

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

GELENEKSEL PEYNİRLERDEN BİYOJEN AMİN ÜRETİCİSİ
ENTEROCOCCUS SUŞLARININ İZOLASYONU VE BİYOJEN AMİN
ÜRETME ÖZELLİĞİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE TANIMLANMASI

Simge AKTOP

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2022

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

GELENEKSEL PEYNİRLERDEN BİYOJEN AMİN ÜRETİCİSİ *ENTEROCOCCUS* SUŞLARININ İZOLASYONU VE BİYOJEN AMİN ÜRETME ÖZELLİĞİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE TANIMLANMASI

Simge AKTOP

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA

Bu çalışmada, Ankara ve çevre illerdeki çeşitli market ve pazarlardan geleneksel olarak üretilmiş toplam 452 peynir örneği temin edilmiştir. Örneklerin 391'inde şüpheli *Enterococcus* spp. koloni morfolojisi tespit edilmiştir. Kadaverin, histamin, tiramin ve putresin tez çalışması kapsamında hedef biyojen aminler olarak seçilmiştir. Aminoasit dekarboksilaz broth ortamlarında enterokok izolatlarının 276'sının histamin, 179'unun tiramin, 21'inin putresin ve 13'ünün kadaverin üreticisi olduğu tespit edilmiştir. İzolatların 25'inin histamin, 165'inin tiramin, 3'ünün kadaverin ve 3'ünün putresin üretimi bakımından güçlü üreticiler olduğu belirlenmiştir. 276 izolat biyokimyasal tanımlama testlerine tabi tutulmuştur. Suşların tamamı eskulin hidrolizi pozitif olup; %6,5 NaCl'de, 10-45°C'de ve pH 9,6'da gelişim gösterebilmiştir. Suşların 173'ü α -hemolitik, 17'si β -hemolitik ve 86'sı ise γ -hemolitik yapı göstermiştir. Güçlü histamin üreticisi olarak tanımlanan 25 suş seçilmiştir. Seçilen bu suşların aynı zamanda tiramin, kadaverin ve putresin üreticisi olmasına dikkat edilmiştir. Enterokok suşları tarafından üretilen histamin konsantrasyonunun 14,874-26,239-mg/L, tiramin konsantrasyonunun 2,901-33,472 mg/L, putresin konsantrasyonunun 0,910-97,359 mg/L ve kadaverin konsantrasyonunun ise 1,002-57,836 mg/L düzeylerinde olduğu saptanmıştır. 25 enterokok suşunun 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanımlaması yapılmış ve 18'i (%72) *E. faecium*, 7'si (%28) ise *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. 25 suшта histamin, 24 suшта tiramin, 21 suшта putresin ve 13 suшта kadaverin üretiminden sorumlu aminoasit dekarboksilaz gen bölgesinin varlığı araştırılmış ve agaroz jellerde bant varlıkları gözlemlenmiştir.

Temmuz 2022, 144 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyojen amin, *Enterococcus* spp., Peynir, 16S rDNA

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

ISOLATION OF BIOGENIC AMINE PRODUCER *ENTEROCOCCUS* STRAINS FROM TRADITIONAL CHEESES AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF BIOGENIC AMINE PRODUCTION PROPERTIES

Simge AKTOP

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Pınar ŞANLIBABA

In this study, a total of 452 traditionally made cheese samples were collected from different markets and bazaars in Ankara and surrounding provinces. Suspicious colony morphology for *Enterococcus* spp. was observed in 391 samples. In this study, cadaverine, histamine, tyramine and putrescine were selected as target biogenic amines. 276 of the enterococci isolates were histamine producers, 179 were tyramine producers, 21 were putrescine producers and 13 were cadaverine producers in amino acid decarboxylase broth. In terms of biogenic amine production, 25 of the isolates were found to be strong producers histamine, 165 tyramine, 3 cadaverine and 3 putrescine. Biochemical identification tests were performed on 276 isolates. All strains were positive for esculin hydrolysis; it was able to grow at 6.5% NaCl, 10-45°C, and pH 9.6. Among them, 173 strains showed α -hemolytic, 17 strains β -hemolytic and 86 strains γ -hemolytic structures. Twenty-five strains identified as strong histamine producers were selected. Care was taken to ensure that these selected strains were also producers of tyramine, cadaverine and putrescine. Histamine, tyramine, putrescine and cadaverine concentrations produced by enterococci strains was 14.874-26.239 mg/L, 2.901-33.472 mg/L, 0.910-97.359 mg/L, 1.002-57.836 mg/L, respectively. By 16S rDNA sequence analysis, 25 *Enterococcus* strains were identified at the species level, and 18 of them (72%) were identified as *E. faecium* and 7 (28%) as *E. faecalis*. The presence of amino acid decarboxylase gene regions in strains of 25 histamine-producing, 24 tyramine-producing, 21 putrescine-producing and 13 cadaverine-producing was detected and bands were observed in agarose gels.

