biyokimyasal (katalaz), morfolojik (kok, çubuk gibi) ve kültürel özelliklerine (gram boyama, koloni morfolojisi) bakılarak ön tanımlama yapılmıştır.

3.6.1. Koloni morfolojisi

İnkübasyondan sonra petrilerdeki koloniler görünüşlerine, rengine ve şekline bakılarak değerlendirme yapılmıştır.

3.6.2. Gram boyama

İzole edilen potansiyel LAB'lar gram boyama tekniği ile boyanmıştır. Petrilerdeki kolonilerden; preparat hazırlanmış, kurutulmuş ve tespit edilmiştir. Kristal violet solüsyonu ile 2-3 dak. boyanmış, boya yıkanmış ve preparat üzerine lügol solüsyonu damlatılarak 1-2 dak. beklenmiştir. Lügol solüsyonu önce saf alkol ile sonra saf su ile yıkanmış ve safranin ile de 5-10 saniye boyanıp, su ile yıkanarak boya giderilmiştir (Collins ve ark. 1989; Gücin ve Dülger, 1995). Kurutma kağıdı ile kurutulduktan sonra sedir yağı konarak immersiyon objektifi ile görüntülenmiştir.

3.6.3. Katalaz testi

İzole edilen LAB'ların MRS petrilerindeki kolonileri üzerine % 3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılarak gaz kabarcıklarının oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir ve gaz oluşturan örnekler katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hammes ve Vogel, 1995).

3.7. Moleküler Biyoloji Metotları

L. plantarum'ların moleküler olarak tanımlanması, kullanılacak primerlerin belirlenmesi, kromozomal (Genomik) DNA izolasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi ve plazmit DNA izolasyonunu kapsamaktadır.

3.7.1. Oligonükleotit primerler

İzole edilen potansiyel *L. plantarum* suşlarının tanımlanmasında kullanılan *recA* ve evrensel 16S rRNA gen primerlerinin dizilimleri (5'→3') ve bant uzunlukları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. *L. plantarum*'ların *recA* ve evrensel 16S rRNA genlerinin tanımlanması için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri

Gen	Primer Adı	Dizilim (5'→3')	Uzunluk (bp)
<i>recA</i>	planF planR	CCG TTT CTG CGG AAC ACC TA TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC	318
16S rRNA	27F 1492R	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	1465

3.7.2. Kromozomal DNA izolasyonu

Çalışmada kullanılan toplam 78 LAB suşu MRS broth besi ortamında 37°C'de 24 saat aktifleştirilmiştir. Daha sonra her bir örnekten 1.5 ml alınıp ependorf tüplere aktarılmış ve 13.000 rpm'de 5 dak. santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen peletlerde Vivantis Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanımı ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7.3. Polimeraz zincir reaksiyonu

3.7.3.1. Koloni PCR (*rec A* gen PCR)

PCR işlemi toplam 30 µl içerisinde gerçekleştirilmiştir. 18.25 µl dH₂O, 1'er µl ileri ve geri primerlerden, 3 µl PCR buffer (10X), 1 µl dNTP (10 mM), 2.5 µl MgCl₂ (25 mM) 0.25 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ml) karıştırılarak hazırlanmıştır. DNA olarak 10 µl dH₂O'da çözdürülen koloniden 3 µl kullanılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız primerler ticari firmalardan sipariş edilmiştir (İontek, İstanbul). PCR işlemi 94 °C'de 3 dak. ilk ayrıştırma ile başlatılmış daha sonra 30 döngü

olmak üzere 94 °C’de 1 dak. denatürasyon, primerler için uygun yapışma sıcaklığı 55°C’ de 1 dak. ve 72 °C’de uygun sentez zamanı boyunca gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 2’lik jel hazırlanarak, elektroforeze yüklenmiş PCR ile çoğaltılan bölgeler UV ışığında gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.7.3.2. 16S rRNA PCR ve DNA dizi analizi

PCR işlemi toplam 50 µl içerisinde gerçekleştirilmiştir. 31.5 µl dH₂O, 1’er µl ileri ve geri primerlerden, 5 µl PCR buffer (10X), 2 µl dNTP (10 mM), 4 µl MgCl₂ (25 mM) 0.5 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ml) ve 5 µl genomik DNA karıştırılarak hazırlanmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız primerler ticari firmalardan sipariş edilmiştir (İontek, İstanbul). PCR işlemi 94 °C’de 3 dak. ilk ayrıştırma ile başlatılmış daha sonra 30 döngü olmak üzere 94 °C’de 1 dak. denatürasyon, primerler için uygun yapışma sıcaklığı 61°C’ de 1 dak. ve 72 °C’de uygun sentez zamanı boyunca gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 2’lik jel hazırlanarak, elektroforeze yüklenmiş PCR ile çoğaltılan bölgeler UV ışığında gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır. DNA Dizi Analizi Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi ÜSKİM Merkez Laboratuvar’ında hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.7.4. Plazmit DNA izolasyonu

Çalışmada toplanan turşu örneklerinden izole edilen, kimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanan suşların plazmit DNA izolasyonları yapılmıştır. Bu amaçla, hazır kit ile izolasyonu ve manuel plazmit DNA izolasyon metotları uygulanmıştır.

3.7.4.1. Hazır kit kullanılarak yapılan plazmit DNA izolasyonu

Plazmit DNA izolasyonu; FavorPerp Plasmid DNA Extraction Mini Kiti kullanarak firmanın (FAVORGEN) verdiği prosedüre lizozim eklenerek modifiye edilmiş ve gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bir gece boyunca büyütülmüş bakteri kültürü kullanılmıştır. Gelişmiş olan bakteri kültüründen 1.5 ml tüplere alınarak, 3500 devir/dak. 15 dak. santrifüj edilmiş ve bakteri hücreleri çöktürülmüştür.

Oluşan pelette 1ml steril saf su ilave edilerek vortekslenerek 10000 rpm’de 2 dak. santrifüj edilir ve üstteki sıvı kısmı dökülür, bu işlem 2 kez tekrarlanır. Oluşan peletin üzerine 200 µl lizozim (8 mg/ml) konsantrasyonu ilave edilerek vortekslenmiş ve 37°C 30 dak. su banyosunda lizozim inkübasyonu yapılmıştır. Daha sonraki aşamalar üretici

firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmit DNA'ları jelde görüntülemek, kalan kısmı sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.7.4.2. Geleneksel plazmit DNA izolasyonu

MRS broth ortamında 37 °C'de 24 saat geliştirilen *L. plantarum* suşunun kültürleri, 10 ml'lik MRS broth ortamlarına birer ml inokülasyonlar yapılmış ve tüpler 30°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde santrifüj tüplerine aktarılan bakteri kültürleri, 6000 devirde 15 dak. santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen hücre çökteltisi kurutulduktan sonra 380 µl süktroz tamponunda çözülmüştür. 37°C'ye kadar ısıtılan bu ortama 96 µl lizozim ilave edilmiş ve su banyosunda 37°C'de 5 dak. bekletilmiştir. 48 µl Tris-EDTA-1 uygulamasından sonra, tüplere % 20 SDS çözeltisinden 28 µl aktararak karıştırılmıştır. Lizizin tamamlanması için santrifüj tüpleri 37°C su banyosunda 10 dak. süre ile tutulmuştur.

Lize olmuş kültürler yeni hazırlanmış 3 N NaOH çözeltisinden 28 µl ilave edilmiş ve tüpler düz bir zemin üzerinde 10 dak. süre ile yavaşça çevrilerek kromozomal DNA'nın alkali denatürasyon koşulları oluşturulmuştur. Denatürasyon aşamasının sonunda santrifüj tüplerine 50 µl Tris-HCl çözeltisi aktararak, 3 dak. süre ile yine düz bir zeminde hafifçe karıştırılmıştır. Tüplere, 4°C'de tutulan 5 M NaCl çözeltisinden 72 µl ve %3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 0.7 ml ilave edilerek, 4°C'de 15000 devirde 15 dak. santrifüj işlemi uygulanmıştır. Tüplerde oluşan üst faz, mikropipet yardımıyla yeni tüplere aktarılmış ve 0.7 ml kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisi ilave edilmiştir. Bu ortamlara 4°C'de 15000 devirde 15 dak. santrifüj işlemi uygulanmış, oluşan üst faz yeni tüplere alınmış ve üzerine eşdeğer hacimde soğuk etanol aktarılmıştır. Etanol ilave edilen tüpler -20°C'de bir gece bekletildikten sonra, 15000 devirde 15 dak. santrifüj uygulanarak plazmit DNA çöktürülmüş ve sıvı faz dökülerek çöktelti kurutulmuştur. Kurutulan çöktelti 20 µl Tris-EDTA-2 içerisinde çözülmüş ve RNaz A stok çözeltisinden 2 µl ilave edilerek su banyosunda 37°C'de 45-50 dak. inkübe edilmiştir (Anderson ve McKay, 1983).

3.7.5. DNA'nın jel elektroforezi

Koloni PCR ve 16S rRNA ürünleri için agaroz jel hazırlamak üzere; %2 oranında agaroz, 1X TBE (90 mM Tris Base; 90mM Borik Asit; 2 mM EDTA; pH 8.0) tamponu içerisinde eritilmiş ve elektroforez tabağına dökülmüştür. Analiz edilecek örneklerin uygun dilüsyonlarından genellikle 5 µl alınarak, 1 µl yükleme tamponu (%0.25 bromfenol mavisi; %40 sukroz; 100 mM EDTA; pH 8.0) ile karıştırılmıştır. Bu şekilde örnekler jele

yüklenmiştir. DNA kontrolü olarak uygun boyutlardaki DNA referansı; λ DNA 100 baz çiftlik ya da 1000 baz çiftlik DNA markörleri (Favorgen) kullanılmıştır. Elektroforez tankında (Cleaver), jel 80 V ve 500 mA (NYXTechnik; V37) altında koşturulmuştur. DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Plazmit DNA ürünleri için agaroz jel hazırlamak üzere; % 1 oranında agaroz, 1X TBE tamponu içerisinde eritilmiş ve elektroforez tabağına dökülmüştür. Analiz edilecek örneklerin uygun dilüsyonlarından genellikle 5 μ l alınarak, 1 μ l yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Bu şekilde örnekler jele yüklenmiştir. DNA kontrolü olarak uygun boyutlardaki DNA referansı; λ DNA 1000 baz çiftlik DNA markörleri (Favorgen) kullanılmıştır. Elektroforez tankında, jel 20-40 V ve 500 mA altında koşturulmuştur. DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.8. İzolatların Stoklanması

Bakteriler kısa süreli stoklamalar için %15'lik gliserol içerisine alınarak -20°C'de saklanmıştır. Uzun süreli saklama ise, besi ortamında 16 saat büyütülen bakterilerden 200 μ l alınarak 12.000 rpm'de 3 dak. çöktürülerek süpernatant kısmının uzaklaştırılması ve pelletlerin %30 gliserol içeren MRS besi ortamında çözündürüp, şok soğutma ile -80°C'de gerçekleştirilmiştir.

3.9. İzolatlarının Antibiyotiklere Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan antibiyotikler Oxoid'den alınmıştır. Kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Antibiyotikler ve konsantrasyonları

Antibiyotik	Konsantrasyon (μ g)
Penicillin	10
Eritromisin	15
Amikasin	30
Rifampisin	5
Trimethoprim	25

3.9.1. Disk difüzyon metodu

Turşudan izole edilen *L. plantarum* izolatlarının antibiyotik direnç özellikleri disk difüzyon metoduna ile belirlenmiştir. Bu amaçla penicillin, eritromisin, amikasin,

rifampisin ve trimethoprim antibiyotiklerine karşı direnç veya duyarlılık özellikleri incelenmiştir.

Çalışmada kullanılan ve 4°C’de muhafaza edilen *L. plantarum* suşları sıvı MRS besiyerine aşılanarak 30°C de 24 saat süre ile aktivasyonu sağlamak için inkübe edilmiştir. Daha sonra deney tüplerinde sterilize edilen ve 45-50°C ye kadar soğutulan MRS agara’da aktive edilmiş *L. plantarum* izolatlarıyla hazırlanan 24 saatlik (0.1 ml de 10^8 adet/ml) kültür ile aşılanmıştır (Anonymous, 1999). Ekim yapılmış deney tüpleri vorteks tüp karıştırıcıda iyice çalkalandıktan sonra 9.0 cm çapındaki steril petri kutularına 15'er ml aktarılmış ve besiyerinin homojen bir şekilde petri kutusu içinde dağılması sağlanmıştır (Collins ve ark., 1989). Katılaştıran agar üzerine antibiyotik diskler uygun aralıklarla yerleştirilmiştir. Ekimi yapılan plaklar 4°C’de 2 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 37°C ‘de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür. Çalışma üç paralel olarak yürütülmüş ve sonuçlar ortalama değerleri ve standart sapmaları (mm) verilmiştir.

3.10. Biyojen Aminlerin HPLC ile Belirlenmesi

3.10.1. HPLC cihazı

Çalışmada kullanılan HPLC cihazının özellikleri ve kromatografi koşulları Çizelge 3.6’ de verilmiştir.

Çizelge 3.5. HPLC cihazının özellikleri ve biyojen amin analizi için kromatografi koşulları

HPLC	Shimadzu Prominence HPLC cihazı (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Kolon Fırını	CTO-20AC
Kolon	C18 (250*4.6mm), inertgil ODS3
Pompa	iki kanallı gradient pompa (Shimadzu LC-10AT)
Otosampler	SIL 20AC
Dedektör	DAD
Mobil Faz	Solvent A: 30 ml buffer / 550 ml asetonitril / 420 ml Solvent B: 2 ml buffer / 900 ml asetonitril / 100 ml su
Akış Hızı	1.3 ml/dak
Enjeksiyon	20 µl

3.10.2. Biyojen amin standart çözeltilerinin hazırlanması

Histamin, putresin ve kadaverin son konsantrasyonları 0.2 mg/ml olacak şekilde tartılıp 50 ml’lik balon jojeler içinde 0.4 M perklorik asit (HClO₄) ile çözündürülmüş ve 50 ml’ye tamamlanarak biyojen aminlerin standart stok çözeltileri hazırlanmıştır.

Ana karışımı hazırlamak için stok çözeltilerden 5'er ml alınıp 50 ml'lik balon jöjeye aktarılarak 0,4M HClO₄ ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu ana karışımdan farklı konsantrasyonlarda standart biyojen amin içerecek şekilde karışımlar hazırlanmıştır.

Örneklerin ekstraksiyon ve türevlendirilmesinde kullanılacak çözeltilerin hazırlanışı; dansil klorür (100 mg) 10 ml aseton (C₃H₆O) içinde, 2 g sodyum karbonat (Na₂CO₃) 10 ml saf suda ve 200 mg sodyum glutamat 4 ml saf suda çözündürülerek hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm çözeltiler günlük olarak hazırlanmıştır (Bütikofer ve ark., 1990).

3.10.3. Mobil faz

0.1 M Tris, 0.1 M asetik asit ve saf su sırasıyla 2, 1, 2 oranında kullanılarak pH 8 olacak şekilde HPLC mobil fazında tampon görevi görececek olan buffer hazırlanmıştır.

Solvent A, 30 ml buffer, 550 ml asetonitril, 420 ml destile su ve solvent B ise 2 ml buffer, 900 ml asetonitril, 100 ml su kullanılarak hazırlanmıştır (Bütikofer ve ark., 1990). HPLC'de kullanılan gradiyent programı Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Biyojen aminlerin ayrıştırılması için kullanılan HPLC gradient profili (1.3 ml/dak)

Süre (Dakika)	% Solvent B	% Solvent A
0.1	5	95
10	10	90
15	15	85
20	25	75
25	35	65
30	45	55
40	5	95

3.10.4. İzolatların aminoasit içeren besiyerinde geliştirilmesi

L-histidin monohidroklorit, L-lisin monohidroklorit ve L-ornitin monohidroklorit aminoasitlerinden %0.2 oranında içeren MRS broth besiyeri hazırlanıp, 15'er ml tüplere dağıtılmış ve 121°C'de 15 dak sterilize edilmiştir. Öncelikle izolatlar MRS broth besi ortamında aktifleştirilmiş (30°C, 48 saat) ve aktif kültürlerden 200'er µl L-histidin monohidroklorit, L-lisin monohidroklorit ve L-ornitin monohidroklorit içeren MRS Broth besi ortamına aşılanmıştır. Tüpler 30°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürler biyojen amin analizi için türevlendirilmiştir (Joosten ve Northolt, 1989; Maijala, 1993).

3.10.5. Ekstraksiyon ve türevlendirme

Aminoasit içeren MRS Broth besi ortamında gelişen kültürlerden 10'ar ml alınıp 50 ml'lik balon jojelere konulmuştur. Üzerlerine 25'er ml 0.4 M perklorik asitten (PCA) ilave edilerek 60 dak. çalkalanmıştır. Ardından %5'lik triklor asetik asit (TCA) ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

Ekstrakttan hazırlanan çözeltiden 400 µl alınarak önceden alüminyum folyo ile sarılmış 10 ml'lik kapaklı santrüfuj tüplerine aktarılmıştır. Üzerlerine 400 µl Na₂CO₃ ve 400 µl dansil klorür çözeltisi ilave edilip karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımlar 40°C' ye ayarlanan su banyosunda 30 dak. bekletilmiştir. Kalan dansil klorürü uzaklaştırmak için tüplere 200 µl sodyum glutaminat eklenerek karışım 40°C'lik su banyosunda 60 dak bekletilmiştir. Altmış dakikalık bekleme süresince her 15 dakkika'da bir tüpler vortekslenmiştir. Bu işlemin bitiminde tüplere 1'er ml asetonitril ilave edilerek 3500 devirde 20 dak. santrüfjlenmiştir. Üstteki faz alınarak 0.22 µm lik por çapına sahip filtrelerden geçirilmiş ve ependorf tüplerine aktararak HPLC analizine kadar -20°C' de muhafaza edilmiştir (Eerola ve ark., 1993).

3.11. Aromatik Maddelerin HPLC ile Belirlenmesi

3.11.1. HPLC cihazı

Araştırmada kullanılan HPLC cihazının özellikleri ve kromatografi koşulları Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. HPLC cihazının özellikleri ve aromatik maddelerin analizi için kromatografi koşulları

HPLC	Shimadzu Prominence HPLC cihazı (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Kolon Fırını	CTO-20AC
Kolon	C18 (250*4.6mm), inertgil ODS3
Pompa	iki kanallı gradient pompa (Shimadzu LC-10AT)
Otosampler	SIL 20AC
Dedektör	DAD (190 nm, 210 nm ve 277 nm)
Mobil Faz	% 0,5'lik metafosforik asit (MPCA)
Akış Hızı	1ml/dak
Enjeksiyon	20 µl

3.11.2. Standart çözeltilerin hazırlanması

HPLC sistemi için standartlar sodyum format, sodyum pirüvat, sodyum laktat, etanol ve 2,3-bütanediol standartları %1'lik stok standartlar şeklinde hazırlanmıştır. Bu stok standartlar içerisinde %0.5'lik 500 µl metafosforik asit (MPA) bulunan eppendorf tüpüne 1 ml ilave edilmiştir. Hazırlanan standartlar 14 noktalı dilüsyon şeklinde hazırlanarak HPLC cihazına yükleme yapılmıştır. Elde edilen standart ve örnek kromatogramları Şekil 4.14 ve Ek Şekil 5'de verilmiştir.

3.11.3. Aromatik maddelerin üretilmesi

L. plantarum suşları, 5 ml MRS sıvı besiyeri içeren tüplere ekim yapılarak 37°C'de 24 saat süreyle aktifleştirilmiştir. Aktif *L. plantarum* suşları MRS Agar içeren petrilere çizgi ekim yapılarak tek koloni elde edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen tek koloniler 5 ml MRS sıvı besiyeri içeren tüplere ekim yapılarak 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra *L. plantarum* kültürü içeren tüpler 8000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilerek süpernatant kısmından 1 ml alınarak içinde 1 ml %1'lik metafosforik asit (MPA) bulunan eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Tüp 2 dak. vorteks ile karıştırıldıktan sonra 12000 rpm'de 2 dak. santrifüj edilerek süpernatant kısmında 0.5 ml alınarak viallere aktarılmıştır. Elde edilen süpernatantlarda aromatik maddelerin belirlenmesi için HPLC cihazına örnekler yüklenmiştir.

3.12. Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda antibiyogram, biyojen amin ve aromatik maddelerin analiz sonuçlarına ilişkin verilerin ortalama ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Turşu üretiminde uygun konsantrasyonda tuzlu suyun kullanılması, fermente olabilecek ve asit oluşturacak karbonhidratların varlığı, laktik asit bakterilerinin etkin olması, diğer mikroorganizmaların faaliyetinin engellenmesi, starter kültür kullanılması ve kontrol şartlarının sağlanması başarılı bir fermantasyonun temelini oluşturmaktadır (Şahin, 1982). Gıda endüstrisinde kullanılan starter kültürlerin, arzu edilen genetik yapı, tat, koku ve aromatik özellikleri, üretim kapasiteleri ve hedeflenen fermente ürünlere olumlu özellikler kazandıran suşlardan seçilmesi önemli olmuştur (Tamime ve Robinson, 1999).

Çalışmanın bu bölümünde Türkiye'nin değişik bölgelerinden geleneksel metotlarla yapılan turşu örneklerinden laktik asit bakteri izolasyonu yapılmıştır. Alınan turşu örneklerinden toplam 161 adet *Lactobacillus* izole edilmiş ve daha sonraki yapılacak olan çalışmalarda kullanılmak üzere -18 °C'de stoklanmıştır. Çizelge 4.1'de turşu örneklerinin toplandığı yerler ve izole edilen suşlar ile ilgili bilgiler verilmiştir.

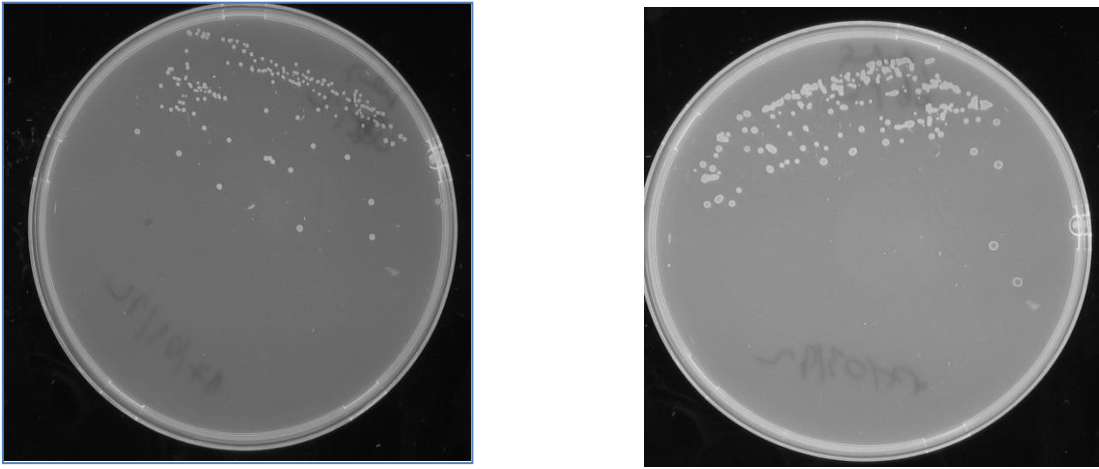
Çizelge 4.1. Farklı yörelerden toplanan turşu örneklerinden elde edilen *L. plantarum*'un izolat sayıları

Alındığı Yer	Toplam İzolat Sayısı	<i>L. plantarum</i> Sayısı
Ağrı	19	8
Bingöl/Solhan	2	1
Bitlis/Tatvan	16	5
Diyarbakır	5	4
Gaziantep	1	1
Hakkari	2	0
Mersin	18	4
İstanbul	10	5
İzmir	2	0
K. Maraş/Elbistan	2	1
Kahramanmaraş	29	10
Kars	4	2
Mardin	3	1
Muş	23	12
Muş/Sungu	6	3
Şanlıurfa	16	5
Van	3	1
Toplam	161	63

*Aynı turşu örneğinden birden fazla mikroorganizma elde edilmiş, bunlardan sadece bir koloni alınarak saklanmıştır.