July 2022, 144 pages

Key Words: Biogenic amines, *Enterococcus* spp., Cheese, 16S rDNA

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına ışık tutan, ilgi ve desteğini esirgemeyen sevgili danışmanım Sayın Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Kıymetli görüşleriyle tezimin şekillenmesinde yardımcı olan tez izleme komitesinde bulunan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ertan ANLI'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Sayın Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü),

Mesleğe ve hayata dair değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşarak tüm doktora sürecim boyunca destek olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum sevgili hocam Sayın Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN'a (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Verdikleri desteklerle laboratuvar çalışmalarımın kolaylaşmasını sağlayan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK'e (Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü) ve Sayın Doç. Dr. Başar UYMAZ TEZEL'e (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bayramiç Meslek Yüksekokulu), HPLC analizlerinin yürütülmesinde emeği olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Öğr. Gör. Ozan HALİŞCELİK'e (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü),

Doktoranın her aşamasında yanımda olan, dostluğunu ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Gıda Yük. Müh. Esra ŞENTÜRK'e, laboratuvar çalışmalarımın daha verimli ve keyifli geçmesini sağlayan, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili laboratuvar arkadaşlarım Dr. Hacer ASLAN'a, Gıda Yük. Müh. Meryem Nur KOCADAĞ'a, Gıda Yük. Müh. Zehra Tuğçe TOPRAK ÖNAL'a, Gıda Yük. Müh. Gülsüm ATASOY'a ve Gıda Yük. Müh. Seda SEYİRT'e,

Tüm doktora sürecim ve hayatım boyunca, ailenin önemini bir kez daha bana hatırlatan, gösterdikleri sabır, şefkat ve sonsuz sevgileriyle her zaman yanımda olan, hayatta başarılı olabilmem adına en büyük motivasyonu sağlayan, hayattaki en iyi arkadaşlarım biricik annem Sülbiye AKTOP’a ve biricik ablam Dr. Vildan Saba AKTOP’a, manevi olarak her zaman yanımda hissettiğim rahmetli babam Hayrettin AKTOP’a kalpten teşekkürlerimi sunarım.

20L0443004 numaralı ve “Geleneksel Peynirlerden Biyojen Amin Üreticisi *Enterococcus* Suşlarının İzolasyonu ve Biyojen Amin Üretme Özelliğinin Moleküler Düzeyde Tanımlanması” isimli Lisansüstü Tez Projesi (Doktora)’nin gerçekleştirilmesinde katkılarından dolayı, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkür ederim.

Simge AKTOP

Ankara, Temmuz 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Enterokoklar ve Genel Özellikleri.....	3
2.2 Enterokokların Bazı Önemli Özellikleri ve Sağlık Üzerine Etkileri	7
2.2.1 Antibiyotik direçlilik.....	8
2.2.2 Virülans faktör	10
2.2.3 Probiyotik özellik	10
2.2.4 Bakteriyosin üretimi	12
2.2.5 Biyofilm oluşturma	13
2.3 Biyojen Aminler ve Genel Özellikleri.....	13
2.3.1 Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları.....	16
2.3.2 Biyojen aminlerin sağlık üzerine etkileri	17
2.4 Gıdalarda Bulunan Mikrobiyel Kaynaklı Biyojen Aminler	20
2.4.1 Süt ve ürünleri.....	21
2.4.1.1 Peynir	22
2.4.2 Et ve ürünleri.....	24
2.4.3 Su ürünleri	25
2.4.4 Fermente sebze ve soya ürünleri.....	26
2.4.5 Fermente içecekler	27
2.4.6 Özel gıdalar	28
2.5 Gıdalardaki Biyojen Amin Miktarlarının Tespit Edilmesi.....	28
2.5.1 Analitik yöntemler	30
2.5.2 Moleküler yöntemler.....	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1 Materyal	34
3.1.1 Gıda örnekleri	34
3.1.2 Referans bakteriler	34
3.1.3 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar	34
3.2 Yöntem	36
3.2.1 Gıda örneklerinin analize hazırlanması ve enterokok suşlarının izolasyonu.36	
3.2.2 Enterokok izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal yolla ön tanımlamasının yapılması.....	36
3.2.2.1 Gram boyama	36
3.2.2.2 Katalaz testi	37
3.2.3 Enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktivitesinin belirlenmesi.37	