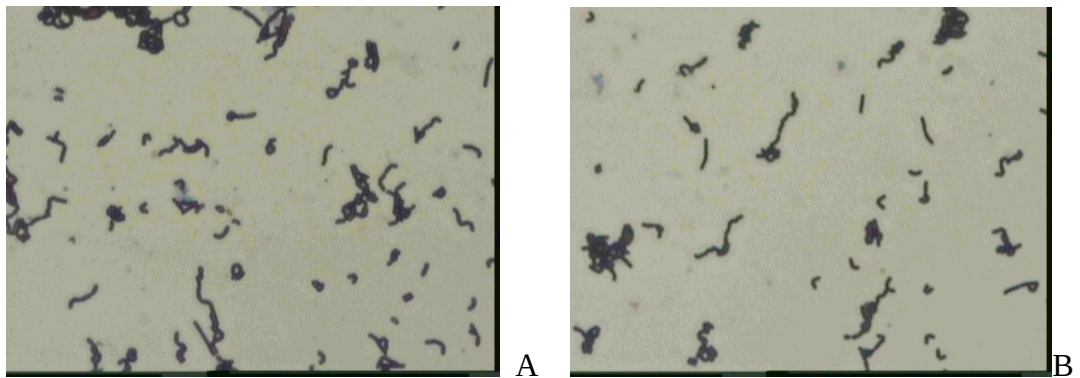
4.1.1. İzolatların biyokimyasal ve morfolojik olarak tanımlanması

LAB izolatlarının saf kültür olarak elde edildikten sonra biyokimyasal yöntemlerle tanımlanmasında, gram reaksiyonu, mikroskopik morfoloji ve katalaz aktivitesine bakılmıştır. İzole edilen *L. plantarum*'lar MRS agar besiy ortamına inoküle edildikten sonra, petrilerde beyaz-krem renkli koloni görünüşleri ile ayırt edilebilmektedir. MRS agar petrilere inoküle edilen ve 48 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloni görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. MRS agar petrilere aşılanan *Lactobacillus*'a ait koloni görüntüsü

Doğal turşu örneklerinden izolasyonu yapılan 161 izolatın gram boyama sonucunda gram pozitif olduğu belirlenmiştir. İzole edilen suşlardan *L. plantarum*'ın gram boyama sonucunda elde edilen mikroskopik görüntüsü Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Turşudan izole edilen *L. plantarum* (A:1 ve B: 50 nolu izolat) suşunun gram boyama görüntüsü

LAB oksidatif stres sonucu oluşan oksijen türevlerinden hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturmakta ancak katalaz enzimi eksikliğinden dolayı hidrojen peroksiti oksijen ve

H₂O'ya parçalayamamaktadır. Katalaz özelliği LAB tayininde pratik bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan izolatlara morfolojik incelemeden sonra katalaz testi uygulanmıştır ve 161 izolatın tamamının katalaz negatif olduğu tespit edilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmalarında geleneksel olarak kullanılan taksonomik sınıflandırmanın temeli, fizyolojik, morfolojik ve farklı sıcaklıklarda, pH değerlerinde, tuz konsantrasyonlarında gelişim, arjinin degradasyonu ve karbonhidrat katabolizması gibi metabolik/biyokimyasal özelliklerin incelenmesini içeren fenotipik özelliklere dayanmaktadır (Gobbetti ve ark., 2005).

Singh ve Singh (2014) yaptıkları çalışmada, farklı dönemlerde olgunlaştırılmış 12 adet kaliteli Hint Cheddar peynirinden 243 adet starter olmayan laktobasiller izole edilmiştir. Bu izolatların şeker fermentasyon deneyine ve PCR yöntemine göre tür düzeyinde sınıflandırma yapılmıştır. Fenotipe göre geçici karakterizasyon yapılırken esas olanı ise PCR ile hedef rRNA ile yapılan sınıflandırmadır. Bu izolatlardan fenotipik olarak 217 (%89.3) sınıflandırılması yapılmıştır. Bu izolatlardan 113 tanesi (%57.07) *L. paracasei* ve 85 izolatında *L. plantarum* (%39.17) olduğunu tespit etmişlerdir.

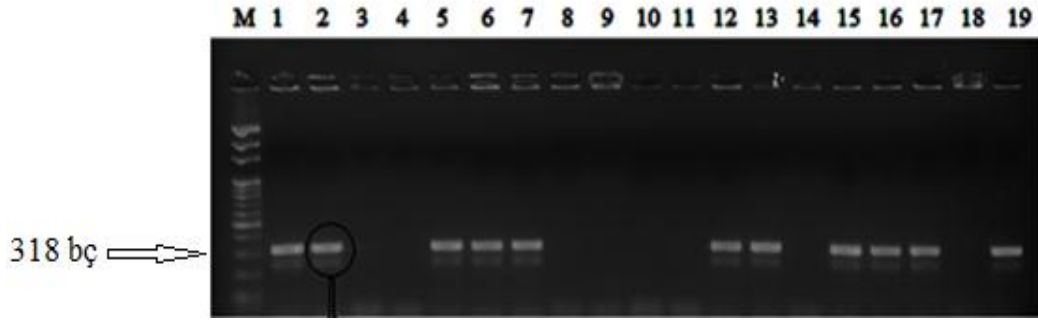
4.1.2. İzolatların *rec A* gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması

LAB'ın tanımlanması ve karakterizasyonu endüstriyel ve bilimsel açıdan önem kazanan bir konu haline gelmiştir. *L. plantarum*'ların tanımlanabilmesi amacıyla bunların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri ile antibiyotik duyarlılıkları ve faj tiplerinin belirlenmesini ve serolojik olarak tiplendirilmelerini içeren klasik yöntemlerin yanında son yıllarda güncellik kazanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi, Çoğaltılmış rDNA'nın Restriksiyon Analizi, Pulsed Field Jel Elektforezi, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektforezi ve DNA dizilim analizi gibi moleküler biyoloji tekniklerinden de yararlanılabildiği belirtilmiştir (Busch ve Nitschko, 1999).

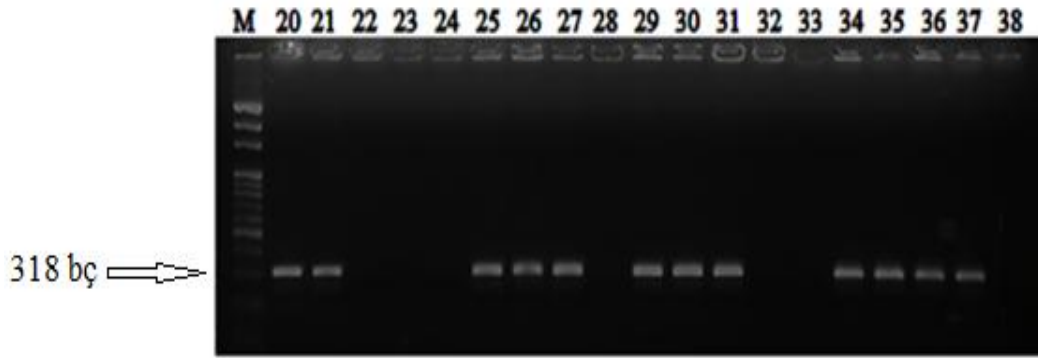
Çalışmada, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine bakılarak *Lactobacillus* olduğu tespit edilen 161 izolatın petri kutularına ekimi yapılmıştır. Petrilerden alınan tek *Lactobacillus* kolonilerinin moleküler olarak tanımlanması için *recA* genin planF-planR primer kullanıldı. Kullanılan primerler Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Primer çiftleri (planF-planR) *L. plantarum* için *recA* gen bölgesi PCR ile çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır. PlanF-planR primer çifti ile *L. plantarum* türlerinde 318 bp uzunluğundaki bölgenin çoğaltılması hedeflenmiştir. PCR reaksiyonu, 3.6.2.1'de

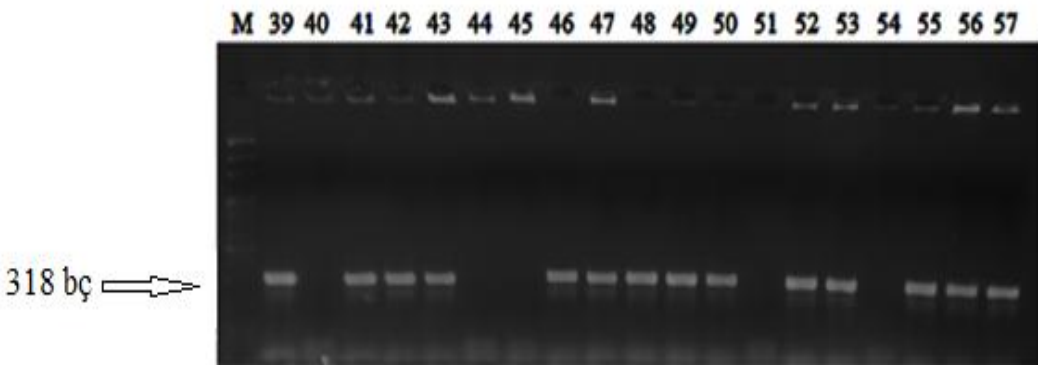
detaylandırılan PCR çalışma şartlarında çoğaltılan PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.3-8).



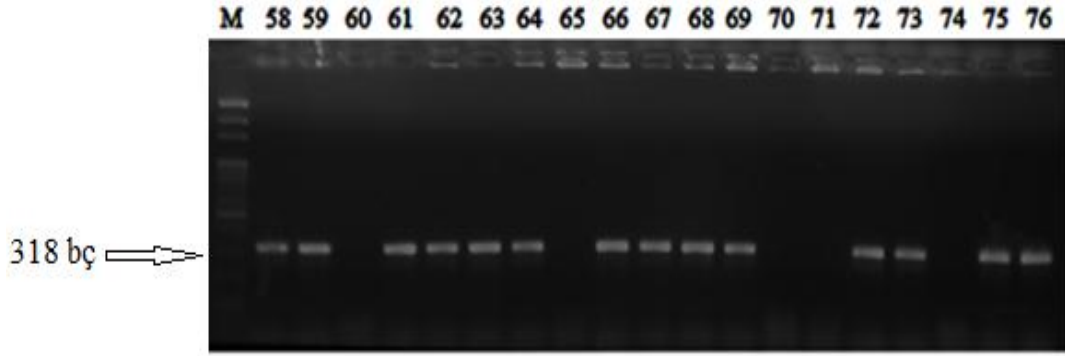
Şekil 4.3. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (1-19. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı



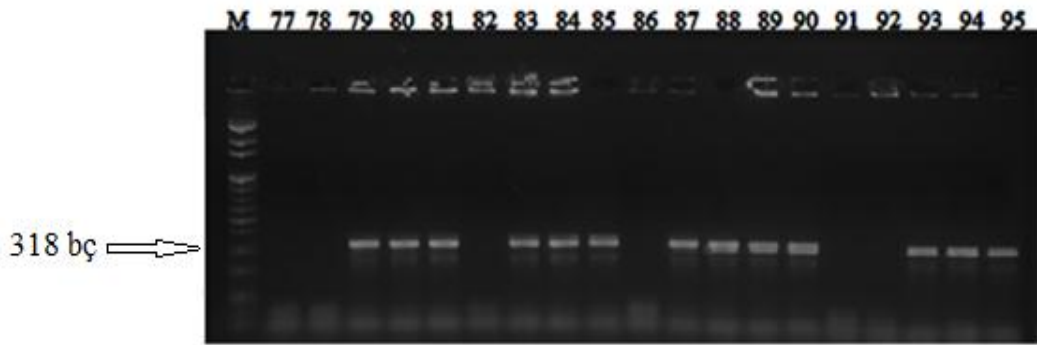
Şekil 4.4. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (20-38. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı



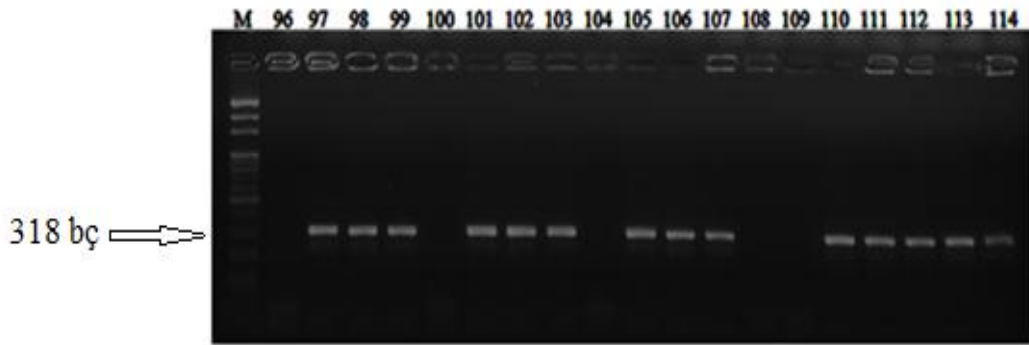
Şekil 4.5. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (39-57. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı



Şekil 4.6. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (58-76. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı



Şekil 4.7. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (77-95. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı



Şekil 4.8. Doğal turşulardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (96-114. izolatlar) PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı

Farklı *Lactobacillus* türlerinin (*L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum*) moleküler olarak tanımlanmasında *recA* gen bölgesi primerleri kullanılmıştır. PCR sonuçlarına göre *recA* gen bölgesi primerleri *L. plantarum* için 318 bç uzunluğundaki

bölgeyi kopyalarken, *L. pentosus* için 218 bç, *L. paraplantarum* da ise bu gen 107 bç'lik bir bölgeyi kopyaladığı belirtilmiştir (Torriani ve ark., 2001).

Bu çalışmada izole edilen laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemle *recA* gen bölgesi primeri kullanılarak tanımlamaları yapılmıştır. Elde edilen izolatların PCR ile tanımlanması sonucunda 318 bç'de DNA bandı veren toplam 78 adet şüpheli *L. plantarum* izolatu elde edilmiştir.

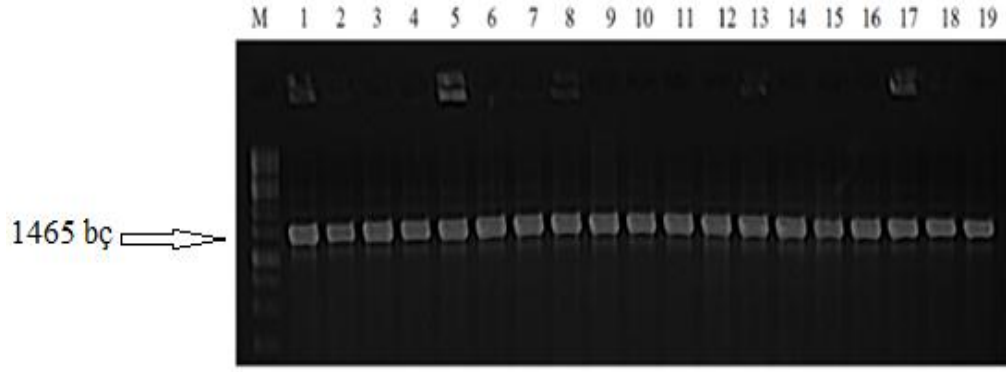
Biyokimyasal tanımlama safhaları, moleküler tanımlamalardan önce potansiyel bazı izolatların sayısal olarak elenmesi ve tasarlanan primerin istenmeyen bölgeye bağlanabilme ihtimalinin eliminasyonu açısından önemlidir (Huys ve ark., 2003). Biyokimyasal tanımlama yapılmadan planlanan moleküler tanımlamalar için kullanılacak primerler çok sayıdaki kolonilerden bazılarında yanlış tanımlamalara sebep olabilmektedir. Dolayısı ile moleküler tanımlama ile biyokimyasal tanımlamalar birlikte değerlendirildiğinde daha etkin bir tanımlama yapılabilir (Tabasco ve ark., 2007).

Petri ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada, şaraptaki 13 LAB türlerini (*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. curvatus*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus acidilactici*, *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* ve *Weissella paramesenteroides*) hızlı ve eş zamanlı olarak saptanması için PCR metodunu kullanarak tespit etmişlerdir.

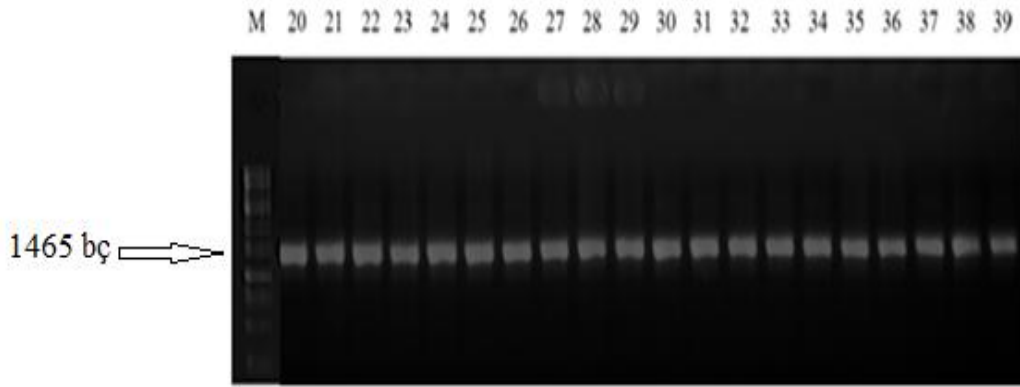
Sonuç olarak, bu çalışmada *L. plantarum* suşu olabilecek izolatların biyokimyasal ve moleküler yöntem ile tanımlanarak doğrulanmıştır. Elde edilen bulgularımız moleküler identifikasyon hakkındaki literatür bilgileriyle benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

4.1.3. İzolatların 16S rRNA gen bölgesi PCR sonuçları

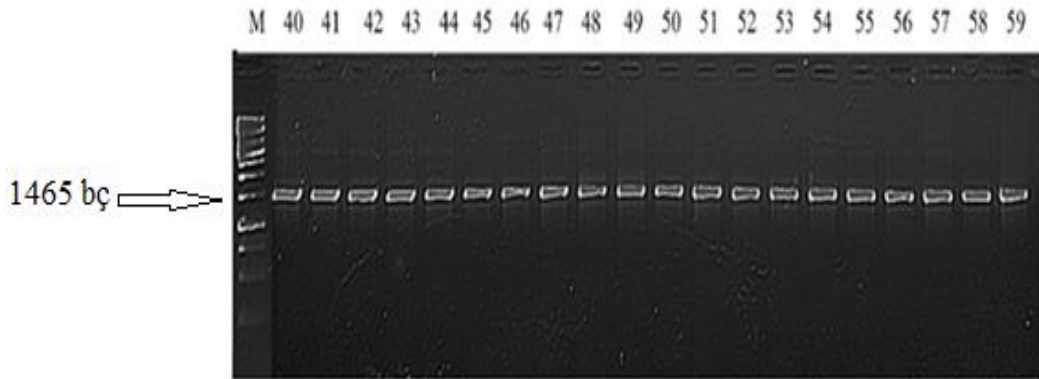
Çalışmada, *recA* gen bölgesi tespit edilmiş olan 78 adet şüpheli *L. plantarum* izolatından DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatlara ait DNA'lar evrensel 16S rRNA primeri kullanılarak PCR'ları yapılmıştır. Evrensel 16S rRNA primer ile oluşturulan PCR reaksiyonları sonucunda yaklaşık olarak 1465 bç uzunluğundaki bölgelerin çoğaltılması hedeflenmiştir. Çalışma sonucunda oluşan PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.9-12).



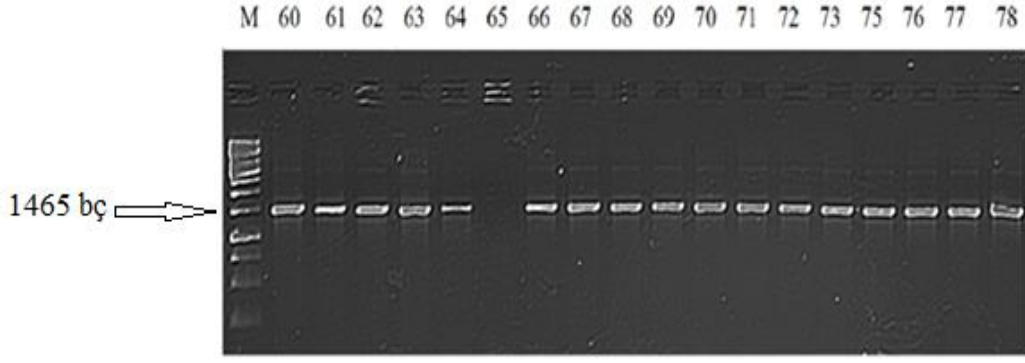
Şekil 4.9. *L. plantarum* izolatlarının (1-19) 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü. M: 1000 bç DNA standardı



Şekil 4.10. *L. plantarum* izolatlarının (20-39) 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü. M: 1000 bç DNA standardı



Şekil 4.11. *L. plantarum* izolatlarının (40-59) 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü. M: 1000 bç DNA standardı



Şekil 4.12. *L. plantarum* izolatlarının (60-78) 16S rRNA geninin PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü. M: 1000 bç DNA standardı

Bu çalışmada *recA* gen bölgesi primerleri kullanılarak tanımlanması yapılmış olan şüpheli *L. plantarum* izolatlarının evrensel 16S rRNA primeri kullanılarak moleküler tanımlanması yapılmıştır. Elde edilen izolatların PCR ile tanımlanması sonucunda toplam 77 adet şüpheli *L. plantarum* izolatu elde verilmiştir.

4.1.4. İzolatların 16S rRNA PCR ürünlerinin DNA dizi analiz sonuçları

PCR sonucunun 16S rRNA genine ait olup olmadığını doğrulamak için dizi analizi (sekanslama) yapılmıştır. Sekans sonucunda elde edilen dizilerden *L. plantarum* 3 nolu izolatu dizisi Şekil 4.10’da belirtilmiştir.