3.2.4 Biyojen amin üreticisi enterokok izolatlarının biyokimyasal tanımlamasının yapılması.....	39
3.2.4.1 Eskulin hidrolizi	39
3.2.4.2 pH 9,6'da gelişme	39
3.2.4.3 Tuz toleransının belirlenmesi.....	40
3.2.4.4 Sıcaklık toleransının belirlenmesi.....	41
3.2.4.5 Hemoliz testi	41
3.2.5 Bakterilerin stok kültürlerinin hazırlanması	41
3.2.6 Enterokok izolatlarının biyojen amin üretim miktarlarının HPLC metodu ile belirlenmesi	42
3.2.6.1 Biyojen amin standart çözeltilerinin hazırlanması	42
3.2.6.2 Mobil faz	43
3.2.6.3 Örneklerin ekstraksiyonu ve türevlendirilmesi.....	44
3.2.6.4 HPLC Analizi	45
3.2.7 <i>Enterococcus</i> suşlarının 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde moleküler tanısı.....	45
3.2.7.1 Genomik DNA izolasyonu	46
3.2.7.2 16S rDNA gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması	47
3.2.7.3 16S rDNA gen bölgelerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi	47
3.2.7.4 PZR ürünlerinin dizilenmesi.....	49
3.2.8 Aminoasit dekarboksilaz aktivitesinin moleküler olarak tanımlanması	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	51
4.1 Peynir Örneklerinden Muhtemel Enterokok Suşlarının İzolasyonu	51
4.2 Enterokok İzolatlarının Aminoasit Dekarboksilaz Aktivitesinin Belirlenmesi.	51
4.3 Biyojen Amin Üreticisi Enterokok İzolatlarının Biyokimyasal Tanımlamasının Yapılması.....	65
4.4 <i>Enterococcus</i> Suşları Tarafından Üretilen Biyojen Amin Miktarının HPLC Metodu ile Saptanması	73
4.5 Enterokok Suşlarının 16S rDNA Dizi Analizi ile Moleküler Düzeyde Tanımlanması.....	104
4.6 Enterokok Suşlarında Biyojen Amin Üretiminin Moleküler Doğası	108
5. SONUÇ	114
KAYNAKLAR	118
ÖZGEÇMİŞ.....	140

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
A	Alfa
Bç	Baz çifti
B	Beta
Dk	Dakika
γ	Gama
G	Gram
Gr (-)	Gram Negatif
Gr (+)	Gram Pozitif
G	Guanin
Kb	Kilobaz
Kg	Kilogram
L	Litre
Mg	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
Mm	Mikrometre
Mg	Miligram
mL	Mililitre
Mm	Milimetre
Ppm	Milyonda bir (parts per million)
M	Molar
Nm	Nanometre
-	Negatif
N	Normal
+	Pozitif
H	Saat
°C	Santigrad Derece
C	Sitozin
spp.	Species
T	Timin
UV	Ultraviyole
vd.	Ve diğerleri
~	Yaklaşık
%	Yüzde

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADI	Acceptable Daily Intake (Günlük Alınabilecek Miktar)
ATCC	American Type Culture Collection
AB	Avrupa Birliği

BLAST	Basic Local Alingment Search Tool
BAI	Biyojenik amin indeksi
DLLME	Dağıtıcı sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DAO	Diaminooksidaz
EFSA	European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
GC	Gaz kromatografisi (Gas Chromatography)
GRAS	Generally Regarded as Safe (İnsan ve Hayvan Tüketiminde Güvenilir)
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
HNMT	Histamin-N-metil transferaz
TLC	İnce tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography)
IEC	İyon değişim kromatografisi
RT-qPCR	Kantitatif gerçek zamanlı PCR
CE	Kapiler elektroforez
KOB	Koloni Oluşturma Birimi
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MAO	Monoaminooksidaz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OPA	o-ftaldialdehit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	Real Time PCR
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
VRE	Vancomycin Resistant Enterococci (Vankomisin dirençli enterokok)
CNBF	4-kloro-3,5-dinitrobenzotriflorür
AQC	6-aminokinolil-N-hidroksisüksinimidil karbamat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları	16
Şekil 3.1 Enterokok izolatlarının amino asit içeren dekarboksilaz broth besiyerindeki gelişimi	38
Şekil 3.2 Enterokok izolatlarının Bile Eskulin Azide Agar besiyerinde gelişimi.....	39
Şekil 3.3 Muhtemel enterokok izolatlarının broth ortamda gelişmesi	40
Şekil 4.1 BA17 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	75
Şekil 4.2 BA33 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	76
Şekil 4.3 BA46 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	77
Şekil 4.4 BA60 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	78
Şekil 4.5 BA71 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	79
Şekil 4.6 BA92 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	80
Şekil 4.7 BA125 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	81
Şekil 4.8 BA147 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	82
Şekil 4.9 BA184 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	83
Şekil 4.10 BA188 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	84
Şekil 4.11 BA206 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	85
Şekil 4.12 BA236 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	86
Şekil 4.13 BA251 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	87
Şekil 4.14 BA262 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	88
Şekil 4.15 BA271 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	89
Şekil 4.16 BA280 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	90
Şekil 4.17 BA298 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	91
Şekil 4.18 BA307 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	92
Şekil 4.19 BA310 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	93
Şekil 4.20 BA323 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	94
Şekil 4.21 BA334 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	95
Şekil 4.22 BA343 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	96
Şekil 4.23 BA362 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	97
Şekil 4.24 BA368 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	98
Şekil 4.25 BA388 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları	99