> *L. plantarum* 3 F

```
TGCAAGTCGACGACTCTGGWATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTG
GYGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGG
ATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGT
CGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATT
GCTAGATGGTGRGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGA
AGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
GTGAGTGAAGAASGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACAT
TCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCT
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT
ATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTT
GGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAG
ACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACAC
AGTGCGGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTAT
```

GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATG
TAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATT
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGCCC
CMMAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAGCTACGCGAGACCTTACCAGG
CTTTGGAAC

> *L. plantarum* 3 R

ATTGASCAAWCWCGKWTATGTTCCAAAGACCTYGGTAAGTCTCGCGTAGCT
GAATWAAACAMCATGCTCMACGCTTGTGCGAGCCCCCGTCAAATTCCTTTG
GTTTCAGCCTTGCGGCCGWACTTCCSCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCT
CAGCACTGAAAGGCGGAAACCCTCCAACACTWAGCATTTCATCGTTTACGGTA
GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATACTTTTCGAGCCTCAGCGT
AGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACG
ATTTACCCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCC
GTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAA
ACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTA
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACC
TCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTT
CGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCRGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCC
TTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAG
CCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGA
CCGTTACCYCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAG
CGAAGCCATCTTTCAARCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTA
CATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACT
ACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAATW
CAGAGTCGTGCACTTGCAT

Şekil 4.13. Doğal turşulardan izole edilen *L. plantarum* 3 nolu izolatu 16S rRNA genine ait dizi analizi sonuçları

Evrensel 16S rRNA primeri kullanılarak yapılan PCR sonucundaki ürünlerin DNA sekans analizi ile elde edilen diziler Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı kullanılarak *L. plantarum* suşlarına olan benzerlikleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Doğal turşulardan izole edilen *L. plantarum* suşlarının sekans analiz sonuçları

İzolatlar	16S rRNA	Benzerlik oranı, %
1	<i>L. plantarum</i> ZG3-19	99
2	<i>L. plantarum</i> D14	98
3	<i>L. plantarum</i> qz145-1	99
4	<i>L. plantarum</i> N30-1	98
5	<i>L. plantarum</i> qz1193	99
6	<i>L. plantarum</i> g13	98
7	<i>L. plantarum</i> qz1193	98
8	<i>L. plantarum</i> PON100351	97
9	<i>L. plantarum</i> qz138x	99
10	<i>L. plantarum</i> qz1193	99
12	<i>L. plantarum</i> RU24-1	98
13	<i>L. plantarum</i> Lp-01	99
14	<i>L. plantarum</i> qz-573-2	99
15	<i>L. plantarum</i> qz138x	98
16	<i>L. plantarum</i> I041712	98
17	<i>L. plantarum</i> T30-PCM02	99
18	<i>L. plantarum</i> IMAU70004	98
19	<i>L. plantarum</i> PX0076	98
20	<i>L. plantarum</i> ZG3-19	98
21	<i>L. plantarum</i> qz1193	99
22	<i>L. plantarum</i> L1212	98
23	<i>L. plantarum</i> FQ011	99
24	<i>L. plantarum</i> WX211	97
25	<i>L. plantarum</i> T30-PCM02	99
26	<i>L. plantarum</i> DSPV 354T	98
29	<i>L. plantarum</i> 3m-1	98
31	<i>L. plantarum</i> RU24-1	98
32	<i>L. plantarum</i> KCC-17	98
33	<i>L. plantarum</i> IMAU32388	98
35	<i>L. plantarum</i> RU24-1	99
36	<i>L. plantarum</i> LAB1	96
38	<i>L. plantarum</i> FQ011	98
39	<i>L. plantarum</i> ZG3-19	98
40	<i>L. plantarum</i> CAI6	97
41	<i>L. plantarum</i> DSPV 354T	97
42	<i>L. plantarum</i> FQ011	99
43	<i>L. plantarum</i> qz-574-1	89
44	<i>L. plantarum</i> FQ011	99
45	<i>L. plantarum</i> qz1195	99
46	<i>L. plantarum</i> 3m-1	98
47	<i>L. plantarum</i> qz138x	98
48	<i>L. plantarum</i> NS5	97
49	<i>L. plantarum</i> FQ011	98

Çizelge 4.2'inin devamı

İzolatlar	16S rRNA	Benzerlik oranı, %
50	<i>L. plantarum</i> WX211	97
51	<i>L. plantarum</i> T30-PCM02	98
52	<i>L. plantarum</i> THK-aB116	99
53	<i>L. plantarum</i> N30-1	98
54	<i>L. plantarum</i> qz-573-2	98
55	<i>L. plantarum</i> qz-573-2	98
56	<i>L. plantarum</i> JJ 29	94
60	<i>L. plantarum</i> PON100351	99
62	<i>L. plantarum</i> qz138x	98
63	<i>L. plantarum</i> ZG3-19	99
64	<i>L. plantarum</i> WX211	97
67	<i>L. plantarum</i> clone 6C4	86
68	<i>L. plantarum</i> 20.1	99
69	<i>L. plantarum</i> FQ011	98
70	<i>L. plantarum</i> ZG3-19	98
73	<i>L. plantarum</i> FQ011	98
74	<i>L. plantarum</i> qz1193	98
76	<i>L. plantarum</i> DSPV 354T	98
50	<i>L. plantarum</i> WX211	97
51	<i>L. plantarum</i> T30-PCM02	98
52	<i>L. plantarum</i> THK-aB116	99
53	<i>L. plantarum</i> N30-1	98
54	<i>L. plantarum</i> qz-573-2	98
55	<i>L. plantarum</i> qz-573-2	98
56	<i>L. plantarum</i> JJ 29	94
60	<i>L. plantarum</i> PON100351	99
62	<i>L. plantarum</i> qz138x	98
63	<i>L. plantarum</i> ZG3-19	99
64	<i>L. plantarum</i> WX211	97
67	<i>L. plantarum</i> clone 6C4	86
68	<i>L. plantarum</i> 20.1	99
69	<i>L. plantarum</i> FQ011	98
70	<i>L. plantarum</i> ZG3-19	98
73	<i>L. plantarum</i> FQ011	98
74	<i>L. plantarum</i> qz1193	98
76	<i>L. plantarum</i> DSPV 354T	98
77	<i>L. plantarum</i> qz1193	96
78	<i>L. plantarum</i> qz1193	98

DNA sekans analizi sonucunda elde edilen dizilerin BLAST programında yapılan karşılaştırmaları sonucunda 63 izolatın *L. plantarum* suşlarına benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

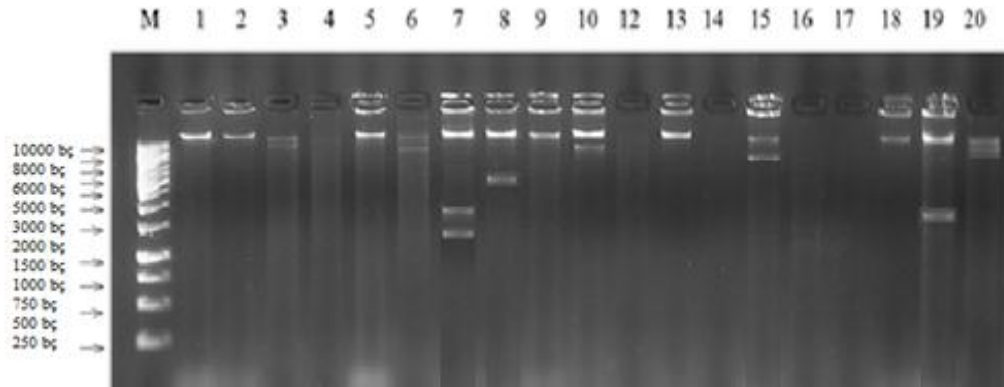
4.2. Plazmit İzolasyonu ve Antibiyotik Direnç Özellikleri

4.2.1. *L. plantarum* izolatlarından plazmit izolasyonu

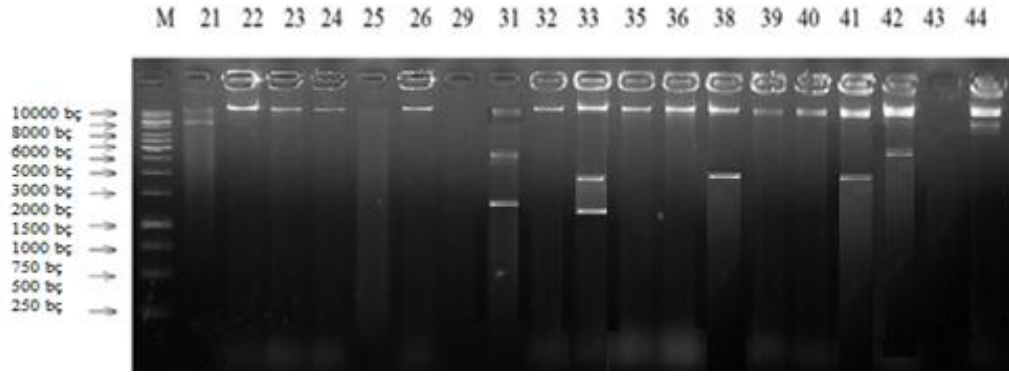
Bakterilerin fermentasyon yetenekleri yalnızca kromozom üzerindeki genlerden kaynaklanmamaktadır. Bakteriler gelişim sürecinde zamanla diğer mikroorganizmalardan genetik materyal olan plazmitleri kazanabilmektedirler. Bu plazmitler bakterilere olumsuz şartlarda dayanıklılık sağladıkları gibi aroma sebebi olarak tarif ettiğimiz metabolitleride üretebilecek genleri de taşıyabilmektedirler. Plazmitler glikoliz, amino asit metabolizması, yağ asidi sentezi, disakkaritlerin yıkılması, bakteriyosin sentezi gibi görevlerde bulunabilmektedir. Plazmitler lezzet oluşumuna ilave olarak kendi mikroorganizmasını fajlara karşı koruma görevi de üstlenmektedirler (Aslım ve Beyatlı, 2004).

Plazmitler farklı (3-60 kbç) büyüklükte olabilmekte ve büyüklüğüne bağlı olarak birkaç proteinden yüzlerce proteine kadar değişen sayıda proteini kodlayabilmektedirler (Nordström, 2006).

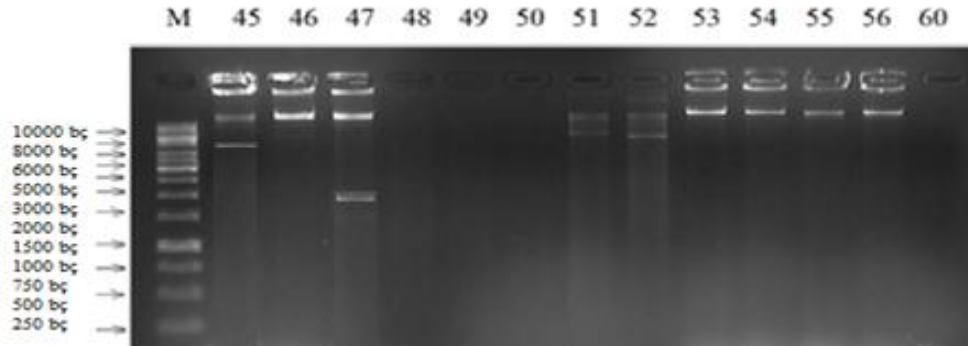
Çalışmanın bu bölümünde 63 adet *L. plantarum*'dan izole edilen plazmitler sayı ve büyüklük açısından incelenmiştir. Plazmit izolasyon sonucu elde edilen izolatlara ait jel görüntüsü Şekil 4.11-14'de verilmiştir. İzolatların içerdikleri plazmitler sayısal olarak değerlendirildiğinde genelde 1 tane plazmit içerdiği fakat aynı izolatta en fazla üç adet farklı plazmitin varlığı tespit edilmiştir.



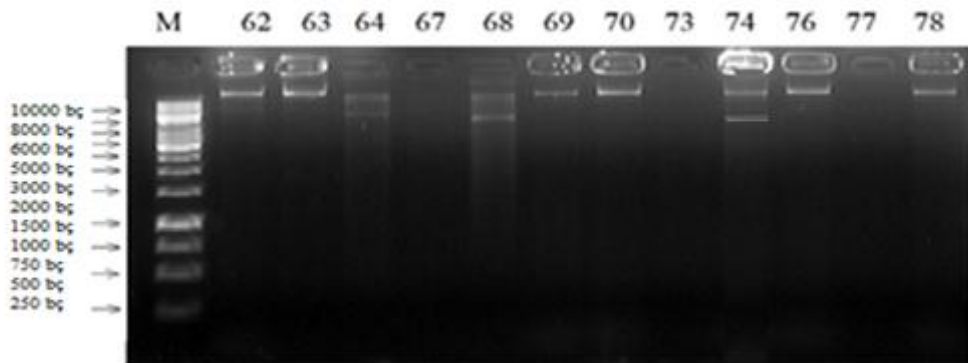
Şekil 4.14. *L. plantarum* izolatlarının (1-20. izolat) plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 1000 bç DNA standardı



Şekil 4.15. *L. plantarum* izolatlarının (21-44. izolat) plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 1000 bp DNA standardı



Şekil 4.16. *L. plantarum* izolatlarının (45-60. izolat) plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 1000 bp DNA standardı



Şekil 4.17. *L. plantarum* izolatlarının (62-78. izolat) plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 1000 bp DNA standardı

Çizelge 4.3. Doğal turşulardan izole edilen *L. plantarum* suşlarının plazmit içerikleri

İzolatlar	Plazmit Sayısı	Plazmit Büyüklüğü (bç)
1	1	>10000
2	1	>10000
3	2	6000, 8000
4	0	-
5	1	>10000
6	2	5000, 8000
7	3	1250, 2000, >10000
8	2	3000, >10000
9	1	>10000
10	2	8000, >10000
12	0	-
13	1	>10000
14	0	-
15	2	6000, 10000
16	0	-
17	0	-
18	1	>10000
19	2	1500, >10000
20	2	6000, 8000
21	2	5500, >10000
22	1	>10000
23	1	>10000
24	1	>10000
25	0	-
26	1	>10000
29	0	-
31	3	1100, 2500, >10000
32	1	>10000
33	3	1250, 1750, >10000
35	1	>10000
36	1	>10000
38	2	1800, >10000
39	1	>10000
40	1	>10000
41	2	1600, >10000
42	2	2500, >10000
43	0	-
44	2	8000, >10000
45	2	4500, >10000
46	1	>10000
47	2	1750, >10000
48	0	-
49	0	-
50	0	-
51	2	6000, 10000
52	2	5500, 10000

Çizelge 4.3'ün devamı

İzolatlar	Plazmit Sayısı	Plazmit Büyüklüğü (bç)
53	1	>10000
54	1	>10000
55	1	>10000
56	1	>10000
60	0	-
62	1	>10000
63	1	>10000
64	2	5750, 10000
67	0	-
68	2	5000, 10000
69	1	>10000
70	1	>10000
73	0	-
74	2	4000, >10000
76	1	>10000
77	0	-
78	1	>10000

L. plantarum suşlarından izole edilen plazmit sayıları 1 ila 3 arasında değişmektedir. Plazmitler büyüklükleri yönünden değerlendirildiğinde, en büyük plazmitin yaklaşık 10000 bç'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. *L. plantarum* izolatlarında toplam 26 tane tek plazmit varlığı tespit edilmiştir. En küçük plazmitin ise 31 nolu izolatta yaklaşık 1100 bç büyüklükte olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2).

L. plantarum'un 3 ve 20 nolu izolatında 6000, 8000 bç, 15 ve 51 nolu izolatlarda ise 6000, 10000 bç büyüklüğünde 2 adet plazmit içerdiği belirlenmiştir. İzolatlardan 7, 31 ve 33 nolu olanlarında 3 tane, 15 tanesinde ise plazmit varlığı tespit edilmemiştir.

L. plantarum izolatlarından 26 adedinin tek plazmit içermesi, bu izolatların doğal koşullarda değişik plazmitlerini kaybetmiş olması veya doğal kültürlerden plazmit almış ticari kültürler olması ile açıklanabilir. Sahip olduğu plazmiti kaybetmiş olan izolatlar bu plazmitleri tekrar geri kazanması zordur (Leewatcharamas ve ark., 1997) dolayısıyla tek plazmit içeren izolatların yalnızca ticari kültürlerden oluşamayacağı görüşünü desteklemektedir. Ayrıca plazmitlerin taşıdıkları transpozonlar diğer plazmitlerin geçişini sınırlayabilir (Romero ve Klaenhammer, 1990). Tanımlanan 115 *S. thermophilus* ve 35 *L. bulgaricus* izolatının plazmit DNA izolasyonları yapılmış. Tüm izolatlar içerisinde *S. thermophilus*'ların 78, *L. bulgaricus*'ların ise 26 tanesinin değişen sayılarda plazmit

taşıdığı belirlenmiştir. *S. thermophilus*'ların plazmit içeriğinin (1-4), *L. bulgaricus*'lardan (1-2) daha fazla olduğu tespit etmiştir (Gezginç, 2010).

Laktik asit bakterilerinde, alkali denatürasyon yöntemi kullanılarak yapılan plazmit izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi çalışmaları sonucu; büyüklükleri 33250 ile 1883 bp arasında değişen 1-14 tanesinin plazmit içerdiğini tespit etmişlerdir. Toplam 88 adet bakteri içerisinde 20 adedinin sadece bir plazmit içerdiğini belirlemişlerdir. Belirlenen plazmit sayı ve büyüklükleri, benzer araştırmalarda tanımlanan sınırlar içerisinde yer almaktadır (Anderson ve Mckay, 1983). Bu araştırmada elde edilen bulgular, çalışmamızda tespit ettiğimiz sonuçlarla uygunluk göstermektedir.

4.2.2. İzolatların antibiyotik direnç özellikleri

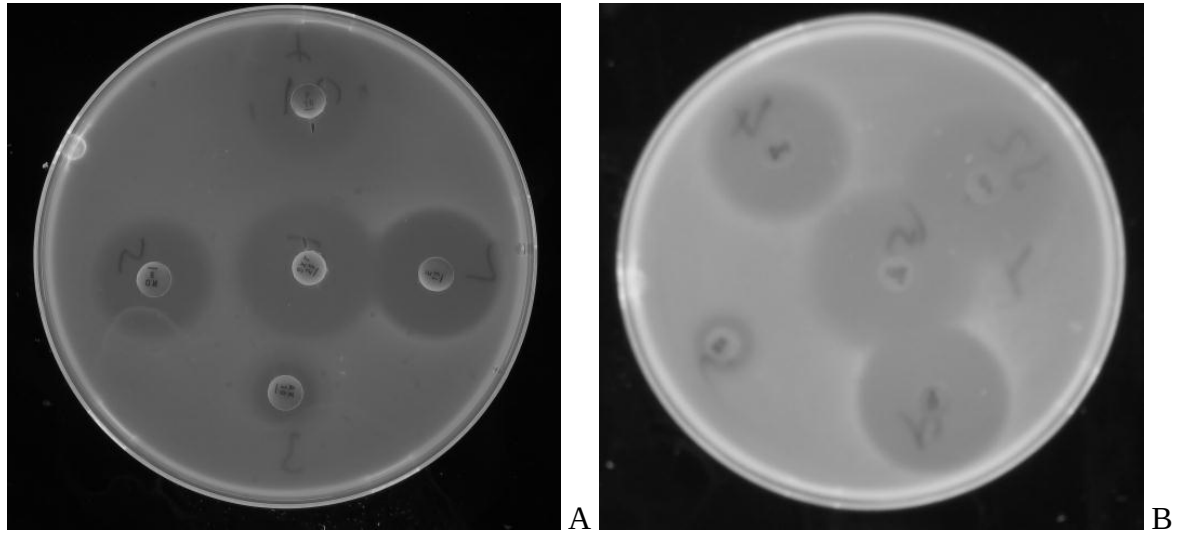
Klinikte kullanılan antibiyotiklerden bağırsak florasının ve probiyotiklerin etkilenmemesi en önemli tercih sebeplerinden biridir. Muhtemel probiyotik olarak kullanılabilecek bazı suşların bazı antibiyotiklere karşı dirençlilikleri belirlenmiştir. El edilen sonuçlara göre, antibiyotiklere direnç gösteren muhtemel probiyotiklerin klinikte kullanılan antibiyotiklerle birlikte kullanımı önerilebilir. Bununla birlikte bakteriler, antibiyotik direnç yeteneğine sahip ve çok iyi uyum sağlayan canlılardır. Antibiyotiklerin, son on yılda yanlış kullanımları nedeniyle, özellikle yoğun bakım hastalarında ve bebeklerde hastane infeksiyonlarına bağlı ölüm olaylarına rastlanmaktadır. Son 20-30 yıldır, antibiyotiklerin seçimi ve dirençlerinin yayılması üzerine yapılan çalışmalar başta klinikte akraba türler üzerine odaklanılmıştır. Birçok araştırmacı laktik asit bakterilerinin, insan vücudunda yaşayan diğer patojen veya benzeri bakteriler için antibiyotik direnç genleri açısından bir rezervuar olduğunu tahmin etmektedirler. Bu bakterilerin patojen bakterilere antibiyotik direnç genlerini transfer etme yetenekleri, insan ve hayvan sağlığı açısından önemli bir sorun olup, bakteri popülasyonlarında antibiyotik direnç genlerinin nasıl yayıldığına anlaşılmaması açısından önemlidir (Mathur ve Singh, 2005).

Antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılması faydalı bakteriler, probiyotik bakteriler ve fermente ürünlerde rol alan laktik asit bakterileri gibi, gıda zinciri açısından önem taşıyan bakterilerin insan ve hayvanlarda tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmesine neden olmaktadır. Söz konusu laktik asit bakterilerinde en çok tetrasiklin ve eritromisin dirençliliğine rastlandığı belirtilmektedir. Taşınan bu antibiyotik direnç genlerinin, çoğunun horizontal taşınma ile yayıldığı düşünülmektedir. Yapılan birçok araştırmada, insan ve hayvan bağırsağındaki bakterilerin hemen hemen aynı

antibiyotiklere karşı direnç göstermeleri de organizmalar arasında direnç geninin transfer olasılığını ve yayılmasını doğrulamıştır (Ammor ve ark., 2007).

Çalışmanın bu bölümünde izole edilen bakterilerin penicillin G (10 µg), eritromisin (15 µg), rifampisin (5 µg), trimethoprim (25 µg) ve amikacin (30 µg), gibi 5 farklı antibiyotiğe karşı göstermiş olduğu direnç-duyarlılık sonuçları belirlenmiştir. Antibiyotiğe karşı direnç özelliği her bir izolat için 3.8.1’de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve elde edilen değerler Çizelge 4.4’te verilmiştir.

L. plantarum 15 ve 32 nolu suşların antibiyotiklere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları Şekil 4.15’de görüntülenmiştir.