Şekil 4.26 <i>Enterococcus</i> suşlarının PZR ile çoğaltılan 16S rDNA fragmentleri	105
Şekil 4.27 Enterokok suşlarında histamin gen bölgesi.....	109
Şekil 4.28 Enterokok suşlarında tiramin gen bölgesi.....	110
Şekil 4.29 Enterokok suşlarında kadaverin gen bölgesi.....	111
Şekil 4.30 Enterokok suşlarında putresin gen bölgesi	112



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Enterococcus</i> spp.'nin taksonomisi	4
Çizelge 2.2 Biyojen aminlerin kimyasal özelliklere göre sınıflandırılması	14
Çizelge 2.3 Çeşitli fermente gıdalarda tespit edilen biyojen aminler ve konsantrasyonları	15
Çizelge 2.4 Prekürsör amino asitler ve biyojen amin çeşitleri	17
Çizelge 2.5 Otoriteler tarafından gıda ürünlerindeki biyojen aminler için belirlenen yasal limitler ve toksik seviyeler	29
Çizelge 2.6 Amino asit dekarboksilaz enzimlerini kodlayan farklı genlere özgü primerler	32
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar	35
Çizelge 3.2 HPLC analizi sırasında kullanılan kromatografik koşullar	45
Çizelge 3.3 Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan karışım	47
Çizelge 3.4 Biyojen amin gen bölgeleri	50
Çizelge 4.1 Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının amino asit dekarboksilaz aktiviteleri	52
Çizelge 4.2 Enterokok izolatları tarafından üretilen biyojen amin sayılarının kıyaslanması	63
Çizelge 4.3 Enterokok izolatlarının kısmi karakterizasyonu	66
Çizelge 4.4 HPLC analizine tabi tutulan biyojen amin üreticisi enterokok izolatları	74
Çizelge 4.5 HPLC analizi ile tespit edilen biyojen aminlerin konsantrasyonları	100
Çizelge 4.6 <i>Enterococcus</i> suşlarının 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre gerçekleştirilen tanısı	106
Çizelge 4.7 16S rDNA dizi analizleri sonucuna göre <i>Enterococcus</i> suşlarının tür düzeyinde dağılımı	107
Çizelge 4.8 Biyojen amin üretiminden sorumlu gen bölgeleri araştırılan enterokok suşları	108

1. GİRİŞ

Günümüzde gıda kaynaklı patojenlerden kaynaklanan birçok hastalık halk sağlığını ve gıda güvenliğini tehdit etmektedir. *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio paraheamolyticus* gibi birçok patojen, gıdalardan sıklıkla izole edilmekte ve insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* hem gıda hem de klinik kaynaklardan yaygın olarak izole edilen ve fırsatçı patojenler olarak bilinen *Enterococcus* suşlarıdır. Bu fırsatçı patojenler enterokokkal bakteriyemi, endokardit, idrar yolu enfeksiyonları ile yara enfeksiyonları gibi birçok hastalıktan sorumlu tutulmaktadır.

Enterococcus spp.'nin patojenitesinde sahip olduğu virülans faktörler başlıca rol oynamaktadır. Bununla birlikte *Enterococcus* spp.'nin biyojen amin ve biyofilm oluşturabilmeleri ve birçok antibiyotiğe karşı dirençli olmaları da halk sağlığını tehdit eden diğer unsurlardır. Tüm bu olumsuz özelliklerine rağmen bazı *Enterococcus* suşlarının bakteriyosin üretebildiği, bazı gıdalarda starter kültür olarak kullanıldığı ve bazı suşlarının da probiyotik nitelik taşıdığı bilinmektedir. Enterokok suşlarının sahip olduğu hem olumlu hem de olumsuz özellikler dikkate alındığında, bu suşların gıdalarda starter kültür olarak kullanımı ciddi endişeler yaratmaktadır. Bu doğrultuda *Enterococcus* suşlarının moleküler doğasının bilinmesi büyük önem taşımaktadır.

Aminoasitlerin karboksil kökünün dekarboksilaz enzim aktivitesiyle parçalanması sonucunda, söz konusu aminoasitin amini oluşmaktadır. Dekarboksilasyon olarak adlandırılan bu reaksiyonda dekarboksilaz enzimi aktif olarak rol oynamaktadır. Bu enzim hayvansal ve bitkisel dokularda doğal olarak bulunabildiği gibi, mikrobiyel faaliyet sonucunda da oluşabilmektedir. Mikrobiyel dekarboksilasyon reaksiyonları özellikle *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* suşları gibi laktik asit bakterileri (LAB) ile ilişkilendirilmektedirler. Peynir, balık, fermente içecekler, fermente et ürünleri, fermente sebze ve soya ürünlerinden sıklıkla izole edilen biyojen aminlerin insan sağlığı üzerinde birçok olumsuz etkisi bulunmaktadır. Biyojen aminlerin özellikle baş ağrısı, migren, hipo- ve hiper-tansiyon, bulantı ve kusma gibi semptomlarla ilişkili

olduğu bilinmektedir. Tiramin, histamin, kadaverin, putresin, triptamin, spermin ve spermidin, gıdalarla çoğunlukla ilişkilendirilen biyojen aminlere örnek olarak verilebilir. *Enterococcus* suşları ise başlıca tiramin, histamin, kadaverin ve putresin oluşumundan sorumlu tutulmaktadır. Gıdalarda bulunan biyojen amin miktarını saptayabilmek için birçok analitik ve moleküler yöntem geliştirilmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography: HPLC), gaz kromatografisi (Gas Chromatography: GC) ve ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography: TLC) gibi analitik yöntemler biyojen amin miktarının tespit edilmesinde kullanılırken; 16S rDNA dizi analizi, polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR) ve eş zamanlı PCR (Real Time PCR: RT-PCR) gibi moleküler yöntemler biyojen amin üretici suşlardaki gen bölgesinin tespit edilmesinde kullanılmaktadır.

Bu kapsamda planlanan doktora tezinde;

1. Ankara ve çevre illerdeki çeşitli market ve pazarlardan temin edilen, starter kültür kullanılmadan üretilen geleneksel peynirlerden muhtemel *Enterococcus* spp. izolasyonu ve biyokimyasal ön tanımlamasının yapılması,
2. Peynirlerden izole edilecek olan *Enterococcus* spp. suşlarının histamin, kadaverin, putresin ve tiramin üreticisi olup olmadığının tespit edilmesi,
3. Biyojen amin üreticisi olarak tanımlanan *Enterococcus* spp. suşlarının 16S rDNA dizi analizi ile moleküler olarak tanımlanması,
4. *Enterococcus* spp. suşlarının ürettikleri biyojen amin miktarlarının HPLC yöntemi ile tayin edilmesi,
5. *Enterococcus* spp. suşlarında biyojen amin üretiminden sorumlu gen bölgesinin saptanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Enterokoklar ve Genel Özellikleri

1899 yılında ilk defa Thiercelin tarafından tanımlanan *Enterococcus* terimi, bakterinin bağırsak kaynaklı olduğunu belirtmek amacıyla kullanılmıştır (Naruka vd. 2019). Enterokoklar önceleri streptokoklar içerisinde fekal orjinli bir grup olan fekal kaynaklı streptokoklar olarak sınıflandırılmıştır (Bera vd. 2019). Ancak 1933 yılında D grup antijene sahip fekal streptokokları sınıflandırmak amacıyla Lancefield tarafından bir serolojik tiplendirme ortaya atılmıştır. 1937 yılında ise streptokoklar Sherman tarafından enterokoklar, viridans streptokoklar, laktik streptokoklar ve piyojenik streptokoklar olarak dört grup altında sınıflandırılmıştır (Toğay ve Temiz 2011, Mahalleh 2017). 1906 yılında Andrewes ve Horder tarafından tanımlanan *Streptococcus faecalis*'in ve 1919 yılında Orla-Jensen tarafından tanımlanan *Str. faecium*'un diğer streptokoklardan farklı özellikleri olduğu fark edilmiştir (Yerlikaya ve Akbulut 2020). Bu nedenle 1984 yılında Schleifer ve Klipper-Baltz tarafından *Str. faecalis* ve *Str. faecium*'un *Enterococcus* genusu içerisinde değerlendirilmesi gerektiği öne sürülmüştür (Mahalleh 2017). Modern sınıflandırma yöntemlerinin gelişmesiyle streptokoklar daha sonra *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Lactococcus* olarak sınıflandırılmıştır (Toğay ve Temiz 2011, Taban vd. 2014).

Günümüzde gelişen teknolojiyle birlikte hücre yüzey protein profil analizi, DNA-DNA ve 16S rDNA hibridizasyon teknikleri gibi yöntemler sıklıkla uygulanmaya başlanmış ve yeni enterokok türlerinin tespit edilmesine katkıda bulunmuşlardır (Mahalleh 2017, Giraffa 2022). Geçmişten günümüze *Enterococcus* cinsinin taksonomisi sürekli olarak gelişmeye ve revizyona uğramaya devam etmektedir (Giraffa 2022). Günümüze kadar *Enterococcus* cinsine ait 79 tür ve 3 alt tür tanımlanmıştır (Çizelge 2.1) (Anonymous 2022).