Şekil 4.18. 15 (A) ve 32 (B) nolu izolatların antibiyotik direnç özelliklerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen zon görüntüleri

Çizelge 4.4. Doğal turşulardan izole edilen *L. plantarum* suşların antibiyotik dirençlilikleri

İzolatlar	Penicillin	Eritromisin	Amikasin	Rifampisin	Trimethoprim
1	21±1.52*	21±1.52	R	17±0.57	19±2.64
2	31±1.15	32±2.00	R	28±1.52	31±1.00
3	24±1.52	25±1.15	R	18±1.15	28±0.57
4	27±0.57	27±0.57	12±1.52	22±2.00	22±2.00
5	24±0.57	23±1.00	R	16±1.52	22±1.52
6	15±1.52	20±2.08	R	16±1.00	23±0.57
7	27±1.00	24±2.51	R	20±0.57	24±1.15
8	20±0.57	20±0.57	R	18±1.15	20±1.00
9	25±1.15	25±1.15	R	22±0.57	27±1.52
10	15±1.52	21±1.52	R	21±1.00	23±1.15

Çizelge 4.4'ün devamı

İzolatlar	Penicillin	Eritromisin	Amikasin	Rifampisin	Trimethoprim
12	25±2.00	22±1.00	R	18±1.52	22±2.64
13	26±0.57	26±1.52	R	25±0.57	26±1.52
14	21±2.08	21±2.51	R	17±1.52	22±0.57
15	24±1.52	23±1.15	11±1.15	17±0.57	24±2.00
16	20±2.00	21±2.30	R	16±1.15	23±1.52
17	25±1.73	23±3.05	10±0.57	17±2.08	22±1.00
18	20±2.51	21±1.73	13±1.00	17±1.52	23±1.15
19	25±2.08	27±2.08	13±1.73	28±1.15	34±0.57
20	32±0.57	29±2.51	14±1.52	27±1.00	30±2.00
21	18±2.51	23±1.00	R	21±1.52	24±1.00
22	24±1.52	24±1.52	R	17±1.15	23±1.73
23	24±1.15	25±2.51	R	17±0.57	24±0.57
24	25±2.51	26±1.00	R	20±1.52	25±2.51
25	26±1.00	24±3.51	10±0.57	24±2.00	25±1.73
26	23±0.57	24±1.73	R	21±1.00	23±1.00
29	41±1.73	39±2.64	15±1.52	32±2.08	50±2.00
31	40±1.52	26±2.51	12±0.57	30±1.00	29±1.73
32	23±0.57	23±2.08	10±1.00	20±1.52	21±2.08
33	23±2.08	27±1.52	12±1.15	23±1.15	23±1.15
35	19±1.15	23±2.64	R	15±1.52	23±1.52
36	21±1.73	22±1.52	R	21±1.73	25±2.00
38	22±1.15	26±3.05	R	24±0.57	30±0.57
39	37±1.00	30±2.51	R	30±1.52	35±1.15
40	26±0.57	28±2.0	12±0.57	28±1.00	32±1.52
41	36±2.51	34±1.52	17±1.52	31±1.15	20±0.57
42	23±2.08	21±2.64	R	19±0.57	20±1.00
43	26±1.52	26±1.73	R	19±1.00	26±1.52
44	28±0.57	25±2.51	R	23±1.73	23±1.73
45	R	R	R	R	R
46	27±1.73	24±2.00	R	19±1.15	26±1.00
47	30±1.52	30±1.52	12±1.00	30±1.52	22±1.52
48	27±2.00	28±1.00	R	23±1.00	26±2.00
49	29±1.15	29±1.15	15±0.57	26±0.57	20±0.57
50	38±2.51	29±2.08	R	23±2.00	23±2.08
51	39±1.15	34±2.51	R	31±1.00	33±1.52
52	19±0.57	24±3	R	17±0.57	24±0.57
53	42±1.52	36±1.52	11±1.52	33±1.52	35±1.73
54	21±0.57	23±2.08	R	22±2.08	27±2.08
55	28±1.00	27±1.15	R	20±1.15	23±2.00
56	23±1.52	27±2.64	R	25±2.64	31±3.05
60	41±1.15	40±2.00	14±1.00	41±1.73	18±0.57
62	24±1.73	26±0.57	R	25±1.00	32±1.52
63	32±1.52	31±1.73	11±0.57	26±1.15	24±1.15
64	26±0.57	27±1.15	R	22±2.00	26±2.00
67	40±1.52	32±1.52	16±1.15	30±1.52	31±1.52
68	21±0.57	32±1.00	20±1.00	28±1.00	32±2.64

Çizelge 4.4'ün devamı

İzolatlar	Penicillin	Eritromisin	Amikasin	Rifampisin	Trimethoprim
69	17±1.15	18±2.51	R	17±1.15	25±1.00
70	22±2.64	23±2.64	R	21±1.73	26±0.57
73	24±2.30	29±100	R	21±1.00	28±0.57
74	22±2.00	27±0.57	R	24±1.52	28±1.52
76	23±1.54	29±1.00	R	26±1.52	23±2.00
77	23±2.51	25±1.15	R	22±1.00	25±2.08
78	18±0.57	19±0.57	R	19±0.57	19±0.57

(*): İnhibisyon zonu, mm; (R): Dirençli

L. plantarum 45 nolu suş bütün antibiyotiklere karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu suş toplam izolatların %1.5'ine karşılık geldiği belirlenmiş olup, iki adet plazmit içerdiği belirlenmiştir.

Penisillin'e karşı en duyarlı olan 53 nolu izolat (*L. plantarum* N30-1) 42 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiş olup, en az duyarlılığı ise 2 izolat (6. ve 10. izolatlar) 15 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. Penisillin'e karşı oluşan inhibisyon zon çapları 15 mm ile 42 mm arasında değişim göstermektedir. Penisillin'e karşı en az duyarlı olan 6. ve 10. izolatın iki plazmit içerdiği belirlenmiş olup, en çok duyarlı olan 53 nolu izolatın bir plazmit içerdiği tespit edilmiştir.

Eritromisin *L. plantarum* suşlarının gelişimini engellemiştir (18-40 mm inhibisyon zonu). Bu izolatlardan sadece bir tanesi (60 nolu izolat) en duyarlı olup 40 mm çapında zon oluşturduğu ve 69. izolatın (*L. plantarum* FQ011) en az duyarlı olup 18 mm çapında zon oluşturduğu belirlenmiştir. En az dirençli olan 60 nolu izolatta hiç plazmit yok iken, en çok dirençli olan 69 nolu suшта ise bir adet plazmitin varlığı belirlenmiştir.

Amikasin antibiyotiğine karşı izolatların % 68'i dirençli iken %32'sinin duyarlı olduğu belirlenmiştir. Amikasin'e karşı oluşan zon çapları 10 mm ve 20 mm arasında değişmektedir. Bu izolatlardan en duyarlı olan 68. izolatın (*L. plantarum* 20.1) 20 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu ve 3 izolatında (17, 25 ve 32 nolu izolatlar) 10 mm çapında inhibisyon zonu oluşturarak en az duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Rifampisin doğal turşulardan izole edilen *L. plantarum* suşlarının gelişmesini inhibe etmiştir (15-41 mm inhibisyon zonu). Bu izolatlardan 15 mm inhibisyon zonu oluşturan 35 nolu (*L. plantarum* RU24-1) izolatu en az duyarlılığı göstermekte olup, en fazla duyarlılığı ise 41 mm çapında inhibisyon zonu oluşturan 60 nolu (*L. plantarum* PON100351) izolatın olduğu tespit edilmiştir. En az duyarlı olan 35 nolu suшта bir adet

plazmit var iken, en çok duyarlı olan 60 nolu suşta ise hiç plazmit varlığına rastlanılmamıştır.

Trimethoprim'e karşı en az duyarlı olan 60 nolu (*L. plantarum* PON100351) izolat 18 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu, en fazla duyarlı olan 29 nolu (*L. plantarum* 3m-1) izolat ise 50 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Trimethoprim'e karşı oluşan inhibisyon zon çapları 18 mm ile 50 mm arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. En az duyarlı olan 60. izolatla, en fazla duyarlılık gösteren 29. izolatın hiç plazmit içermediği tespit edilmiştir. *L. plantarum* 60 nolu izolat eritromisin ve rifampisin'e karşı en duyarlı iken, trimethoprim'e karşı ise en az duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Lactobacillus, *Lactococcus* ve *Bifidobacterium* türlerini kapsayan LAB'nin antibiyotik dirençlilik bilgileri, bu cinsin ve türlerin sayısının çok fazla olmasından dolayı sınırlıdır. Son yapılan çalışmalarda *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerini kapsayan 45 LAB suşunun; eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin ve β - laktam'a %7 oranında, buna karşılık gentamisin, streptomisin ve siplofloksine karşı ise %70'den fazla direnç gösterdiğini bildirilmişlerdir (Grattepanche ve ark., 2008).

İzolatların antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları dirençlilik, orta derece dirençlilik ve duyarlılık aralıkları NCCLS (2004)'ye göre belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Standart antibiyotiklerin karşılaştırma değerleri (NCCLS, 2004)

ANTİBİYOTİK	Disk İçeriği	Zon Çapı, mm		
		Dirençli	Orta derecede duyarlı	Duyarlı
Penicillin	10 µg	≤28	-	≥29
Eritromisin	15 µg	≤13	14-22	≥23
Amikasin	30 µg	≤14	15-16	≥17
Rifampisin	5.0 µg	≤16	17-19	≥20
Trimethoprim	25 µg	≤10	11-15	≥16

Kullanılan antibiyotiklere karşı *L. plantarum* izolatlarının göstermiş olduğu 3 (dirençlilik, orta derece dirençlilik ve duyarlılığı) parametrenin yüzde (%) hesaplamaları Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Doğal turşulardan izole edilen *L. plantarum* suşlarının direnç-duyarlılık durumlarının standart antibiyotiklerle karşılaştırması (%) n=40

Antibiyotikler	Duyarlı (%)	Orta derecede duyarlı (%)	Dirençli (%)
Penicillin	22	0.0	78
Eritromisin	79	19	2.0
Amikasin	3.0	5.0	92
Rifampisin	65	27	8.0
Trimethoprim	98	0.0	2.0

Çizelgede görüldüğü gibi *L. plantarum* suşları en yüksek duyarlılığı trimethoprim karşı (%98) gösterirken, en düşük duyarlılık ise amikasin'e (% 3) karşı gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlar en yüksek orta dereceli duyarlılığı rifampisin'e (% 27) karşı göstermiş olup, penicillin ve trimethoprim'e karşı ise orta dereceli duyarlılık gösterdikleri belirlenmiştir. Suşlar en yüksek direnci amikasin antibiyotiğine karşı (%92) gösterirken, en düşük direnci ise eritromisin ve trimethoprim'e (% 2) karşı gösterdiği tespit edilmiştir.

Ammor ve ark. (2007), *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Bifidobacterium*'un antibiyotik direnç profilleri oldukça farklı olduğunu belirtmişlerdir. Bazı LAB'leri basitrasin, sefoksitin, siprofloksasin, fusidik asit, kanamisin, gentamisin, metronidazol, nitrofurantoin, norfloksasin, streptomisin ve vankomisin karşı yüksek doğal dirençlilik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, LAB genellikle peniciline (piperacilin ve ampicilin) ve β -laktamaz inhibitörlerine karşı duyarlı olduğu, fakat oxacillin ve sefalosporinlere karşı çok dirençli olduğunu belirtmişlerdir (Daniels ve ark., 2003).

İspanyol çiftlik peynirlerinden izole edilen 80 *Lactobacillus* suşlarını (36 *L. plantarum* ve 44 *L. paracasei*) bir dizi fonksiyonel ve güvenlik özelliklerini incelenmişlerdir. Bu izolatlardan sadece dokuz *L. plantarum* suşunun 14 antibiyotiğe karşı duyarlılıklarını analiz etmişlerdir (Lavilla-Lerma ve ark., 2013).

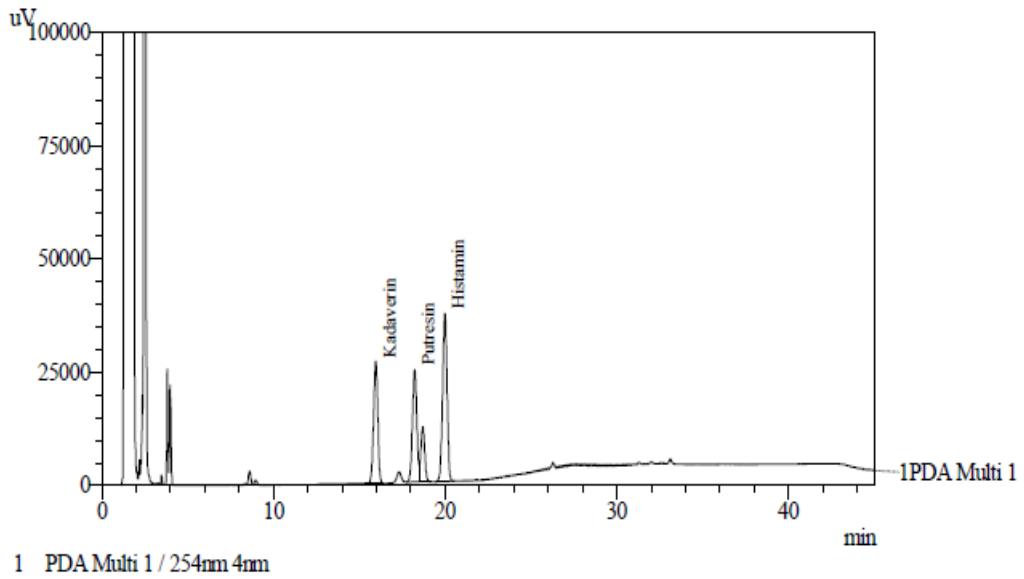
Direnç özelliklerinin sadece plazmit taşıyan izolatlarda olmadığı kromozom üzerindeki mutasyonlar ile oluşmuş özellikler olabilmektedir. Dolayısı ile starter kültür seçiminde yalnızca plazmit özelliğinin ele alınması yetersiz olacağı antibiyotik direnç özelliklerinin moleküler olarak (PCR veya Real-Time PCR) teyit edilmelidir.

4.3. İzolatlarının Biyojen Amin İçerikleri

Biyojen aminler, amino asitlerin dekarboksilasyonu ya da aldehit ve ketonların aminasyon ve trans-aminasyonu ile oluşan azotlu bileşiklerdir. Bu aminler, kimyasal olarak

alifatik (putresin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatik (tiramin, 2-feniletilamin) veya heterosiklik (histamin ve triptamin) yapıda olabilirler. Biyojen aminler gıdalarda mikrobiyal enzimler tarafından spesifik serbest amino asitlerin dekarboksilasyonu sonucunda oluşmaktadır. Biyojen aminlerin vücutta önemli biyolojik fonksiyonları vardır. Protein, hormon ve nükleik asit sentezinin ilk basamağını meydana getirmektedir. Putresin, spermin ve spermidin gibi poliaminler canlı hücrelerin vazgeçilmez bileşenleridir (Edwards ve Sandine,1981; Maijala, 1993).

Çalışmanın bu bölümünde toplam 63 izolatın putresin, kadaverin ve histamin biyojen aminlerinin düzeyleri HPLC cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Besiyerlerine üç farklı (histidin, lizin ve ornitin) amino asit eklenerek bu izolatların farklı amino asit substratlarına göre biyojen amin üretme potansiyelleri belirlenmiştir. Oluşturulan standart kromatogram Şekil 4.16.'de gösterilmiştir. *L. plantarum* izolatlarına ait kromatogram sonuçlarının bazıları ek şekil 3-4'te verilmiştir.



Şekil 4.19. HPLC’de kullanılan biyojen amin standart kromatogramı (Standart 10 mg/ml).

L. plantarum izolatlarının lizin, histidin ve ornitin aminoasitleri eklenmiş MRS besi ortamında geliştirilmesinden sonra ürettikleri biyojen amin oranları Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Aminoasitlerden lizin, histidin, ve ornitin eklenmiş MRS besi ortamında gelişen *L. plantarum* izolatları tarafından üretilen biyojen aminler

İzolatlar	Biyojen aminler mg/l			Toplam biyojen amin miktarı
	Kadaverin	Putresin	Histamin	
1	32 ± 0.30	71 ± 0.30	57 ± 0.80	160
2	152 ± 2.10	78 ± 0.30	138 ± 0.37	368
3	56 ± 1.52	64 ± 0.20	87 ± 0.75	205
4	108 ± 0.90	148 ± 1.38	668 ± 7.73	1129
5	147 ± 1.32	0 ± 0.00	214 ± 1.84	361
6	47 ± 0.86	236 ± 1.71	50 ± 0.52	333
7	208 ± 2.38	22 ± 0.92	97 ± 0.85	327
8	23 ± 1.00	73 ± 0.95	68 ± 0.23	164
9	56 ± 0.36	415 ± 1.72	0 ± 0.00	471
10	244 ± 6.33	422 ± 1.19	43 ± 0.83	709
12	95 ± 0.45	59 ± 0.71	55 ± 0.85	209
13	168 ± 0.81	822 ± 1.30	145 ± 1.30	1135
14	260 ± 0.57	143 ± 0.65	126 ± 0.30	529
15	38 ± 0.41	55 ± 0.70	70 ± 0.21	163
16	81 ± 0.28	90 ± 0.26	25 ± 0.76	196
17	247 ± 0.80	923 ± 3.50	73 ± 0.25	1243
18	208 ± 1.64	433 ± 3.76	143 ± 1.35	784
19	213 ± 2.42	261 ± 1.92	54 ± 0.23	528
20	126 ± 1.38	182 ± 0.98	50 ± 0.76	358
21	248 ± 0.49	177 ± 0.67	36 ± 0.73	461
22	287 ± 0.78	994 ± 4.74	51 ± 0.66	1332
23	181 ± 0.63	450 ± 1.60	72 ± 1.08	703
24	137 ± 0.43	68 ± 0.45	63 ± 0.90	268
25	298 ± 1.61	123 ± 1.30	119 ± 0.70	540
26	189 ± 0.47	68 ± 1.80	57 ± 0.25	314
29	223 ± 1.15	67 ± 0.41	111 ± 1.25	401
31	63 ± 0.20	70 ± 0.45	14 ± 0.45	147
32	128 ± 0.36	51 ± 0.73	85 ± 0.95	264
33	68 ± 0.81	99 ± 1.61	76 ± 0.18	243
35	252 ± 2.41	231 ± 1.60	64 ± 0.25	547
36	65 ± 0.49	831 ± 2.33	65 ± 0.22	961
38	116 ± 1.96	226 ± 3.09	86 ± 0.55	428
39	65 ± 0.20	77 ± 0.25	73 ± 1.16	215
40	143 ± 0.30	0 ± 0.00	76 ± 0.29	219
41	154 ± 2.02	116 ± 0.86	47 ± 0.15	317
42	125 ± 0.65	31 ± 0.80	42 ± 0.14	198
43	210 ± 3.12	72 ± 1.96	65 ± 0.60	347
44	202 ± 1.45	414 ± 4.70	55 ± 0.16	671
45	63 ± 1.01	778 ± 5.26	75 ± 0.96	916
46	61 ± 1.47	64 ± 0.22	63 ± 0.41	188
47	201 ± 3.67	111 ± 1.09	35 ± 0.90	347
48	68 ± 0.97	52 ± 0.51	90 ± 1.23	210

Çizelge 4.7'in devamı

İzolatlar	Biyojen aminler mg/l			Toplam biyojen amin miktarı
	Kadaverin	Putresin	Histamin	
49	81 ± 1.11	31 ± 0.90	57 ± 0.40	168
50	94 ± 0.68	47 ± 0.20	84 ± 0.72	225
51	33 ± 0.50	24 ± 0.55	58 ± 0.36	115
52	139 ± 0.68	88 ± 1.02	51 ± 0.26	278
53	186 ± 0.65	746 ± 4.88	95 ± 0.75	1027
54	142 ± 1.11	95 ± 0.73	84 ± 0.72	321
55	79 ± 0.55	67 ± 0.20	161 ± 1.75	307
56	64 ± 0.40	20 ± 0.35	33 ± 0.20	117
60	190 ± 0.98	65 ± 0.22	63 ± 0.73	318
62	85 ± 0.25	0 ± 0.00	63 ± 0.91	148
63	94 ± 0.49	61 ± 0.85	118 ± 1.13	273
64	88 ± 0.30	88 ± 1.41	75 ± 1.40	251
67	127 ± 0.47	96 ± 0.20	92 ± 0.52	315
68	164 ± 0.42	95 ± 0.87	56 ± 0.55	315
69	87 ± 0.31	63 ± 0.64	62 ± 0.60	212
70	84 ± 0.33	62 ± 0.27	64 ± 0.53	210
73	81 ± 0.23	131 ± 0.98	30 ± 0.45	242
74	134 ± 0.15	82 ± 0.51	66 ± 0.97	282
76	165 ± 0.60	121 ± 1.00	74 ± 0.69	360
77	165 ± 0.45	390 ± 2.56	60 ± 0.26	615
78	118 ± 1.65	48 ± 0.56	31 ± 0.51	197

Lizin eklenmiş besi ortamında geliştirilen *L. plantarum* izolatlarında en düşük kadaverin üretimi 32 mg/l oranında 1 nolu (*L. plantarum* ZG3-19) izolat, en yüksek kadaverin üretimi ise lizin eklenmiş besi ortamında geliştirilen 25 nolu (*L. plantarum* T30-PCM02) izolatın 298 mg/l oranında sentezlediği tespit edilmiştir. Lizin eklenmiş besi ortamındaki *L. plantarum* izolatlarında kadaverin üretim oranları 32-298 mg/l arasında değişim göstermektedir. En az kadaverin sentezleyen 1 nolu izolatta bir adet plazmit var iken, en çok kadaverin sentezleyen 25 nolu izolatta ise plazmit varlığına rastlanılmamıştır.

Lizin eklenmiş besi ortamında geliştirilen *L. plantarum* 36 ve 39 nolu izolatlar 65 mg/l, *L. plantarum* 33 ve 48 nolu izolatlar 68 mg/l, *L. plantarum* 76 ve 77 nolu izolatlar 165 mg/l, *L. plantarum* 3 ve 9 nolu izolatlar 56 mg/l, *L. plantarum* 16, 49 ve 73 nolu izolatlar 81 mg/l, *L. plantarum* 7 ve 18 nolu izolatlar 208 mg/l, *L. plantarum* 31 ve 45 nolu izolatlar 63 mg/l ve *L. plantarum* 50 ve 63 nolu izolatlar 94 mg/l oranında kadaverin sentezdikleri tespit edilmiştir. Aynı oranlarda kadaverin sentezleyen 3 ve 9 nolu izolatlarda

bir adet plazmit var iken, 36 ve 39 nolu izolatlar ile 16, 49 ve 73 nolu izolatlarda ise plazmit varlığı gözlemlenmemiştir.

Kalać ve ark. (1999) susuz lahana turşusunda ortalama kadaverin konsantrasyonlarını Çek üreticilerinin ürettiği pastörize edilmemiş örneklerde 64.8 mg/kg, Avusturyalı üreticilerinin ürettiği pastörize edilmemiş örneklerde 43.4 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Kalac ve ark. (2000) fermentasyon sonrası 5-6 °C’ de depoladıkları sauerkraut örneklerini 6. ay sonunda analiz ettiklerinde kadaverin miktarlarının kontrol örneklerinde 59.4-122 mg/kg, *L. plantarum* suşu ilave edilen örneklerde ise 4.7-11.8 mg/kg arasında değişiklik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yücel ve ark. (2001) ticari olarak satışa sunulan lahana turşularında kadaverin miktarlarının 0-12.1 mg/kg arasında değişiklik gösterdiğini belirlemişlerdir. Garcia-Garcia ve ark. (2001) piyasadan topladıkları hıyar turşusu örneklerinde yaptıkları analizler sonucunda kadaverin varlığına rastlamamışlardır. Kirschbaum ve ark. (2000) Alman üreticilerden aldıkları 5 kavanoz pastörize lahana turşusu örneğinin salamuralarındaki kadaverin miktarlarının 0-59.4 mg/l arasında değişiklik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Ornitin eklenmiş besi ortamında geliştirilen *L. plantarum* 5, 40 ve 62 nolu izolatlarda putresin üretimi tespit edilmemiştir. En düşük putresin üretimi 20 mg/l olarak ornitin eklenmiş besi ortamındaki 56 nolu (*L. plantarum* JJ 29)izolatla, en yüksek putresin üretimi ise ornitin eklenmiş besi ortamında geliştirilen 22 nolu (*L. plantarum* L1212) izolatın 994 mg/l oranında sentezlediği belirlenmiştir. Ornitin eklenmiş besi ortamındaki *L. plantarum* izolatlarında putresin üretim oranları 20-994 mg/l oranları arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. En az ve en çok putresin sentezleyen izolatlar ve hiç sentezlemeyen izolatlarda bir adet plazmit varlığı gözlemlenmiştir.