Çizelge 2.1 *Enterococcus* spp.'nin taksonomisi

Türler		
<i>Enterococcus alcedinis</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>
<i>Enterococcus alishanensis</i>	<i>Enterococcus gilvus</i>	<i>Enterococcus ratti</i>
<i>Enterococcus aquimarinus</i>	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	<i>Enterococcus rattus</i>
<i>Enterococcus asini</i>	<i>Enterococcus hawaiiensis</i>	<i>Enterococcus rivorum</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Enterococcus hermanniensis</i>	<i>Enterococcus rotai</i>
<i>Enterococcus bovis</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>
<i>Enterococcus bulliens</i>	<i>Enterococcus hulanensis</i>	<i>Enterococcus saccharominimus</i>
<i>Enterococcus burkinafasensis</i>	<i>Enterococcus innesii</i>	<i>Enterococcus saigonensis</i>
<i>Enterococcus caccae</i>	<i>Enterococcus italicus</i>	<i>Enterococcus sanguinicola</i>
<i>Enterococcus camelliae</i>	<i>Enterococcus lacertideformis</i>	<i>Enterococcus seriolicida</i>
<i>Enterococcus canintestini</i>	<i>Enterococcus lactis</i>	<i>Enterococcus silesiacus</i>
<i>Enterococcus canis</i>	<i>Enterococcus lemanii</i>	<i>Enterococcus solitarius</i>
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterococcus malodoratus</i>	<i>Enterococcus songbeiensis</i>
<i>Enterococcus cecorum</i>	<i>Enterococcus massiliensis</i>	<i>Enterococcus sulfureus</i>
<i>Enterococcus coli</i>	<i>Enterococcus mediterraneensis</i>	<i>Enterococcus termitis</i>
<i>Enterococcus columbae</i>	<i>Enterococcus moraviensis</i>	<i>Enterococcus thailandicus</i>
<i>Enterococcus crotali</i>	<i>Enterococcus mundtii</i>	<i>Enterococcus timonensis</i>
<i>Enterococcus devriesei</i>	<i>Enterococcus nangangensis</i>	<i>Enterococcus timonensis</i>
<i>Enterococcus diestrammenae</i>	<i>Enterococcus olivae</i>	<i>Enterococcus ureasiticus</i>
<i>Enterococcus dispar</i>	<i>Enterococcus pallens</i>	<i>Enterococcus ureilyticus</i>
<i>Enterococcus dongliensis</i>	<i>Enterococcus pernyi</i>	<i>Enterococcus viikkiensis</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus phoeniculicola</i>	<i>Enterococcus villorum</i>
<i>Enterococcus eurekensis</i>	<i>Enterococcus pingfangensis</i>	<i>Enterococcus wangshanyuanii</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus plantarum</i>	<i>Enterococcus xiangfangensis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus porcinus</i>	<i>Enterococcus xinjiangensis</i>
<i>Enterococcus flavescens</i>	<i>Enterococcus pseudoavium</i>	
<i>Enterococcus florum</i>	<i>Enterococcus quebecensis</i>	
Alt türler		
<i>Enterococcus faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i>		
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> subsp. <i>saccharolyticus</i>		
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> subsp. <i>taiwanensis</i>		

Enterokoklar, insanların ve hayvanların gastrointestinal sisteminde yaygın olarak bulunan LAB üyesi suşlardır (Igbinsa ve Beshiru 2019, Hasanpour vd. 2021). Gram (+) özellik gösteren bu bakteriler aynı zamanda hareketsiz olup (*E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* dışında), şekilleri tekli, çiftli veya kısa zincirli oval kok morfolojisindedir (Giraffa 2022). Enterokoklar fakültatif anaerobik olup, katalaz (-) ve oksidaz (-) özellik göstermektedirler (Radovanovic vd. 2022). *Enterococcus* spp. genellikle 10-45°C sıcaklıkta gelişebilmekle birlikte, optimum gelişme sıcaklıkları 37°C'dir. Bununla birlikte pH 9,6'da, %40'a varan safra varlığında ve %6,5 NaCl varlığında gelişim gösterebilmektedirler (Sanlibaba vd. 2018, Giraffa 2022). Buna karşın *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. italicus* ve *E. cecorum* türlerinin %6,5 NaCl konsantrasyonunda iyi gelişemediği bildirilmektedir (Taban vd. 2014). Enterokoklar spor oluşturmeyan bakterilerden olup, gaz ve endospor da oluşturmazlar (Şentürk 2017).

Enterokoklar genellikle gıda, su, toprak ve işleme ekipmanları gibi ortamlarla ilişkilendirilmektedir (Erkmen 2022). Bununla birlikte, fermantasyon sırasında gelişebildikleri için birçok fermente gıdadan izole edilebilmektedirler (Giraffa 2022). Ayrıca geleneksel olarak çiğ ve/veya pastörize süttten üretilen çeşitli peynirlerde starter kültür olarak kullanılmaktadırlar. Farklı peynir türlerine olgunlaşma sırasında eklenen enterokok florası; peynirlerin tat, aroma, renk, doku ve duysal özelliklerini olumlu yönde etkilemektedir (Worsztynowicz vd. 2019, Slyvka vd. 2022). Özellikle Balkanlar'da ve Akdeniz ülkelerinde üretilen fermente sosis ve peynir gibi gıdaların organoleptik özelliklerine katkı sağladıkları bilinmektedir (Giraffa 2022).

Enterokokların gıdalarda sıklıkla bulunması, üretim sırasındaki olumsuz çevresel koşullarına karşı oluşturdıkları direnç ve bu koşullara karşı yüksek adaptasyonlarının bir sonucudur (Chajęcka-Wierzchowska vd. 2016). Bu özellikleri nedeniyle enterokoklar, su ve gıdalar için bir hijyen kalite göstergesi olarak kullanılabilmektedir (Boehm ve Sassoubre 2014).

E. faecium ve *E. faecalis* suşları, gıda ve çevresel örneklerden sıklıkla izole edilen ve üzerinde en fazla çalışılan *Enterococcus* suşlarıdır (Giraffa 2022). *E. faecalis*, *E.*

faecium, *E. hirae* ve *E. durans*'ın insan gastrointestinal sisteminden ve sığır, domuz, kümes hayvanları gibi çiftlik hayvanlarının bağırsaklarından sıklıkla izole edildiği bildirilmektedir (Fisher ve Phillips 2009). İnsan dışkıdaki *E. faecalis* sayısının 10^5 - 10^7 KOB/g, *E. faecium* sayısının ise 10^4 - 10^5 KOB/g olduğu rapor edilmiştir. *E. mundtii* ve *E. casseliflavus*'un ise bitki kaynaklarında yaygın olarak bulunduğu ve bitkisel kaynakları sulama suyu ve toprak gibi yollarla kontamine ettiği belirlenmiştir (Hasanpour vd. 2021, Calatrava 2022, Giraffa 2022).

Enterokoklar gelişebilmeleri için kompleks besiyeri ortamlarını talep etmektedirler (Bhardwaj 2019, Giraffa 2022). Enterokokların çoğu B grubu vitaminlere ve belirli esansiyel amino asitlere ihtiyaç duymaktadır (Abaelnaga vd. 2016). Homofermantatif özellik gösteren enterokoklar şeker metabolizmasının son ürünü olarak L (+) laktik asit üretmektedirler (Giraffa 2022). Enterokoklar laktik asit üretebilme yetenekleri sayesinde gıda endüstrisinde kullanım potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, enterokoklar *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Clostridium perfringens* gibi birçok gıda kaynaklı hastalığa neden olan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktiviteye sahip bakteriyosinleri üretebilmektedirler (Goh ve Philip 2015, Kumari vd. 2016, Yılmaz vd. 2016).

Enterokokların düşük ve yüksek sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonları gibi olumsuz çevre koşullarında hayatta kalabilme yetenekleri vardır (McAuley vd. 2015, Silva vd. 2015). Enterokokların çoğu pastörizasyon sıcaklıklarına ve donmaya karşı direnç göstermektedirler (Erkmen 2022). Ağır metal, yüksek ozmotik basınç ve radyasyon gibi olumsuz çevre koşullarına adapte olabilen enterokoklar; hayvansal gıdaların, su, toprak ve bitkilerin fekal kontaminasyonuna da neden olabilmektedirler (Igbiosa ve Beshiru 2019, Hasanpour vd. 2021).

2.2 Enterokokların Bazı Önemli Özellikleri ve Sağlık Üzerine Etkileri

LAB içerisindeki en tartışmalı gruplardan biri olan enterokoklar, çeşitli yararlı bakterileri içerdiği gibi, patojenleri ve kommensal bakterileri de içermektedir (Popović vd. 2019). Son ürünün standart kalitesini sağlamak amacıyla fermente süt ürünlerinin eldesinde bazı LAB üyeleri starter kültür olarak kullanılmaktadır. Özellikle peynir yapımında *Str. thermophilus*, *Lb. casei*, *Lactococcus lactis*, *Lb. helveticus* ve *Leu. mesenteroides* gibi LAB suşları, starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bazı LAB suşlarının biyojen amin üretebilme yeteneğine sahip olmasından dolayı, EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) gıda endüstrisinde kullanılacak olan starter kültürlerin biyojen amin üretme özelliğini içermemesini tavsiye etmiştir (BIOHAZ 2011, Linares vd. 2012). Bununla birlikte, biyojen aminleri parçalayabilen bakterileri içeren yardımcı kültürlerin süt ürünlerinde kullanılmasıyla gıdalardaki biyojen amin birikiminin azaltılmasını amaçlayan bir yaklaşım da bulunmaktadır (Naila vd. 2010, Alvares ve Moreno-Arribas 2014). Enterokokların bakteriyosin gibi antimikrobiyel ajanları da üretebildikleri ve probiyotik olarak da kullanılabilir oldukları bildirilmektedir. Buna karşın, enterokoklar gıdaların bozulmasıyla da ilişkilendirilebilmekte ve bu nedenle hijyen göstergesi olarak kullanılabilirler (Meier vd. 2018, Giraffa 2022).