Ornitin eklenmiş besi ortamında geliştirilen *L. plantarum* 29 ve 55 nolu izolatlar 67 mg/l, *L. plantarum* 42 ve 49 nolu izolatlar 31 mg/l, *L. plantarum* 3 ve 46 nolu izolatlar 64 mg/l, *L. plantarum* 52 ve 64 nolu izolatlar 88 mg/l, ve *L. plantarum* 54 ve 68 nolu izolatlar 95 mg/l putresin ürettikleri belirlenmiştir. Eşit miktarlarda putresin sentezleyen 3 ve 46 nolu izolatlar ile 54 ve 68 nolu izolatlarda bir adet plazmit var iken, 52 ve 64 nolu izolatlarda ise 2 adet plazmit varlığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *L. plantarum* izolatları ornitin eklenmiş besi ortamında ürettikleri putresin miktarları toksik limitler bakımından 396 mg/kg putresin (Stratton ve ark., 1991) olarak açıklanan biyojen amin indeks (BAI) düzeyine göre *L. plantarum* 9, 10, 13, 17, 18,

22, 23, 36, 44 ve 53 nolu izolatların sentezlediği putresin miktarları belirlenmiş limitin üzerinde olduğu için bu izolatların starter kültür olarak kullanımı uygun olmadığı düşünülmektedir. Bu izolatların dışında kalan 53 adet *L. plantarum* izolatının ürettiği putresin miktarı belirlenen limitin altında olduğu için starter kültür olarak kullanımının uygun olabileceği düşünülmektedir.

Kalać ve ark. (1999) sauerkrautlardaki ortalama putresin konsantrasyonlarını Çek üreticilerinin ürettiği pastörize edilmemiş örneklerde 181 mg/kg, Avusturyalı üreticilerinin ürettiği pastörize edilmemiş örneklerde 179 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Kalac ve ark. (2000) fermentasyon sonrası 5-6 °C’da depoladıkları sauerkraut örneklerini 6. ay sonunda analiz ettiklerinde, putresin miktarlarının kontrol örneklerinde 265-446 mg/kg, *L. plantarum* inoküle edilen örneklerde 4.0-12.5 mg/kg arasında değişiklik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yücel ve ark. (2001) ticari olarak satışa sunulan lahana turşularında putresin miktarlarının 6.84-21.5 mg/kg arasında değişiklik gösterdiğini belirlemişlerdir. Garcia-Garcia ve ark. (2001) piyasadan topladıkları hıyar turşusu örneklerindeki ortalama putresin miktarını 4.5 mg/kg olarak bulmuşlardır. Kirschbaum ve ark. (2000) Alman üreticilerden aldıkları 5 kavanoz pastörize lahana turşusu örneğinin salamuralarındaki putresin miktarlarının 83.5-366 mg/l arasında değişiklik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Histidin eklenmiş besi ortamında geliştirilen 9 nolu (*L. plantarum* qz138x) izolatın histamin üretimi tespit edilmemiştir. En düşük histamin üretimi 14 mg/l olarak histidin eklenmiş besi ortamındaki 31 nolu (*L. plantarum* RU24-1) izolatında, en yüksek histamin üretimi ise histidin eklenmiş besi ortamında geliştirilen 4 nolu (*L. plantarum* N30-1) izolatta 668 mg/l oranında sentezledikleri belirlenmiştir. Histidin eklenmiş besi ortamındaki *L. plantarum* izolatlarında histamin üretim oranları 14-668 mg/l arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. En çok histamin sentezleyen 4 nolu izolatta hiç plazmit yok iken, en az histamin sentezleyen 31 nolu izolatta ise 3 adet plazmit’in olduğu belirlenmiştir.

Histidin eklenmiş besi ortamında geliştirilen *L. plantarum* 1, 26 ve 49 nolu izolatlar 57 mg/l, *L. plantarum* 6 ve 20 nolu izolatlar 50 mg/l, *L. plantarum* 12 ve 44 nolu izolatlar 55 mg/l, *L. plantarum* 17 ve 39 nolu izolatlar 73 mg/l, *L. plantarum* 22 ve 52 nolu izolatlar 51 mg/l, *L. plantarum* 24, 46, 60 ve 62 nolu izolatlar 63 mg/l, *L. plantarum* 33 ve 40 nolu izolatlar 76 mg/l, *L. plantarum* 35 ve 70 nolu izolatlar 64 mg/l, *L. plantarum* 36 ve 43 nolu

izolatlar 65 mg/l, *L. plantarum* 45 ve 64 nolu izolatlar 75 mg/l ve *L. plantarum* 50 ve 54 nolu izolatlar 84 mg/l histamin ürettikleri gözlemlenmiştir. Aynı oranlarda histamin sentezleyen 6 ve 20 nolu izolatlar ile 45 ve 64 nolu izolatlarda 2 adet plazmit var iken, 35 ve 70 nolu izolatlarda ise bir adet plazmit varlığı tespit edilmiştir.

Kalać ve ark. (1999) sauerkrautlardaki ortalama histamin konsantrasyonunu Çek üreticilerinin ürettiği pastörize edilmemiş örneklerde 12.1 mg/kg, Avusturyalı üreticilerinin ürettiği pastörize edilmemiş örneklerde 2.1 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Kalac ve ark. (2000) fermentasyon sonunda 5-6 °C’ da depoladıkları sauerkraut örneklerini 6. ay sonunda analiz ettiklerinde, histamin miktarlarının kontrol örneklerinde 1.0-4.8 mg/kg, *L. plantarum* ile inoküle edilen örneklerde 1.1-2.0 mg/kg arasında değişiklik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yücel ve ark. (2001) ticari olarak satışa sunulan lahana turşularında histamin miktarlarının 0-10.9 mg/kg arasında değişiklik gösterdiğini belirlemişlerdir. Garcia-Garcia ve ark. (2001) piyasadan topladıkları hıyar turşusu örneklerinin hiçbirinde histamin belirleyemediklerini ifade etmişlerdir. Ekici ve Coşkun (2004) Van ilindeki marketlerden toplanan 50 adet sebze turşusu örneğinde (28 adet karışık, 6 adet kırmızı biber ve 7 adet hıyar turşusu) histamin içeriğini fluorometrik yöntemle araştırmışlardır. Histamin seviyelerini, hıyar turşusu örneklerinde 26.66-44.72 mg/kg (ortalama 34.73 mg/kg), karışık turşularda ise 16.54- 57.89 mg/kg olarak belirlemişlerdir.

Çalışmamızda *L. plantarum* izolatları histidin eklenmiş besi ortamında ürettikleri histamin miktarları toksik limitler bakımından 50-160 mg/kg histamin (Stratton ve ark., 1992) olarak açıklanan BAI düzeyine göre *L. plantarum* 4, 5 ve 55 nolu izolatların sentezledikleri histamin miktarı verilen limitin üzerinde olduğu için bu izolatların starter kültür olarak kullanımı uygun olmadığı belirlenmiştir. Bu izolatları dışında kalan 60 adet *L. plantarum* izolatu ise ürettiği histamin miktarı belirlenen limitin altında olduğu için starter kültür olarak kullanımının uygun olabileceği düşünülmektedir.

L. plantarum qz1193 (5 nolu) izolatu ornitin eklenmiş besi ortamlarında putresin üretimi tespit edilmemişken, lizin ve histidin eklenmiş besi ortamında ise 147 mg/l oranında kadaverin ve 214 mg/l oranında histamin ürettiği belirlenmiştir. 9 nolu (*L. plantarum* qz138x) izolat histidin eklenmiş besi ortamında histamin üretimi tespit edilmemişken, lizin ve ornitin eklenmiş besi ortamında ise 56 mg/l oranında kadaverin ve 415 mg/l oranında putresin ürettiği gözlemlenmiştir.

L. plantarum CAI6 (40 nolu) izolatu ornitin eklenmiş besi ortamlarında putresin üretimi tespit edilmemişken, lizin ve histidin eklenmiş besi ortamında ise 143 mg/l oranında kadaverin ve 76 mg/l oranında histamin ürettiği belirlenmiştir. 62 nolu (*L. plantarum* qz138x) izolat ornitin eklenmiş besi ortamlarında putresin üretimi tespit edilmemişken, lizin ve histidin eklenmiş besi ortamında ise 85 mg/l oranında kadaverin ve 63 mg/l oranında histamin ürettiği tespit edilmiştir.

Kadaverin miktarı için belirlenen toksik bir limit olmamakla birlikte, Silla-Santos (1996) fermente ürünlerde toplam biyogen amin için 1000 mg/kg değerini toksikolojik açıdan sınır değeri olarak belirtmiştir. Yaptığımız çalışmadaki değerler toksikolojik açıdan sınır değerleri dikkate alındığında lizin, histidin ve ornitin eklenmiş besi ortamlarında geliştirilen *L. plantarum* 4, 13, 17, 22 ve 53 nolu izolatların kadaverin, putresin ve histamin biyogen aminlerinin toplam 1000 mg/kg değerinin üzerinde olduğu için bu 5 izolatın toksikolojik açıdan önerilmemektedir. Diğer *L. plantarum* izolatlarının ise ürettikleri kadaverin, putresin ve histamin biyogen aminlerinin toplam 1000 mg/kg değerinin altında olduğu için toksikolojik açıdan starter kültür olarak kullanılması bakımından faydalı olacağı düşünülmektedir.

Gıdalarda maksimum izin verilebilir biyogen amin miktarını net olarak söylemek mümkün değildir, çünkü bunlar diğer aminlerin varlığına ve bireysel tepkilerine bağlıdır (Halász ve ark., 1994). Fermente ürünlerde bulunan bazı biyogen aminlerin toksik miktarları; histamin 50-160 mg/kg, tiramin 100–800 mg/kg, β -fenetilamin 30 mg/kg, putresin 396 mg/kg olarak tespit edilmiştir (Stratton ve ark., 1992).

Turşu gibi fermente ürünlerde sıklıkla rastlanan bazı biyogen aminler için toksik limitler belirlenmiş olup, bu değerler 50-100 mg/kg histamin, 100-800 mg/kg tiramin, 30 mg/kg 2-feniletilamin ve 100-200 mg/kg toplam biyogen amin olarak verilmiştir (Nout, 1994).

Fermente sosisler iki farklı başlatıcı kültür (starter olmayan ve *L. plantarum* + *L. sake*) kullanılarak paralel üretim yapılmıştır. Olgunlaşmanın sonunda, A sosisinde kadaverin (98.7 mg/kg kuru madde), putresine (242.6 mg/kg kuru madde) ve tiramin (46.4 mg/kg kuru madde) oranlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En fazla kadaverin, putresin ve tiramin konsantrasyonlarında artış olduğu tespit edilmiştir (Kongkiattikajorn, 2013)

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 (Bruna ve ark., 2003). Bu gruptan laktik asit bakterilerinin çoğu biyojen amin üretebilmektedir (Arena ve ark., 2007; Arena ve Manca de Nadra, 2001). 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).

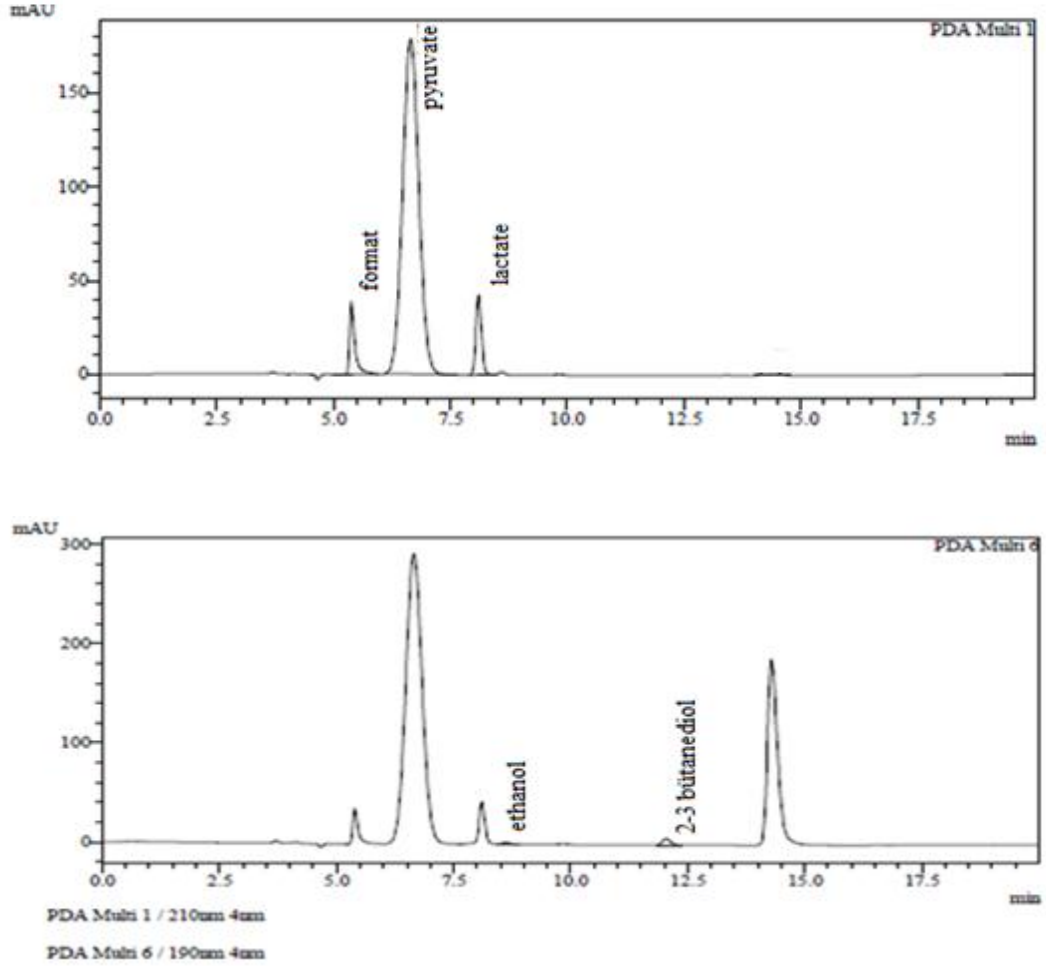
Biyojen amin üretimi türden ziyade suşa bağımlıdır. Aynı türün farklı suşları farklı biyojen amin üretebilmektedir. Bir çok tür bir veya daha fazla amino asiti aynı anda dekarboksile edebilmektedir (De las Rivas ve ark., 2005).

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 ve Coton, 2005) bakteriyel suşlarında tespit edilmesi, çalışmamızda kullanılan suşların biyojen amin üretme özellikte olması literatürlerle paralellik göstermektedir.

4.4. İzolatların Aromatik Madde İçeriklerinin Belirlenmesi

Proteolitik aktiviteye bağlı olarak aroma ile ilişkisi olan peptidler ve amino asitler oluşurken, lipolitik aktiviteye bağlı olarak da serbest yağ asitleriyle, aldehytler, ketonlar ve esterler gibi aroma bileşenleri oluşmaktadır (Johansson ve ark., 1994). Laktik asit bakterilerinin, fermente gıda üretiminde oluşturduğu fermentasyon metabolizmasının sonucu homo ya da hetero karakteri ürünlerin aromasını etkilemesi bakımından önemlidir. Bilindiği gibi, ürünlerin raf ömrü ve aromatik profili; uçucu ve uçucu olmayan asitler, karbonil bileşikler, seçilecek fermentasyon tipi, kullanılacak metabolik yol ve bu aşamalarındaki bazı yönlendirmelerle etkilenmekte ve belirlenmektedir. Dolayısıyla ürün cinsine bağlı olmak üzere belirlenen ve hedeflenen metabolitlerle, ürünlerin raf ömrünü ve kalitesini artırmaya yönelik reaksiyonların, gıda güvenliği ve kalitesi ilkelerinden ödün vermeden gerçekleşmesini sağlamak, gıda endüstrisi için çok önemli ve işlevselliği yüksek bir çalışmayı beraberinde getirmektedir.

Moleküler yöntemle tanımlanan *L. plantarum* izolatlarının aromatik madde üretim değişiklikler, HPLC kromatografi sistemi ile tespit edilmiştir. Oluşturulan standart kromatogramlar şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. HPLC’de kullanılan aromatik standart kromatogramları (Standart 10 mg/ml)

Çalışmada HPLC analizi, MRS besi ortamında geliştirilen *L. plantarum* izolatlarının sentezlediği format, pirüvat, laktat, etanol ve 2,3-bütanediol oranları arasında karşılaştırma yapılmıştır (Çizelge 4.8, 4.9).

Çizelge 4.8. Doğal turşulardan izole edilen *L. plantarum* suşlarının aromatik madde (format, pirüvat ve laktat) miktarları

İzolatlar	Aromatik Maddeler mM		
	Format	Pirüvat	Laktat
1	2.996 ± 0.11	0.466 ± 0.49	37.128 ± 2.09
2	5.496 ± 0.66	0.414 ± 0.48	30.496 ± 3.10
3	7.021 ± 0.36	0.278 ± 0.17	30.007 ± 2.26
4	5.201 ± 0.51	0.299 ± 0.16	34.439 ± 2.91
5	56.582 ± 5.60	0.470 ± 0.54	34.568 ± 1.35
6	57.199 ± 2.54	0.123 ± 0.06	29.910 ± 2.89
7	51.856 ± 1.48	0.223 ± 0.17	28.453 ± 1.50
8	54.690 ± 5.28	0.184 ± 0.13	7.113 ± 0.30
9	56.882 ± 4.41	0.199 ± 0.12	27.841 ± 1.42
10	53.702 ± 1.63	0.281 ± 0.14	14.047 ± 1.27
12	55.422 ± 4.58	0.185 ± 0.13	34.648 ± 4.36
13	59.766 ± 6.23	0.161 ± 0.09	30.718 ± 5.76
14	57.713 ± 5.03	0.148 ± 0.10	31.731 ± 3.91
15	53.410 ± 3.71	0.153 ± 0.09	32.356 ± 2.24
16	64.902 ± 1.38	0.136 ± 0.10	31.454 ± 2.60
17	60.958 ± 7.17	0.140 ± 0.10	34.208 ± 4.22
18	5.549 ± 9.92	0.197 ± 0.37	37.176 ± 0.80
19	49.205 ± 6.23	0.144 ± 0.10	32.911 ± 8.71
20	29.437 ± 1.32	0.123 ± 0.09	26.692 ± 2.23
21	47.018 ± 3.72	0.131 ± 0.06	25.986 ± 1.67
22	61.427 ± 5.67	0.163 ± 0.09	38.371 ± 2.13
23	56.899 ± 3.76	0.100 ± 0.05	34.779 ± 2.12
24	5.201 ± 0.10	0.146 ± 0.03	35.800 ± 1.32
25	45.420 ± 3.78	0.117 ± 0.06	36.533 ± 1.79
26	43.577 ± 4.56	0.123 ± 0.06	35.522 ± 1.90
29	5.631 ± 0.50	0.151 ± 0.03	36.480 ± 0.73
31	54.444 ± 6.41	0.153 ± 0.02	35.743 ± 2.06
32	59.078 ± 7.87	0.193 ± 0.04	37.578 ± 4.37
33	53.410 ± 1.42	0.379 ± 0.42	38.631 ± 2.28
35	54.787 ± 3.01	0.554 ± 0.26	39.576 ± 1.98
36	48.118 ± 8.88	0.370 ± 0.16	36.745 ± 4.88
38	52.447 ± 1.45	0.491 ± 0.37	36.414 ± 2.20
39	58.921 ± 6.46	0.599 ± 0.41	33.848 ± 2.88
40	55.327 ± 8.62	0.491 ± 0.35	39.249 ± 3.21
41	58.031 ± 3.72	0.822 ± 0.43	29.229 ± 0.32
42	30.972 ± 4.72	0.470 ± 0.30	36.772 ± 5.41
43	8.065 ± 0.18	0.500 ± 0.29	36.705 ± 2.11
44	9.506 ± 0.23	0.846 ± 0.24	31.547 ± 5.17
45	19.833 ± 0.38	0.325 ± 0.16	36.121 ± 2.35
46	10.736 ± 0.32	0.176 ± 0.02	31.949 ± 4.99
47	7.289 ± 0.44	0.176 ± 0.04	35.473 ± 4.60

Çizelge 4.8'in devamı

İzolatlar	Aromatik Maddeler mM		
	Format	Pirüvat	Laktat
48	9.631 ± 0.34	0.515 ± 0.20	42.163 ± 3.99
49	9.063 ± 0.21	0.980 ± 0.85	35.876 ± 4.43
50	9.610 ± 0.34	0.810 ± 0.53	38.872 ± 4.69
51	12.114 ± 0.51	0.897 ± 0.81	32.893 ± 3.44
52	9.383 ± 0.26	0.810 ± 0.59	30.743 ± 1.46
53	53.951 ± 1.16	0.229 ± 0.04	45.995 ± 1.73
54	58.921 ± 3.12	0.310 ± 0.15	40.430 ± 7.59
55	61.061 ± 2.15	0.554 ± 0.34	28.667 ± 1.32
56	59.434 ± 4.70	0.546 ± 0.32	10.359 ± 3.93
60	8.622 ± 0.37	0.650 ± 0.41	10.857 ± 0.10
62	14.736 ± 0.28	0.481 ± 0.28	15.525 ± 0.20
63	10.469 ± 0.25	0.655 ± 0.38	14.033 ± 0.15
64	19.247 ± 0.29	0.478 ± 0.38	14.479 ± 1.13
67	18.560 ± 0.67	0.540 ± 0.34	47.878 ± 5.90
68	9.549 ± 0.19	0.386 ± 0.38	24.318 ± 2.73
69	9.074 ± 0.90	0.491 ± 0.26	18.599 ± 4.87
70	16.116 ± 0.91	0.405 ± 0.16	18.493 ± 0.44
73	5.766 ± 0.55	0.325 ± 0.13	16.918 ± 0.18
74	16.998 ± 0.39	0.436 ± 0.19	25.328 ± 1.19
76	17.130 ± 0.40	0.567 ± 0.33	18.762 ± 2.25
77	16.049 ± 0.21	0.430 ± 0.22	18.786 ± 2.68
78	17.176 ± 0.39	0.597 ± 0.35	18.724 ± 0.26

MRS besi ortamında geliştirilmiş olan *L. plantarum* izolatlarında en yüksek oranda formatı 16 nolu izolat 64.902 mM oranında sentezlerken, en düşük format sentezi 1 nolu izolat tarafından 2.996 mM oranında sentezlediği gözlemlenmiştir. *L. plantarum* izolatlarından 15 ve 33 nolu izolatlar 53.410 mM, 4 ve 24 nolu izolatlar 5.201 mM oranında format sentezledikleri tespit edilmiştir. En yüksek oranda format sentezleyen 16 nolu izolat hiç plazmid içermezken, en az sentezleyen 1 nolu izolatta ise bir adet plazmit varlığı belirlenmiştir.

L. plantarum izolatlarının pirüvat sentezi en az 23 nolu izolatında 0.100 mM oranında sentezlerken, en fazla pirüvatı 49 nolu izolatın 0.980 mM oranında sentezlediği tespit edilmiştir. İzolatlardan 6, 20 ve 26 nolu izolatlar 0.123 mM, 46 ve 47 nolu izolatlar 0.176 mM, 15 ve 31 nolu izolatlar 0.153 mM, 73 ve 45 nolu izolatlar 0.325 mM, 5 ve 42 nolu izolatlar 0.470 mM, 38, 40 ve 69 nolu izolatlar 0.491 mM, 35 ve 55 nolu izolatlar 0.554 mM, 50 ve 52 nolu izolatlar 0.810 mM oranında pirüvat sentezledikleri gözlemlenmiştir. Pirüvatı en az sentezleyen 23 nolu izolatta bir adet plazmit var iken, en fazla sentezleyen 49 nolu izolatta ise plazmit varlığına rastlanmamıştır. Aynı oranlarda

pirüvat sentezleyen 35 ve 55 nolu izolatların ise bir adet plazmit içerdikleri tespit edilmiştir.

Laktat sentezi en yüksek 67 nolu izolat tarafından 47.878 mM oranında sentezlenirken, en düşük laktat sentezi 8 nolu izolat tarafından 7.113 mM oranında sentezlendiği belirlenmiştir. En yüksek oranda laktat sentezleyen 67 nolu izolat hiç plazmid içermezken, en az sentezleyen 8 nolu izolatta ise 2 adet plazmit'in varlığı gözlemlenmiştir.

L. plantarum VL103 ve *L. plantarum* NCIMB 8826 kültürlerinin süpernatantlarını ve türevlerindeki metabolitlerin varlığı HPLC ile her 24 saatte bir tespit etmişlerdir. Bu izolatlar ve türevlerinde asetoin, laktat, etanol ve format gibi fermantasyon yan ürünlerinin varlığını tespit etmişlerdir (Tsuji ve ark. 2013). *L. plantarum* A6 suşu glikoz varlığında laktik asit tüketimi belirlenirken, glikozun parçalanmasından sonra oksidatif laktat dönüşümünün olmamasının şaşırtıcı olduğunu belirtmişlerdir (Pintado ve ark., 2005).

LAB suşlarından *Leuconostoc mesenteroides* NCU1426, *Lactococcus lactis* NCU1315, *L. plantarum* NCU1121 ve *L. casei* NCU1222 Çin lahana turşusundan izole edilerek başlatıcı kültür olarak kullanılmıştır. *Leuconostoc mesenteroides* ve *Lactococcus lactis* zayıf aside karşı dirençli olup daha hızlı büyüme gösterdiği, *L. plantarum* ve *L. casei* ise fermantasyon boyunca aside karşı iyi bir direnç gösterdiği ve çok fazla laktik asit ürettiklerini tespit etmişlerdir. LAB'ların fermantasyona olan katkılarıyla ve karışım çözeltisiyle elde edilen Çin lahana turşusunda, başlatıcı kültürün fermantasyonu sırasında fermantasyon büyüme özelliklerinde kayda değer farklılıklar gözlemlemişlerdir (Xiong ve ark., 2014).

Çizelge 4.9. Doğal turşulardan izole edilen *L. plantarum* suşlarının aromatik madde (etanol ve 2,3-bütanediol) miktarları

İzolatlar	Aromatik Maddeler mM	
	Etanol	2,3-Bütanediol
1	17.929 ± 1.19	5.767 ± 0.12
2	17.906 ± 1.14	3.575 ± 0.54
3	18.361 ± 0.94	3.056 ± 0.60
4	17.302 ± 1.58	6.219 ± 0.81
5	16.741 ± 1.35	6.298 ± 0.13
6	16.215 ± 1.36	7.389 ± 0.16
7	15.986 ± 1.66	7.007 ± 0.19
8	16.182 ± 1.35	2.222 ± 0.64
9	17.089 ± 1.38	2.136 ± 0.99
10	15.381 ± 1.74	9.970 ± 0.22
12	16.741 ± 1.61	7.304 ± 0.75
13	17.162 ± 0.93	5.509 ± 0.49
14	16.459 ± 0.99	5.580 ± 0.91
15	13.523 ± 1.95	6.101 ± 0.12
16	15.285 ± 1.16	4.291 ± 0.41
17	16.588 ± 1.95	4.934 ± 0.11
18	17.957 ± 1.16	4.168 ± 0.40
19	16.770 ± 1.35	4.243 ± 0.55
20	17.558 ± 1.80	2.809 ± 0.27
21	17.235 ± 1.15	2.179 ± 0.14
22	16.202 ± 1.08	1.974 ± 0.37
23	17.295 ± 1.18	1.173 ± 0.20
24	17.669 ± 1.48	1.922 ± 0.16
25	17.145 ± 1.49	1.838 ± 0.21
26	18.433 ± 1.35	1.922 ± 0.19
29	17.066 ± 1.01	1.501 ± 0.25
31	18.688 ± 1.31	2.199 ± 0.85
32	17.562 ± 1.07	0.900 ± 0.11
33	19.451 ± 1.61	0.879 ± 0.39
35	18.131 ± 1.36	0.374 ± 0.34
36	20.353 ± 1.75	0.288 ± 0.25
38	17.756 ± 1.47	0.519 ± 0.45
39	18.045 ± 1.69	0.296 ± 0.26
40	18.641 ± 0.58	0.258 ± 0.22
41	15.344 ± 1.02	13.148 ± 0.96
42	18.345 ± 0.98	0.454 ± 0.39
43	8.732 ± 0.55	0.158 ± 0.22
44	17.302 ± 1.17	0.111 ± 0.19
45	17.793 ± 1.50	0.349 ± 0.46
46	15.891 ± 1.21	11.789 ± 0.95
47	20.168 ± 1.19	9.384 ± 0.13
48	17.760 ± 1.25	8.469 ± 0.54
49	19.992 ± 1.54	9.400 ± 0.45

Çizelge 4.9'un devamı

İzolatlar	Aromatik Maddeler mM	
	Etanol	2,3-Bütanediol
50	11.176 ± 1.05	8.543 ± 0.61
51	11.926 ± 0.99	8.397 ± 0.72
52	18.427 ± 0.39	8.520 ± 0.39
53	17.381 ± 1.71	7.360 ± 0.90
54	16.048 ± 0.48	7.967 ± 0.57
55	16.248 ± 0.82	7.639 ± 1.61
56	16.517 ± 1.07	7.054 ± 0.15
60	16.367 ± 1.19	8.808 ± 0.18
62	17.192 ± 1.28	5.534 ± 0.13
63	15.092 ± 1.10	6.141 ± 0.14
64	16.316 ± 1.33	6.246 ± 0.72
67	8.120 ± 0.43	12.613 ± 0.75
68	6.048 ± 0.21	6.963 ± 0.46
69	15.917 ± 1.42	5.408 ± 0.19
70	17.258 ± 1.67	5.542 ± 0.46
73	17.931 ± 1.55	5.805 ± 0.10
74	15.726 ± 1.20	6.923 ± 0.92
76	16.610 ± 0.95	4.626 ± 0.12
77	17.162 ± 1.69	6.793 ± 0.18
78	16.367 ± 1.46	6.530 ± 0.43

Etanol LAB'ların asetaldehit'i indirgeyerek elde ettiği bir fermantasyon ürünüdür. Pirüvat, pirüvat dekarboksilaz ile asetaldehit'e dönüştürülürken, asetaldehit'te alkol dehidrojenaz tarafından etanola dönüştürülmektedir. LAB ve farklı organizmaların pirüvat dekarboksilaz aktivitesi değişken seviyelerde olması etanol üretimindeki artışı sınırlamaktadır. Bildirilen en ümit verici sonuçlar, gram pozitif *Sarcina ventriculi*'nin farklı promotorları kullanarak, LDH negatif *L. plantarum* suşlarının pirüvat dekarboksilasyonlarıyla elde edilmiştir. Son zamanlarda, tek fermantasyon ürünü olarak etanol üreten bir laktokokal suşun olduğunu bildirmişlerdir (Solem ve ark., 2013)

L. plantarum izolatları tarafından en fazla etanol sentezi 20.353 mM oranında 36 nolu izolat tarafından üretilmiştir. En düşük etanol üretimi ise 6.048 mM oranında 68 nolu izolat tarafından sentezlendiği belirlenmiştir. *L. plantarum* 60 ve 78 nolu izolatlarda 16.367 mM, *L. plantarum* 5 ve 12 nolu izolatlarda 16.741 mM, *L. plantarum* 13 ve 77 nolu izolatlarda 17.162 mM, 4 ve 44 nolu izolatlar 17.302 mM oranda etanol sentezledikleri gözlemlenmiştir. En fazla ve en az etanol sentezleyen suşların her ikisinde bir adet plazmit varlığı tespit edilmiştir.

LAB'lardan *L. casei* ve *L. plantarum* suşlarına, *Z. mobilis* suşlarındaki PDC ve *adh* genlerin aktarılmasıyla alkol üretiminde küçük artışlar sağlanmıştır. Alkol fermantasyonlarında alkole fazla oranda toleranslı LAB izolatlarının kullanılmasıyla, yüksek oranda etanolün sentezlenmesi sağlanmaktadır (de Vos ve ark.,2004).

L. plantarum (EMP) yolu ile glikozu fermente ederek oluşan pirüvatı laktat dehidrojenaz ile laktat'a dönüştürürler. Fermantasyon sonunda oluşan laktat, asetat ve etanol ürünleri ile glikoz konsantrasyonları HPLC ile ölçülmüştür. Gram pozitif olan *L. plantarum* suşunda etanol üretimini artırmak için doğru bir Gram pozitif PDC genini tanımak için konak konak olarak kullanılmıştır. pTRKH2 vektörü taşıyan kontrol *L. plantarum* suşu çok yavaş gelişim göstererek 76 mM asetat, 60 mM laktat ve 17 mM etanol sentezlemiştir. *L. plantarum* TF103 suşu 12-14 mM oranında laktik asit üretirken, pTRKH2 vektörü transfer edilen TF103 suşu 60 mM oranında laktat üretmiştir. *L. plantarum* TF103 rekombinant suşu hızlı gelişerek 90-130 mM oranları arasında etanol ürettikleri belirlenmiştir. pTRKH2 vektörü eklenmiş rekombinant *L. plantarum* TF103 suşunun ana kaynağı olan *L. plantarum* NCIMB8826 suşu yaklaşık 498 mM laktat ve 4 mM etanol ürettiği analizler sonucunda belirlenmiştir (Liu ve ark., 2006).

Salmeron ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, *L. acidophilus* (NCIMB 8821), *L. plantarum* (NCIMB 8826) ve *L. reuteri* (NCIMB 11951) kültürlerini yulaf, arpa ve malt'lara aşılayarak tahıl kaynaklı probiyotik içecekler üretmişlerdir. Bu içeceklerdeki uçucu birleşiklerden asetaldehit, aseton ve etanol analizi yapmışlardır. *L. reuteri* malt'ı fermente ettiklerinde etanol sentezinde küçük bir artış gözlemlenmiştir. *L. plantarum* fermente edilmiş yulaf ve arpa'da az miktarda asetaldehit sentezlemiştir. *L. acidophilus* fermente edilmiş yulaf'ta düşük oranda etanol üretmiştir. *L. acidophilus* ve *L. reuteri* fermente edilmiş arpa'da dikkate değer oranda etanol sentezlediklerini tespit etmişlerdir. *L. plantarum* malt fermantasyonu 36 saat sonunda asetaldehit üretirken, yulafta ise sadece aseton sentezlemiştir. *L. acidophilus* arpa fermantasyonunun 36 saat sonunda 2.7-65.2 mg/l oranında etanol sentezlendiğini tespit etmişlerdir.

2,3-bütanediol ekonomik değeri olan önemli bir kimyasal beslenme stoğu olduğundan biyoteknolojik üretimi önem arz etmektedirler. 2,3-bütanediol dehidrojenasyonu acetoin ve diasetil ile sonuçlanır. Bazı gıda ürünlerine tereyağı aromasında sorumlu tat verici maddelerdir. Genetik olarak laktat dehidrojenaz aktivitesi ve bütanediol dehidrojenaz heterolog ekspresyonunun önemli ölçüde azaltarak tasarlanmış *L.*

plantarum suşunda 2,3-bütanediol verimi %49 oranında artırmışlardır (Gaspar ve ark., 2013).

Çalışmamızda, 2,3-bütanediol üretimi en az 44 nolu izolat tarafından 0.111 mM oranında gerçekleşirken, en yüksek 41 nolu izolat tarafından 13.148 mM oranında sentezlediği belirlenmiştir. İzolatlardan 24 ve 26 nolu izolatlar 1.922 mM, 46 ve 74 nolu izolatlar 6.923 mg/ml, 17 ve 62 nolu izolatlar 4.934 mM oranda 2,3-bütanediol sentezlediği tespit edilmiştir. En az ve en çok 2,3-bütanediol sentezleyen izolatların (44 ve 41) 2 adet plazmit içerdiği, aynı oranlarda sentez yapan 24 ve 26 nolu izolatlarda ise bir adet plazmid varlığı gözlemlenmiştir.

L. plantarum VL103 (pGIZ906) suşu, ortamda 20 mM glikoz varlığında oluşan fermentasyonda 8.8 mM 2,3-bütanediol, 2.6 mM asetoin, 4.0 mM manitol, 4.8 mM etanol ve eser miktarda suksinat (1.8 mM) ve laktat (0.7 mM) sentezlediği tespit edilmiştir. *L. plantarum* VL103 (pGIVL202) suşu, aynı ortamda oluşan fermentasyon sonucunda 13.1 mM sorbitol ve 6.6 mM asetoin sentezlerken az miktarlarda manitol (2.7 mM), asetat (1.8 mM), etanol (0.7 mM), laktat (0.5 mM), suksinat (0.3 mM) ve pirüvat (0.3 mM) sentezledikleri belirlenmiştir (Ladero ve ark., 2007).

Yaptığımız çalışmada *L. plantarum* izolatları tarafından üretilen aromatik madde miktarları daha önce yapılmış çalışmalarda elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğal turşu örneklerinden izole edilen *L. plantarum* suşlarının genetik elementleri, antibiyotik dirençlilik, biyojen amin ve aromatik madde üretme özelliklerinin belirlendiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Türkiye'nin farklı bölgelerinden doğal metotlarla yapılmış turşu örnekleri toplanarak LAB'lar izole edilmiştir. Bu izolatların bazı kimyasal ve *recA* gen dizisi kullanılarak PCR ile tanımlanması yapılmış ve sonuç olarak toplam 78 adet şüpheli *L. plantarum* suşu elde edilmiştir. Bu suşlar evrensel 16S rRNA primeri ile hazırlanan PCR ürünlerinin sekans analizi yapılmış ve 63 suşun *L. plantarum* olduğu tespit edilmiştir.

Plazmit DNA izolasyonu sonucunda *L. plantarum* izolatlarından 15 tanesinin plazmit içermediği belirlenmiştir. İzolatlar plazmit içerikleri bakımından değerlendirildiğinde; *L. plantarum* izolatlarının ortalama 1 plazmit içerdiği ve izolatların en fazla üç adet farklı plazmit bulundurduğu tespit edilmiştir.

İzolatların antibiyotiklere karşı dirençliliğin belirlenmesi için yapılan çalışmada 45 nolu izolatın tüm antibiyotiklere karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. *L. plantarum* izolatlarının penicillin %78, eritromisin %2, amikasin %92, rifampisin %8 ve trimetoprim'e %2 oranında dirençli iken, eritromisin %19, amikasin %5 ve rifampisin'e karşı %27 oranında orta derecede dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu antibiyotiklere karşı dirençlilik ve duyarlılık oranları plazmit içeriklerine göre değerlendirildiğinde en duyarlı olan izolatların genelinde plazmit yok iken, en dirençli olan izolatlarda ise plazmit varlığı tespit edilmiştir.

L. plantarum izolatlarının biyojen amin üretme potansiyellerine bakıldığında; lizin eklenmiş besi ortamında bütün izolatlar (63 izolat) kadaverin sentezlediği tespit edilmiştir. Ornitin eklenmiş besi ortamında geliştirilen izolatlardan 3 tanesinde (5, 40 ve 62 nolu) putresin sentezlemediği belirlenmiştir. Histidin eklenmiş besi ortamında geliştirilen izolatlardan sadece 9 nolu izolatın histamin sentezlemediği görülmüştür. Lizin eklenmiş besi ortamında *L. plantarum* izolatları kadaverin üretme miktarı 32-298 mg/l arasında değişim gösterdiği, histidin eklenmiş besi ortamındaki *L. plantarum* izolatlarında histamin üretim miktarı 14-668 mg/l arasında değişim göstermiştir. Ornitin eklenmiş besi ortamındaki *L. plantarum* izolatlarında putresin üretim miktarı 20-994 mg/l arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Lizin, ornitin ve histidin eklenmiş besi ortamındaki toplam biyojen amin miktarları 115-1332 mg/l arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Toplam biyojen amin miktarı *L. plantarum* 4, 13, 17, 22 ve 53 nolu izolatlarında toksikolojik açıdan önerilmemektedir. Diğer *L. plantarum* izolatlarının ise üretikleri kadaverin, putresin ve histamin biyojen aminlerinin toplam 1000 mg/kg değerinin altında olduğu için toksikolojik açıdan starter kültür olarak kullanılmasında faydalı olacağı düşünülmektedir. Plazmit sayıları eşit olan izolatların bazıları eşit miktarlarda aynı biyojen amin sentezlediği belirlenmiştir. Biyojen amin (kadaverin ve histamin) sentezi az olan izolatlarda daha fazla sayıda plazmid var iken, çok sentezleyen izolatlarda ise plazmit sayılarında azalmanın olduğu tespit edilmiştir.

L. plantarum izolatlarının aromatik madde sentez oranları değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Aromatik madde (format, pirüvat ve laktat sentez) sentezi en az olan izolatlarda daha fazla sayıda (1 ve 2 adet) plazmid var iken, en fazla miktarda sentez yapan izolatlarda ise plazmit varlığı tespit edilememiştir. Etanol ve 2,3-bütanediol maddelerinin en az ve en fazla miktarda sentez yapan izolatlarda eşit sayılarda plazmit varlığı belirlenmiştir. Aynı miktarlarda aromatik madde sentezleyen izolatlarda eşit sayıda plazmit olduğu gözlemlenmiştir. *L. plantarum* izolatlarının sentezledikleri aromatik madde miktarları, yapılmış benzer çalışmalardaki sonuçlara benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Son yıllardaki teknolojik gelişmelerle klasik gıda fermantasyonlarının ötesinde, uygulamalarında LAB'ların kullanımını temel almışlardır. Son metabolik mühendislik stratejileri LAB'ların hücresel özelliklerini geliştirmek ve katma değer kimyasalların biyo üretimi için LAB'ların hücresel fabrikalar olarak tasarlanmasını tartışmaktadırlar. Bu nedenle aromatik madde sentez oranları (etanol gibi) yüksek olan izolatlar üzerinde daha kapsamlı çalışmalar yapılarak, bunun gibi değerli kimyasalların biyolojik olarak üretiminin artırılması endüstriye büyük katkısı olacağı düşünülmektedir.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre izolatların incelenen bütün özellikleri ele alındığında; plazmit içermeyen, antibiyotiklere duyarlı, biyojen amin üretimi gıda kalite ve güvenliği açısından yasal limitlerde bulunan *L. plantarum* 25, 29, 49, 60 ve 67 nolu izolatların gıda endüstrisinde kullanılabilir olduğu belirlenmiştir. Ancak bununla birlikte bu alanda gerçekleştirilecek araştırmalar kapsamında, seçilmiş izolatlardan kontrollü şartlarda turşu üretiminin yapılması, bunlarda gıda kalite ve güvenlik özelliklerinin de belirlenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akbaş, L.G. 2006. Değişik Turşularda Biyojen Amin Miktarları Üzerine Araştırma, Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara. 37s.
- Aktan, N., Yücel, U., Kalkan, H. 1998. Turşu Teknolojisi. Ege Üniviversitesi Meslek Yüksek Okulu Yayınları No: 23, Ders Kitabı No:5, İzmir, 132s.
- Alberto, M.R., Arena, M.E., Manca De Nadra, M.C. 2002. A Comparative Survey of Two Analytical Methods for Identification and Quantification of Biogenic Amines. *Food Control*, 13:125-129.
- Allen, D.G.J.R. 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 Fort He Degree of Master of Science Department of Food Science, 91s.
- Ammor, M.S., Florez, A.B., Mayo, B. 2007. Antibiotic Resistance in Non Enterococcal Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24:559-570.
- Anderson, D.G., Mckay, L.L. 1983. Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from *Lactic Streptococci*. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 549- 552.
- Anita, Y.S., Wessel, J.T., Stander, M., Maret, T. 2013. Evaluating the Influence of Maceration Practices on Biogenic Amine Formation in Wine. *LWT-Food Science and Technology*, 53:297-307.
- Anonymous, 1991. Normas Sanitarias Apfificables A La Production Ya La Puesta En El Mercado De 10s Productos Pesqueros. J. Eur. Communities. in: Shalaby, A.R. (1996). Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health. *Food Res. Int.*, 29: 675-690.
- Anonymous, 1997. Türk Gıda Kodeksi, Ek-16, Yabancı Madde ve Bileşikler, T.C. Resmi Gazete, Sayı: 22172.
- Anonymous, 2002. Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ Yetki Kanunu Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Ek-3 Yabancı Madde ve Bileşikler. Yayımlandığı R.Gazete 23.09.2002-24885 Tebliğ No: 2002/63.
- Anonymous, 1993. Hıyar Turşusu Standardı. TS 11112. 13 sayfa, TSE, Ankara.
- Anonymous, 1999. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, The 9th International Supplement; M100-S9, Villanova, PA.
- Arena, M.E., Manca De Nadra, M.C. 2001. Biogenic Amines Productions by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol*, 90:158-162.
- Arena, M.E., Fiocco, 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: 205-210.
- Aslım, B., Beyatlı, 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.
- Ayhan, K., Durlu-Özkaya, F. 2007. Biogenic Amines in Foods. *Metabolism and Applications of Lactic Acid Bacteria*, 9:87-113.

- Ayres, J.C., Mundt, J.O., Sandine, W.E. 1980. Foodborne Illnesses. *Microbiology of Foods*, 21:708-716.
- Badii, R., Jones, S., Warner, P.J. 1989. Sphaeroblast and Electroporation Mediated Transformation of *Lactobacillus plantarum*. *Let. App. Microbiology*, 9:41-44.
- Bakırcı, İ. 2000. Peynirlerde Biyojen Amin Oluşumu ve Etkili Faktörler, 6. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Tekirdağ, 328-336s.
- Bardöcz, S. 1995. Polyamines in Foods and Their Consequences for Food Quality and Human Health. *Trends in Food Science and Technology*, 6:341-346.
- Bayrak, A. 2006. Gıda Aromaları. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:32, 1-44s.
- Belicova, A., Mikulasova, M., Dusinsky, R. 2013. Probiotic Potential and Safety Properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza Cheese. *Hindawi Publishing Corporation Bio Med Research International*, 2013:1-8.
- Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Palma, S.B., Sabbag, N.G., Zalazar, C.A., 2009. Proteolytic Activity of Three Probiotic Strains in Semi-Hard Cheese as Single and Mixed Cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *International Dairy Journal*, 19(8):467-475.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, H.W. 1999. Improved Screening Procedure for Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53:33-41.
- Bozkurt, H., Erkmen, O. 2004. Effects of Temperature, Humidity and Additives on the Formation of Biogenic Amines in Sucuk During Ripening and Storage Periods. *Food.Sci. Tech. Int.*, 10:8-21.
- Brink, B.T., Damink, C., Joosten, H.J., Huis 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., 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*, 85:111-125.
- Bunkova, L., Bunka, F., Hlobilova, M., Vanatkova, Z., Novakova, D., Drab, V. 2009. Tyramine Production of Technological Important Strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur Food Res. Technol.*, 229:533-538.
- Busch, U., Nitschko, H. 1999. Methods for Differentiation of Microorganisms. *Journal of Chromatography*, 722:263- 278.
- Bütikofer, U., Funchs, D., Hurni, D., Bosset, J.O. 1990. Bestimmung Biogener Amine in Käse. *Mitteilungen der Gebiete der Lebensmittelhygiene*, 81: 120-133.
- Cabaroğlu, T. 1995. Nevşehir-Ürgüp Yöresinde Yetiştirilen Beyaz Emir Üzümünün ve Bu Üzümünden Elde Edilen Şarapların Aroma Maddeleri Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana. 152s.
- Calderbank, J. Ve Hammond, J.R.M. 1994. Influence of Higher Alcohol Availability on Ester Formation by Yeast. *Journal of American Society of Brewing and Chemistry*, 52(2):84-90.
- Callejon, S., Sendra, R., Ferrer, S., Pardo, I. 2014. Identification of a Novel Enzymatic Activity from Lactic Acid Bacteria able to Degrade Biogenic Amines in Wine. *Appl Microbiol Biotechnology*, 98(1):185-98.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F. 1999. Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Food Preservation. *Int. J. of Food Mic.*, 50:131-139.
- Changyuan, W., Yunguang, W., Changqing, Y., Yanli, H. 2010. Detection of Lactic Acid Bacteria Producing Biogenic Amine and Determination of Content. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 1:27-31.

- Choudhury, N., Hansen, W., Engesser, D., Hammes, W.P., Holzapfel, W.H. 1990. Formation of Histamine and Tyramine by Lactic Acid Bacteria in Decarboxylase Assay Medium. *Letters in Applied Microbiology*, 11:278-281.
- Collins, CH., Lyne, PM., Grange, JM. 1989. Microbiological Methods. Sixth Edition, Butterworths and Co. Ltd. London, 410s.
- Corsetti, A., Settanni, L., Van Sinderen, D., Felis, G.E., Dellaglio, F., Gobbetti, M. 2005. *Lactobacillus rossii* sp. nov. Isolated from Wheat Sourdough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:35-40.
- Costantini, A., Pietroniro, R., Doria, F., Pessione, E., Garcia-Moruno, E. 2013. Putrescine Production from Different Amino Acid Precursors by Lactic Acid Bacteria from Wine and Cider. *International Journal of Food Microbiology*, 165:11-17.
- Coşansu, S. 2009. Determination of Biogenic Amines in Fermented Beverage, Boza. *Journal of Food. Agriculture and Environment*, 7(2):54-58.
- Coton, E., Coton, M. 2005. Multiplex PCR for Colony Direct Detection of Gram Positive Histamine and Tyramine-Producing Bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 63:296-304.
- Çolak, H., Uğur, M. 2002. Farklı Muhafaza Sıcaklığı ve Süresinin Fermente Sucuklarda Biyogen Aminlerin Oluşumu Üzerine Etkisi. *Turk J. Vet anim. Sci.*, 26:779-784.
- Daeshcel, M. 1989. Antimicrobial Substances from Lactic Acid Bacteria and Dairy Propionibacteria. *Lait*, 75:463-472.
- Daniels, J.A.R., Krishnamurthi, S.S., Rizvi, H. 2003. A Review of Effects of Carbon Dioxide on Microbial Growth and Food Quality. *J. Food Prot.*, 48:532-537.
- Danielsen, M., Wind, A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to Antimicrobial Agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82:1-11.
- De Las Rivas, B., Marcobal, A., Munoz, R. 2005. Improved Multiplex-PCR Method For He Simultaneous Detection of Food Bacteria Producing Biogenic Amines. *FEMS Microbiology Letters*, 244:367-372.
- Demir, N., Bahçeci, K.S., Acar, J. 2006. The Effects of Different Initial *Lactobacillus plantarum* Concentrations on Some Properties of Fermented Carrot Juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30:352-363.
- De Vos, W.M., Hugenholtz, J. 2004. Engineering Metabolic Highways in Lactococci and other Lactic Acid Bacteria. *TRENDS in Biotechnology*, 22(2):72-79.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M., Weckx, S. 2014. Microbial Ecology of Sourdough Fermentations: Diverse or uniform. *Food Microbiology*, 37:11-29.
- Dilsiz, N. 2009. Moleküler Biyoloji. Palme Yayıncılık No:279, Ankara, 49s.
- Duckworth, A.W., Ruiz-Barba, J.L., Warner, P.J. 1993. Construction of Integrating Derivatives of pHV60 for Use in *Lactobacillus plantarum*. *Fems Microbiology Letters*, 114(3): 267-272.
- Durlu-Özkaya, F., Ayhan, K., Vural, N. 2001. Biogenic Amines Produced by Enterobacteriaceae Isolated from Meat Products. *Meat Sci.*, 58:163-6.
- Edwards, R.A., Sandine, W.E. 1981. Public Health Significance of Amines in Cheese. *J. Dairy Sci.*, 64:2431-2438.
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E., Hirvi, T. 1993. Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Dry Sausages. *Journal of AOAC International*, 76:575-577.
- Ekici, K., Coşkun, H. 2004. Histamine Contents of Some Commercial Vegetable Pickles. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(3):197-198.

- Ercan, S.Ş., Bozkurt, H., Soysal. 2013. Significance of Biogenic Amines in Foods and Their Reduction Methods. *Journal of Food Science and Engineering*, 3:395-410.
- Ergen, K.Ö. 2006. Sofralık Zeytinlerde Biyojen Amin Miktarlarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara. 45s.
- Essid, I., Hassouna, M. 2013. Effect of Inoculation of Selected *Staphylococcus xylosus* and *Lactobacillus plantarum* Strains on Biochemical, Microbiological and Textural Characteristics of a Tunisian Dry Fermented Sausage. *Food Control*, 32:707-714.
- Ferain, T., Schanck, A.N., Delcour, J. 1996. ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Glucose and Citrate end Products in an *ldhL-ldhD* Double-Knockout Strain of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 178(24):7311-7315.
- Fernandez, M., Linares, D.M., Rodriguez, A., Alvarez, M.A. 2007. Factors Affeting Tyramine Production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Appl Microbiol. Biotechnology*, 73:1400-1406.
- Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S., Beresford, T. 1999. Phenotypic and Genotypic Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Mature Cheddar Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3418-3426.
- Garai, G., Duenas, M.T., Irastorza, A., Moreno-Arribas, M.V. 2007. Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Cider. *Letters in Applied Microbiology*, 45(5):473-478.
- Garcia-Garcia, P., Brenes-Balbuena, M., Hornero-Mendez, D., Garcia-Borrego, A., Garrido-Fernandez, A. 2000. Content of Biogenic Amines in Table Olives. *Journal of Food Protection*, 63(1):111-116.
- Garcia-Garcia, P., Brenes-Balbuena, M., Romero-Barranco, C., Garrido-Fernandez, A. 2001. Biogenic Amines in Packed Table Olives and Pickles. *Journal of Food Protection*, 64(3):374-378.
- Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N.D., Coccagn-Bousquet, M. 1997. Control of the Shift from Homolactic Acid to Mixed-Acid Fermentation in *Lactococcus lactis*: Predominant Role of the NADH/NAD⁺ Ratio. *J. Bacteriology*, 179(17):5282-5287.
- Garvie, E.I. 1980. Lactic Dehydrogenases of Strains of The Genus *Leuconostoc*. *J. Gen. Microbiology*, 58:85-94.
- Gaspar, P., Carvalho, A.L., Vinga, S., Santos, H., Neves, A.R. 2013. From Physiology to Systems Metabolic Engineering for The Production of Biochemicals by Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology Advances*, 31:764-788.
- Gezginç, Y. 2010. Geleneksel Yoğurtlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Plazmit İçeriği ve Biyojenik Amin Üretimi Bakımından Gıda Endüstrisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Doktora Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kahramanmaraş. 245s.
- Glentinga, J., Beckb, H.C., Vrang, A., Riemann, H., Ravna, P., Hansen, A.M., Antonsson, M., Ahrned, S., Israelsen, H., Madsen, S. 2013. Anchorless Surface Associated Glycolytic Enzymes from *Lactobacillus plantarum* 299v Bind to Epithelial Cells and Extracellular Matrix Proteins. *Microbiological Research*, 168:245-253.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R. 2005. Biochemistry and Physiology of Sourdough Lactic Acid Bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 16:57-69.
- Grattepanche, F., Susanne M.S., Leo, M.C.L. 2008. Recent Developments in Cheese Cultures with Protective and Probiotic Functionalities. *Dairy Sci. Technology*, 88(4-5):421-444.

- Gücin, F., Dülger, B. 1995. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu. Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları No: 3, Ders Kitabı No:1, Bursa, 155s.
- Güçükoğlu, A., Küplülü, Ö. 2010. The Effect of Different Starter Cultures and Ripening Temperatures on Formation of Biogenic Amine in Turkish Fermented Sausages. *Eur. Food Res. Technology*, 230:875-884.
- Gürsoy, O., Kınık, Ö. 2006. Fonksiyonel Starter Kültürlerin Teknolojik Uygulamalarına Bir Bakış. Türkiye 9. Gıda Kongresi 24-26 Mayıs Bolu, 173-174.
- Halasz, A., Barath, A., Holzapfel, W.H. 1999. The Influence of Starter Culture Selection on Sauerkraut Fermentation. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 208:434-438.
- Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. 1994. Biogenic Amines and Their Production by Microorganisms in Food. *Trends Food Sci. Tech.*, 5:42-49.
- Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S. 1998. Vancomycin Susceptibility as an Aid to The Identification of Lactobacilli. *Lett. Appl. Microbiology*, 26:153-154.
- Hammes, W.P., Vogel, R.F. 1995. The genus *Lactobacillus*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria. Wood BJB and Holzapfel WH (Eds), Chapman & Hall, London, 19-54s.
- Holzapfel, W.H. 2002. Appropriate Starter Culture Technologies for Small-scale Fermentation in Developing Countries. *Int. J. of Food Microbiology*, 75: 97-212.
- Hugenholtz, J., Sybesma, W., Groot, M.N., Wisselink, W., Ladero, V., Burgess, K., Van Sinderen, D., Piard, J.C., Eggink, G., Smid, E.J., Savoy, G., Sesma, F., Jansen, T., Hols, P., Kleerebezem, M. 2002. Metabolic Engineering of Lactic Acid Bacteria for The Production of Nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82:217-235.
- Hummel, A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P. 2007. Characterisation and Transfer of Antibiotic Resistance Genes from Enterococci Isolated from Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:730-739.
- 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
- Hutkins, R.W. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods. IFT Press, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 473s.
- Huys, G., Pearson, M., Kampfer, P., Denys, R., Cnockaert, M., Inglis, V., Swings, J. 2003. *Aeromonas hydrophila* subsp ranae subsp nov. Isolated from Septicaemic Farmed Frogs in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53:885-891.
- 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 in Dependent Methods. *Food Microbiology*, 26:128-135.
- Ikoni, P., Tasi, T., Petrovi, L., Skaljic, S., Jakanovi, M., Mandi, A., Ikoni, B. 2013. Proteolysis and Biogenic Amines Formation During The Ripening of Petrovska Klobasa, Traditional Dry-fermented Sausage from Northern Serbia. *Food Control*, 30:69-75.
- Izquierdo-Pulido, M., Hernandez-Jover, T., Marine-Font, A., Vidal-Carou, M. 1996. Biogenic Amines in European Beers. *J Agric Food Chemistry*, 44:3159-3163.
- Ji, Y., Kim, H., Park, H., Lee, J., Lee, H., Shin, H., Kim, B., Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. 2013. Functionality and Safety of Lactic Bacterial Strains from Korean Kimchi. *Food Control*, 31:467-473.
- Johansson, G., Berdague, J.L., Larsson, M., Tran, N., Borch, E. 1994. Lipolysis, Proteolysis and Formation of Volatile Components During Ripening of a Fermented Sausage with *Pediococcus xylosus* as Starter Culture. *Meat Sci.*, 38:203-218.

- Joosten, H.M.L.J., Northolt, M.D. 1989. Detection, Growth, and Amine-Producing Capacity of Lactobacilli in Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (9): 2356-2359.
- Kalac, P., Krausova, P. 2005. A Review of Dietary Polyamines: Formation, Implications for Growth and Health and Occurrence in Foods. *Food Chemistry*, 90:219-230.
- Kalac, P., Spicka, J., Krizek, M., Pelikanova, T. 2000. The Effects of Lactic acid Bacteria Inoculants on Biogenic Amines Formation in Sauerkraut. *Food Chemistry*, 70:355-359.
- Kalac, P., Spicka, J., Krizek, M., Steidlova, S., Pelikanova, T. 1999. Concentrations of Seven Biogenic Amines in Sauerkraut. *Food Chemistry*, 67:275-280.
- Karovicova, J., Kohajdova, Z. 2005. Biogenic Amines in Food. Chem. Pap., 59 (1):70-79.
- Kelly, W.J., Asmundson, R.V., Huang, C.M. 1996. Characterization of Plantaricin KW30, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Bacteriology*, 81:657-662.
- Kessler, D., Leibrecht, I., Knappe, J. 1991. Pyruvate-Formate Lyase Deactivase and Acetyl CoA Reductase Activities of *Escherichia coli* Reside on a Polymeric Protein Particle Encoded by *adhE*. *FEBS Lett.*, 281:59-63.
- Kirschbaum, J., Rebscher, K., Brückner, H. 2000. Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Fermented Foods After Derivatization with 3,5 Dinitrobenzoyl Chloride. *Journal of Chromatography A*, 881:517-530.
- Kongkiattikajorn, J. 2013. Potential of Fermented Sausage-Associated Lactic Acid Bacteria to Degrade Biogenic Amines During Storage. Lactic Acid Bacteria – R and D for Food. *Health and Livestock Purposes*, 97-128.
- Kurt, S., Zorba, Ö. 2009. The Effects of Ripening Period, Nitrite Level and Heat Treatment on Biogenic Amine Formation of “Sucuk” – A Turkish Dry Fermented Sausage. *Meat Science*, 82(2):179-184.
- Ladero, V., Ramos, A., Wiersma, A., Goffin, P., Schanck, A., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., Smid, E.J., Hols, P. 2007. High-level Production of The Low-Calorie Sugar Sorbitol by *Lactobacillus plantarum* Through Metabolic Engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6):1864-1872.
- Landeta, G., Curiel, J.A., Carrascosa, A.V., Munoz, R., de las Rivas, B. 2013. Technological and Safety Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Spanish Dry-cured Sausages. *Meat Science*, 95:272-280.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I. 2007. Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria, Acetic Bacteria and Yeast Isolated from Wine. *Food Control*, 18: 1569-1574.
- Lange, J., Thomas, K., Wittmann, C. 2002. Comparison of a Capillary Electrophoresis Method with High-Performance Liquid Chromatography for The Determination of Biogenic Amines in Various Food Samples. *Journal of Chromatography B*, 779:229-239.
- Lange, J., Wittmann, C. 2002. Enzyme Sensor Array for The Determination of Biogenic Amines in Food Samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372:276-283.
- Lash, B.W., Mysliwiec, T.H., Gourama, H. 2005. Detection and Partial Characterization of A Broad-Range Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology*, 22:199-204.
- Lavilla-Lerma, R., Perez-Pulido, M., Martinez-Bueno, M., Maqueda, E. 2013. Valdivia Characterization of Functional, Safety, and Gut Survival Related Characteristics of *Lactobacillus* Strains Isolated from Farmhouse Goat's Milk Cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 163:136-145.

- Leelawatcharamas, V., Chia, L.G., Charoenchai, P., Kunajakr, N., Liu, C.Q., Dunn, N. 1997. Plasmid-Encoded Copper Resistance in *Lactococcus lactis*. *Biotechnol Lett.*, 19:639-643.
- Lehtonen, M., Jounela-Eriksson, P. 1983. Volatile and Non-volatile Compounds in The Flavour of Alcoholic Beverages. in: Flavour of Distilled Beverages, Origin and Development. *Ellis Horwood Series in Food Science and Technology*, 2:280-287.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for The Food Fermentation Industry. *Trends Food Sci. Technology*, 15:67-68.
- Leuschner, R.G., Heidel, M., Hammes, W.P. 1998. Histamine and Tyramine Degradation by Food Fermenting Microorganisms. *J. Food Microbiology*, 39:1-10.
- Liu, S., Nichols, N.N., Dien, B.S., Cotta, M.A. 2006. Metabolic Engineering of a *Lactobacillus plantarum* Double ldh Knockout Strain for Enhanced Ethanol Production. *J. Ind Microbiol Biotechnology*, 33:1-7.
- Loizzo, M.R., Menichini, F., Picci, N., Puoci, F., Spizzirri, U.G., Restuccia, D. 2013. Technological Aspects and Analytical Determination of Biogenic Amines in Cheese. *Trends in Food Science and Technology*, 30:38-55.
- Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic Amines in Wines: Role of Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199:9-13.
- Lu, Z., Breidt, F., Fleming, H.P., Altermann, E., Klaenhammer, T.R. 2003. Isolation and Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage, øJL-1, From a Cucumber Fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 84:225-235.
- Maijala, R., Eerola, S. 1993. Contaminant Lactic Acid Bacteria of Dry Sausages Produce Histamine and Tyramine. *Meat Science*, 35(3):387-395.
- Maijala, R., Nurmi, F., Fischer, A. 1995. Influence of Processing Temperature on The Formation of Biogenic Amines in Dry Sausages. *Meat Science*, 39(1):19-22.
- 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.
- Mandel, M., Higa, A. 1970. Calcium Dependent Bacteriophage DNA Infection. *J. Mol. Biol.*, 53:159-162.
- Mandel, M., Igambi, L., Bergendahl, J., Dobson, M.L., Scheltgen, E. 1970. Correlation of Melting Temperature and Cesium Chloride Buoyant Density of Bacterial Deoxyribonucleic Acid. *J. Bacteriol.*, 101:333-338.
- Marshall, V.M., Tamime, A.Y. 1997. Starter Cultures Employed in The Manufacture of Biofermented Milks. *International Journal of Dairy Technology*, 50:35-41.
- Mathur, S., Singh, R. 2005. Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria-A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 105:281-295.
- Mckay, L.L., Baldwin, K.A. 1990. Applications for Biotechnology : Present and Future Improvements in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiological Reviews*, 87: 3-14.
- Mckinley, M. 2005. The Nutrition and Health Benefits of Yoghurt. *Int. Journal of Dairy Technology*, 58:1-12.
- Moret, S., Conte, L.S. 1996. High-performance Liquid Chromatographic Evaluation of Biogenic Amines in Foods, An Analysis of Different Methods of Sample Preparation in Relation to Food Characteristics. *Journal of Chromatography A*, 729:363-369.
- NCCLS, 2004. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Approved Standard, 6th ed. NCCLS document M11-A6. Villanova, PA.

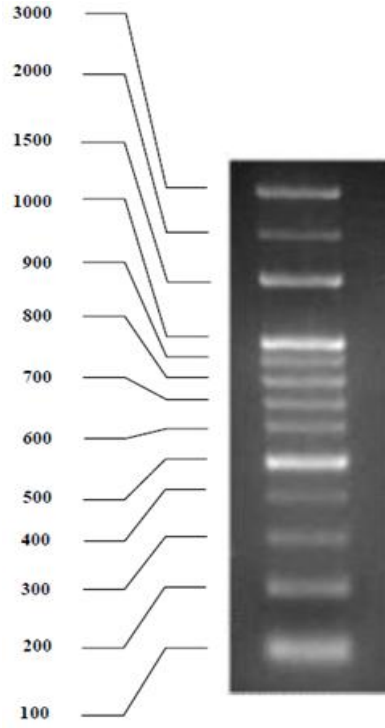
- Nie, X., Zhang, Q., Lin, S. 2014. Biogenic Amine Accumulation in Silver Carp Sausage Inoculated with *Lactobacillus plantarum* Plus *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 153:432-436.
- Nordström, K. 2006. Plasmid R1- Replication and Its Control. *Plasmid*, 55:1-26.
- Nout, M.J.R. 1994. Fermented Foods and Food Safety. *Food Research International*, 27(3): 291-298.
- Nykanen, L., Suomalainen, A. 1983. Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages. D. Reider Publishing Company, 407s.
- Ott, A., Germond, J.E., Baumgartner, M., Chaintreau, A. 1999. Aroma Comparisons of Traditional and Mild Yogurts: Headspace Gas Chromatography Quantification of Volatiles and Origin of α -diketones. *J. Agric. Food Chem.*, 4:2379-2385.
- Önal, A. 2006. Current Analytical Methods for The Determination of Biogenic Amines in Food. A review: *Food. Chem.*, 103:1475-1486.
- Özdestan, Ö., Üren, A. 2010. Biogenic Amine Content of Kefir: A Fermented Dairy Product. *Eur Food Res Technology*, 231:101-107.
- Özkaya, F.D., Tunail, N. 2000. Salamura Beyaz Peynirlerde Biyojen Amin Riski. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri (Edit: Demirci, M.). Rebel Yayıncılık, İstanbul, 146-147.
- Pederson, C. 1938. The Gas-Producing Species of The Genus *Lactobacillus*. *J.Bacteriol.*, 35(2):95-108.
- Petri, J., Pfannebecker, J., Fröhlich, H., König, H. 2013. Fast Identification of Wine Related Lactic Acid Bacteria by Multiplex PCR. *Food Microbiology*, 33:48-54.
- Pinho, O., Ferreirara, I.M., Mendes, E., Olivera, B.M., Ferreirara, M. 2001. Effect of Temperature on Evolution of Free Amino Acid and Biogenic Amine Contents During Storage of Azietao Cheese. *Food Chemistry*, 75:287-291.
- Pintado, J., Raimbault, M., Guyota, J.P. 2005. Influence of Polysaccharides on Oxygen Dependent Lactate Utilization by an Amylolytic *Lactobacillus plantarum* Strain. *International Journal of Food Microbiology*, 98:81-88.
- Rabie, M.A., Peres, C., Malcata, F.X. 2014. Evolution of Amino Acids and Biogenic Amines Throughout Storage in Sausages Made of Horse, Beef and Turkey Meats. *Meat Sci.*, 96(1):82-87.
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E.V. 2008. Amylolytic Bacterial Lactic Acid Fermentation. *Biotechnology Advances*, 26:22-34.
- Romero, D.A., Klaenhammer, T. R. 1990. Characterization of Insertion-Sequence is 946, an iso-iss1 Element, Isolated from The Conjugative Lactococcal Plasmid Ptr2030. *Journal of Bacteriology*, 172:4151-4160.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. 2002. Preservation and Fermentation: Past, Present and Future. *Int. J. Food Microbiol.*, 79(1-2):3-16.
- Rubio, R., Aymerich, T., Bover-Cid, S., Dolors Guàrdia, M., Arnau, J., Garriga, M. 2013. Probiotic Strains *Lactobacillus plantarum* 299V and *Lactobacillus rhamnosus* GG as Starter Cultures for Fermented Sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 54:51-56.
- Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C., Jimenez-Diaz, R. 1991. Plasmid Profiles and Curing of Plasmids in *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Green Olive Fermentations. *J. Appl. Bacteriol.*, 71:417-421.
- Salmeron, I., Thomas, K., Pandiella, S.S. 2014. Effect of Substrate Composition and Inoculum on The Fermentation Kinetics and Flavour Compound Profiles of Potentially Non-Dairy Probiotic Formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 55:240-247.

- Selgas, D., Garcia, L., Fernando, G., Ordonez, J.A. 1993. Lipolytic and Proteolytic Activity of *Micrococci* Isolated from Dry Fermented Sausage. *Fleischwirtsch*, 73:1164-1166.
- Settanni, L., Corsetti, A. 2008. Application of Bacteriocins in Vegetable Food Biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121:123-138.
- Shakila, R.J., Vasundhara, T.S., Kurnudavally, K.V. 2001. A Comparison of The TLC Densitometry and HPLC Method For Determination of Biogenic Amines in Fish and Fishery Products. *Food Chemistry*, 75:255-259.
- Shalaby, A.R. 1996. Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health. *Food Res. Int.*, 29:675-690.
- Siezen, R.J., Kok, L., Abee, T., Schaafsma, G. 2002. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Proceeding of the Seventh Symposium on Lactic acid bacteria: Genetics, *Metabolism and Applications Congress*: 1-28.
- Silla-Santos, M. H. 1996. Biogenic Amines: Their Importance in Foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 29:213-231.
- Singh, S., Singh, R. 2014. Phenotypic and Genotypic Characterization of Non-Starter *Lactobacillus* Species Diversity in Indian Cheddar Cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 55:415-420.
- Siragusa, S., Angelis, M.D., Calasso, M., Campanella, D., Minervini, F., Cagno, R.D., Gobbetti, M. 2014. Fermentation and Proteome Profiles of *Lactobacillus plantarum* Strains During Growth Under Food-Like Conditions. *Journal of Proteomics*, 96:366-380.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. 2005. Flavour Formation by Lactic Acid Bacteria and Biochemical Flavour Profiling of Cheese Products. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29:591-610.
- Solem, C., Dehli, T., Jensen, P.R. 2013. Rewiring *Lactococcus lactis* for Ethanol Production. *Appl Environ Microbiol*, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03623-12>.
- Spicka, J., Kalac, P., Bover-Cid, S., Krizek, M. 2002. Application of Lactic Acid Bacteria Starter Cultures for Decreasing The Biogenic Amine Levels in Sauerkraut. *Eur. Food Res. Technol.*, 215:509-514.
- Steinkraus, K.H. 1983. Lactic Acid Fermentation in The Production of Foods from Vegetables, Cereals and Legumes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49:337-348.
- Stewart G.G., Russell I. 1987. Biochemical and Genetic Control of Sugar and Carbohydrate Metabolism in Yeasts. *Yeast Biotechnology Allen and Unwin*, 3:277-310.
- Stratton, J.E., Hutkins, R.V., Taylor, S.L. 1991. Biogenic Amines in Cheese and Other Fermented Foods. A review. *J Food Prot.*, 54:460-470.
- Stratton, J.E., Hutkins, R.W., Sumner, S.S., Taylor, S.L. 1992. Histamine and Histamine-producing Bacteria in Retail Swiss and Low-salt Cheeses. *J. Food Protect*, 55 (6):435-439.
- Sumner, S.S., Roche, S.L., Taylor, F. 1990. Factors Controlling Histamine Production in Swiss Cheese Inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Dairy Science*, 73:3050-3058.
- Suzzi, G., Gardini, F. 2003. Biogenic Amines in Dry Fermented Sausages: A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1):41-51.
- Şahin, İ. 1982. Asit Fermantasyonları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Teksir No:78
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Pelaez, C., Requena, T. 2007. Selective Enumeration and Identification of Mixed Cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei subsp.*

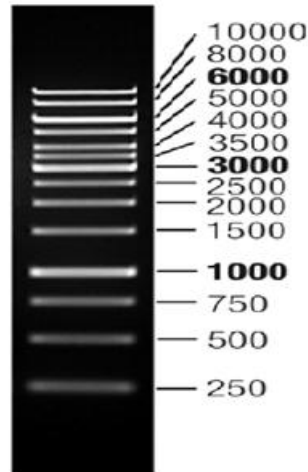
- paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in Fermented Milk. *International Dairy Journal*, 17:1107- 1114.
- Tamang, J., Tamang, B., Schillinger, U., Guigas, C., Holzapfel, W.H. 2009. Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Ethnic Fermented Vegetables of the Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 135:28-33.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K. 1999. *Yoghurt Science and Technology*. Woodhead Publishing Limited. CRC pres. Cambridge England, 619s.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., Huis Veld, J.H.J. 1990. Occurrence and Formation of Biologically Active Amines in Foods. *Int. J. Food Microbiology*, 11:73-84.
- Thomas, T.D., Turner, K.W., Crow, V.L. 1980. Galactose Fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* Pathways, Products, and Regulation. *J. Bacteriol*, 144:672-682.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR assay with *recA* Gene Derived Primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:3450-3454.
- Toso, B., Procida, G., Stefanon, B. 2002. Determination of Volatile Compounds in Cows' Milk using Headspace GC-MS. *Journal of Dairy Research*, 69:569-577.
- Toy, N., Özoğlu, Y. 2013. Laktik Asit Bakterileri Serbest Hücre Ekstraktlarının Patojen Bakterilerin Gelişimine ve Biyojen Amin Üretimine Etkisinin Araştırılması. *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 29(4):117-125.
- Tsuji, A., Okada, S., Hols, P., Satoha, E. 2013. Metabolic Engineering of *Lactobacillus plantarum* for Succinic Acid Production Through Activation of The Reductive Branch of The Tricarboxylic Acid Cycle. *Enzyme and Microbial Technology*, 53:97-103.
- Turgut, Z. 2006. Starter Kültür Kullanılarak Üretilen Hıyar Turşularında Biyojen Amin Oluşumu Üzerine Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi. Gıda Mühendisliği. 65s.
- Vastanoa, V., Salzilloa, M., Sicilianob, R.A., Muscarielloa, L., Saccoa, M., Marascoa, R. 2014. The E1 Beta-subunit of Pyruvate Dehydrogenase is Surface-expressed in *Lactobacillus plantarum* and Binds Fibronectin. *Microbiological Research*, 169:121-127.
- Warthesen, J.J., Scanlan, D.D., Bills, L.M.L. 1975. Formation of Heterocyclic N-Nitrosamines from The Reaction of Nitrite and Selected Primary Diamines and Amino Acids. *J.Agric. Food Chem.*, 23:898-902.
- Williams, A.G., Noble, J., Banks, J.M. 2001. Catabolism of Amino Acids by Lactic Acid Bacteria Isolated from Cheddar Cheese. *International Dairy Journal*, 11:203-215.
- Wright, A.V., Bruce, A. 2003. Genetically Modified Microorganisms and Their Potential Effects on Human Health and Nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 14:264-276.
- Xiong, T., Li, X., Guan, Q., Peng, F., Xie, M. 2014. Starter Culture Fermentation of Chinese Sauerkraut: Growth, Acidification and Metabolic Analyses. *Food Control*, doi: 10.1016/j.foodcont.2013.12.033.
- Yaldrak, G. 2011. Doğal Fermantasyonla Üretilen Şalgam Suyunda Farklı Fermantasyon Sıcaklığının Biyojen Amin Oluşumu Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Sakarya. 23s.
- Yeğin, S., Üren, A. 2008. Biogenic Amine Content of Boza: A Traditional Cerealbased Fermented Turkish Beverage. *Food Chemistry*, 111:983-987.

- Yücel, U., Üren, A. 2008. Biogenic Amines in Turkish Type Pickled Cabbage: Effects of Salt and Citric Acid Concentratio. *Acta Alimentaria*, 37(1):115-122.
- Yücel, U., Üren, A., Hocalar, B., Turantaş, F. 2001. Fermente Ürünlerden Peynir, Şarap ve Lahana Turşularında Histamin Miktarları. TÜBİTAK-TOGTAG Proje no. 1726, İzmir. 1-25s.
- Yüksel, A. 2010. Doğal Fermantasyonla Üretilen Şalgam Suyunda Farklı Tuz Konsantrasyonun Biyojen Amin Oluşumu Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Sakarya. 34s.
- Zeng, X., Xia, W., Wang, J., Jiang, Q., Qiu, Y.X.Y., Wang, H. 2013. Technological Properties of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Chinese Traditional Low Salt Fermented Whole Fish. *Food Control*, 40:351-358.
- Zhang, Q., Lin, S., Nie, X. 2013. Reduction of Biogenic Amine Accumulation in Silver Carp Sausage by an Amine-Negative *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 32:496-500.

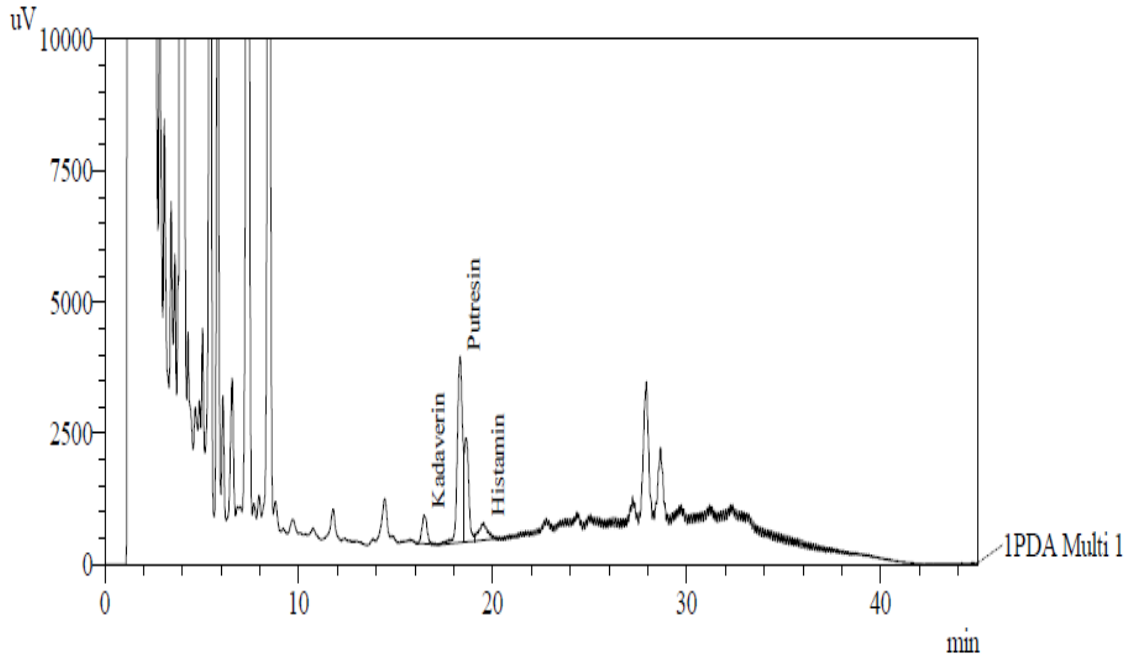
EKLER



EK-1. Agaroz jelde DNA'nın koşturulması sırasında yüklenen DNA standartları. Şekildeki standartlar % 1 agaroz jelde koşturulmuştur. A: 100 bç DNA ladder (Favorgen) 100 – 3000 bç arasında değişen 13 adet lineer çift zincirli DNA parçası içermektedir. 500 ve 1000 bç büyüklüğündeki bantlar diğer bantlardan daha yoğun görünmektedir.

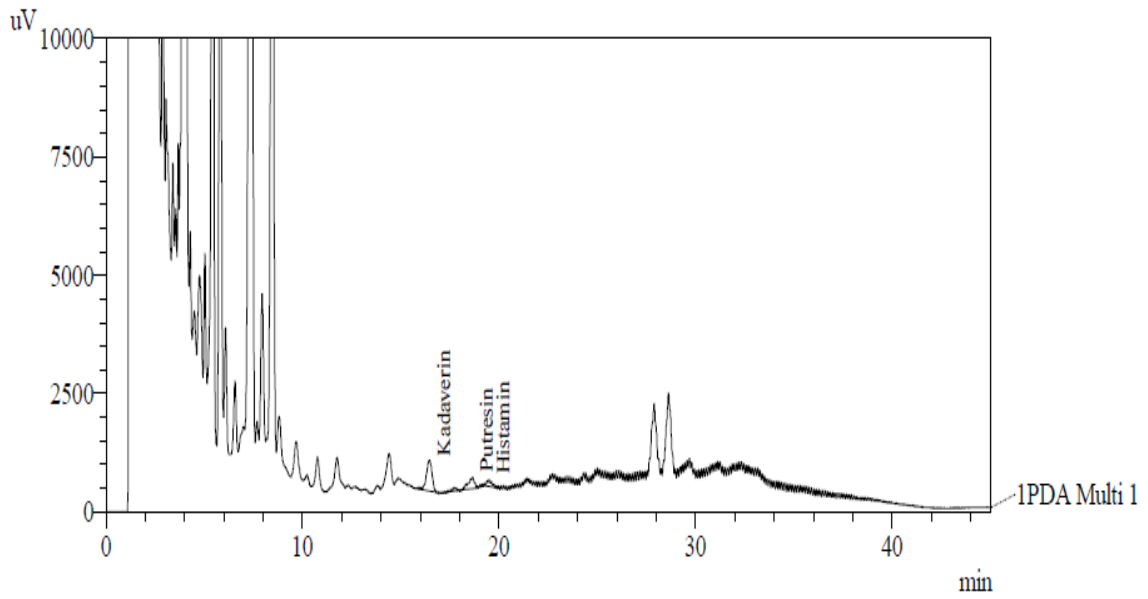


EK-2. Agaroz jelde DNA'nın koşturulması sırasında yüklenen DNA standartları. Şekildeki standartlar % 1 agaroz jelde koşturulmuştur. A: 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific) 250 – 10000 bç arasında değişen 14 adet lineer çift zincirli DNA parçası içermektedir. 1000, 3000 ve 6000 bç büyüklüğündeki bantlar diğer bantlardan daha yoğun görünmektedir.



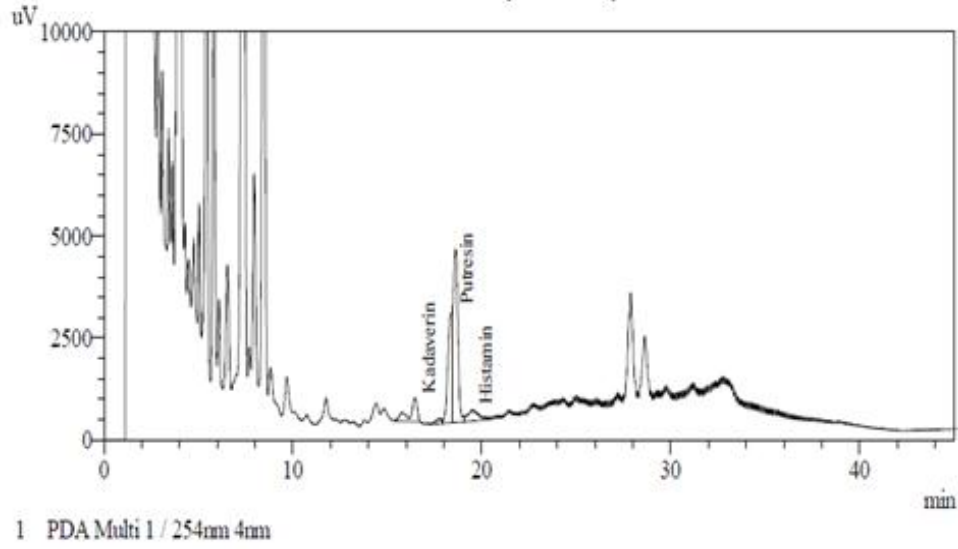
1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

EK-3. Ornitin, lizin ve histidin besi ortamında geliştirilen *L. plantarum* 18 izolatının HPLC’de belirlenen biyojen amin kromatogramı

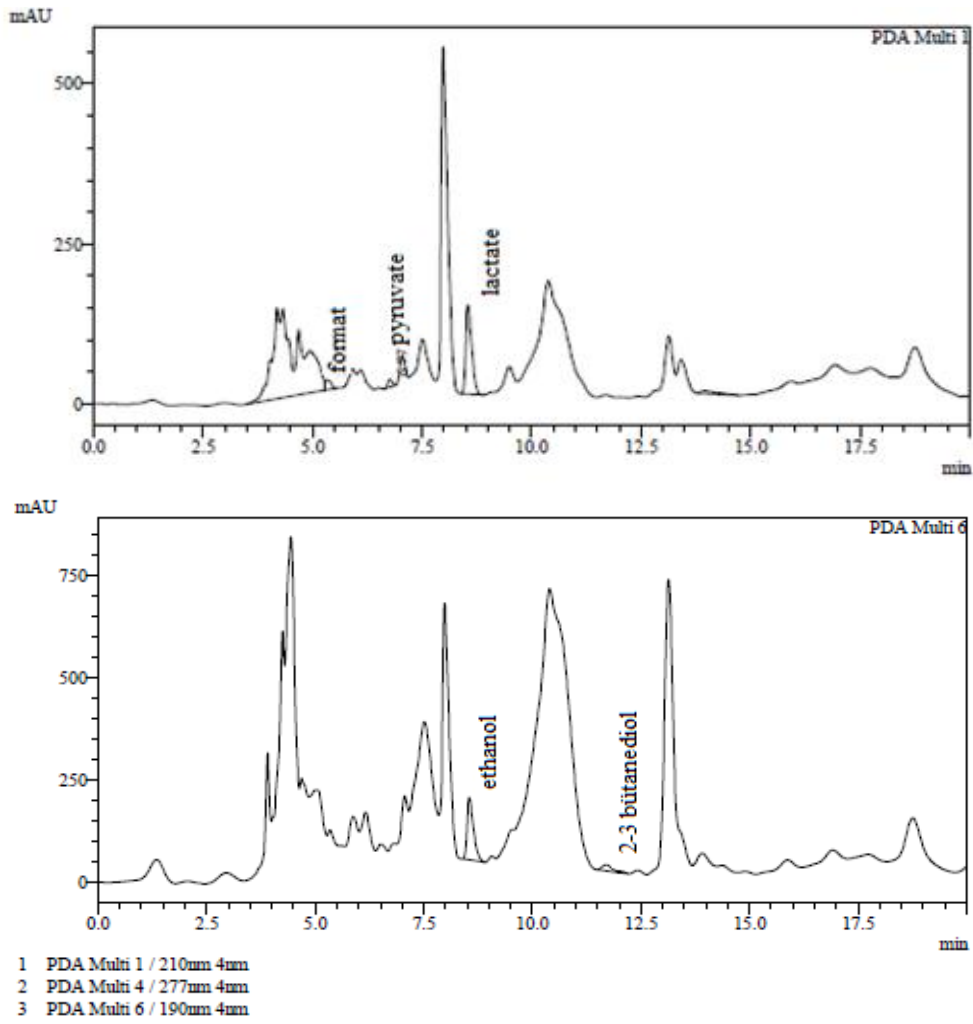


1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

EK-4. Ornitin, lizin ve histidin besi ortamında geliştirilen *L. plantarum* 25 izolatının HPLC’de belirlenen biyojen amin kromatogramı



EK-5. Ornitin, lizin ve histidin besi ortamında geliştirilen *L. plantarum* 22 izolatının HPLC’de belirlenen biyojen amin kromatogramı



EK-6. MRS besi ortamında geliştirilen *L. plantarum* 18 izolatının HPLC’de belirlenen aromatik metabolitlerin kromatogramı.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Yusuf ALAN
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 04.03.1983 Tatvan
Medeni hali : Evli
e-posta : yusufalan13@hotmail.com.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	KSÜ /Biyoloji Bölümü	2010
Lisans	KSÜ/ Biyoloji Bölümü	2006
Lise	Açık Öğretim Lisesi	2002

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
2011-2013	MŞÜ	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Alan, Y., Erbil, N., Dığrak, M. 2012. In Vivo Antimicrobial Activity of *Rheum ribes* Ekstraktları Obtained from Various Plant Parts from Turkey. *Journal of Selçuk University Natural and Applied Science*, 1(4):23-29.

2. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Alan, Y., Dığrak, M. 2012. Doğal Turşulardan İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması. *K.S.Ü. Doğa Bil. Derg.*, 15(2):46-49.

Alan, Y., Atalan, E., Erbil, N., Zorver, F., Kıycak, G., Çiçek, A.İ. 2013. Malatya Kayısı (*Prunus armeniaca*) ve Kayısı Çekirdeklerinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Anadolu Doğa Bilimler Dergisi*, 4(2):60-70.

3. Ulusal ve Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Bal, E.B.B., Bayar, S., **Alan, Y.**, Bay, S., Bal, M.A. 2006. Meme Enfeksiyon Etkenlerinden Olan *Staphylococcus* ve *Streptococcus* Türlerinin Sütten İzole Edilmesi ve Biyokimyasal Yöntemlerle Tiplendirilmesi. 18.Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası-Aydın. s.226.

Alan, Y., Dığrak, M. 2012. Doğal Turşulardan İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması. Ekoloji 2012 Sempozyumu, 03-05 Mayıs 2012, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Kilis. s.162.

Alan, Y., Dığrak, M. 2012. Doğal Turşulardan İzole Edilen *Lactobacillus plantarum*'larda Plazmit İzolasyonu ve Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi. 3 Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 10-12 Mayıs 2012, Selçuk Üniversitesi, Konya. s.734.

Erbil, N., **Alan, Y.**, Dığrak, M. 2012. *Tulipa sistensis* (Muş lalesi) ve *Fritillaria imperialis* (Ağlayan Gelin)'in Farklı Vejetatif Kısımlarının Antimikrobiyal Aktivitesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir. s.1213.

Alan, Y., Erbil, N., Dığrak, M. 2012. *Rheum ribes* (ışgın)'in Farklı Vejetatif Kısımlarından Elde Edilen Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivitesi. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 03-07 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası- Aydın. s.217.

Erbil, N., **Alan, Y.**, Dığrak, M. 2012. *Lamium galactophyllum* Boiss & Reuter, *Lamium macrodon* Boiss & Huet ve *Lamium amplexicaule*'nin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesi ve Toplam Fenolik İçerikleri. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 03-07 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası- Aydın. s.218.

Alan, Y., Erbil, N., Dığrak, M. 2012. Geleneksel Turşulardan İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 03-07 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası- Aydın. s.389.

- Alan, Y.**, Atalan, E., Erbil, N., Zorver, F., Kıyıcak, G., Çiçek, A.İ. 2013. Malatya Kayısı (Prunus armeniaca) ve Kayısı Çekirdeklerinin Antimikrobiyal Aktivitesi. XI. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 01-04 Ekim 2013, Onduz Mayıs Üniversitesi, Samsun. s.137.
- Alan, Y.**, Atalan, E., Erbil, N., Bakır, O., Orman, Z., Kanik, P. 2013. Muş ve Bitlis İlinde Toplanan Bal ve Propolis Örneklerinin Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitesi. XI. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 01-04 Ekim 2013, Onduz Mayıs Üniversitesi, Samsun. s.138.