Bazı *Enterococcus* spp. suşları ciddi hastane patojenleri olarak kabul edilmekte ve halk sağlığı açısından önemli bir risk olarak görülmektedir. Birçok antibiyotiğe özellikle de vankomisine dirençli genler taşımaları, patojenitelerinde önemli bir faktördür (Giraffa 2022). Septisemi, bakteriyemi, cerrahi ve yara enfeksiyonları, neonatal sepsis, endokardit ve idrar yolu enfeksiyonları gibi birçok hastane enfeksiyonundan sorumlu olan enterokoklar, bağışıklığı baskılanmış bireylerin yaşamını tehdit edebilmektedir (Yılmaz vd. 2016, Bhardwaj 2019). Son yıllarda enterokokların en yaygın hastane patojenlerinden biri haline geldiği ve %61'e varan yüksek ölüm oranlarına neden olduğu çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir. Bununla birlikte enterokokların yara ve idrar yolu enfeksiyonlarının ana etmeni olarak ikinci sırada, bakteriyemide ise üçüncü sırada yer aldığı rapor edilmiştir (Fisher ve Phillips 2009, van Schaik ve Willems 2010).

Hastane enfeksiyonlarından başlıca sorumlu olan enterokok suşları ise *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur. Fırsatçı patojen olarak kabul edilen *E. faecalis* ve *E. faecium*, *Enterococcus* spp'nin neden olduğu hastane enfeksiyonlarının sırasıyla yaklaşık %80 ve %5-20'si ile ilişkilidir (Abaelnaga vd. 2016). Bununla birlikte, *E. faecalis* endodontik enfeksiyonların %80-90'ından sorumludur. *E. faecalis* tıkanmış diş kökü kanallarından izole edilen tek *Enterococcus* suşu olma özelliği göstermektedir (Fisher ve Phillips 2009).

Enterococcus spp.'nin patojenitesinde kaygı uyandıran birçok faktör bulunmakla birlikte, çeşitli antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu dirençlilik fenotipi ön plana çıkmaktadır. Özellikle antimikrobiyel ajanlara karşı geliştirdikleri çoklu antibiyotik direnci nedeniyle enterokokların neden olduğu idrar yolu enfeksiyonları, safra kesesi enfeksiyonları, cerrahi yara enfeksiyonları, endokardit, bakteriyemi ve menenjit gibi ciddi nozokomiyal enfeksiyonların sayısında dünya çapında büyük bir artış görülmüştür. *Enterococcus* suşlarında tanımlanan virülans özellikler de patojenitede etkin olan bir diğer önemli özelliktir. Enterokoklardaki virülans özellikler genomda bulunan patojenite adaları ve plazmitlerde kodlanmakta olup; agregasyon faktörü (AF), enterokok yüzey proteini (*esp*), hiyalüronidaz (*hyl*), hemolizin ve jelatinaz önemli virülans özellikler arasında sayılmaktadır (Ben Braiek ve Smaoui 2019, Popović vd. 2019).

2.2.1 Antibiyotik dirençlilik

Enterokoklar günümüzde primer patojenler olarak değerlendirilmemektedirler ancak, antimikrobiyel ajanlara karşı yüksek direnç gösterme potansiyellerinden dolayı dünya çapında nozokomiyal patojenler olarak nitelendirilmektedirler (Bratkova vd. 2010, Camargo vd. 2014, Toğay vd. 2014, Bağcıgil vd. 2015, Sallem vd. 2016). Enterokokların birçok antibiyotiğe karşı doğal dirençlilik göstermeleri, çoğu antibiyotiğe karşı da kolaylıkla direnç kazanabilmeleri ve ekstrem çevre koşullarına adaptasyon potansiyellerinin yüksek olması bu suşların patojenitesini artırmaktadır (Yoğurtçu 2011, Abaelnaga vd. 2016).

Enterokoklar antibiyotiklere karşı doğal direnç, kazanılmış direnç ve çapraz direnç olmak üzere üç çeşit dirençlilik fenotipi gösterirler (Tatlı 2009, Sallem vd. 2016). Klinik uygulamalarda kullanılan pek çok antibiyotiğe karşı doğal ve kazanılmış direnç mekanizmaları gösteren enterokoklar; yarı sentetik penisilinlere, düşük düzeyde aminglikozitlere, linkozamitlere ve streptograminlere karşı ise doğal direnç gösterirler. Enterokoklar plazmitler, integronlar ve transpozanlar aracılığıyla birçok antibiyotiğe karşı direnç kazanabilmektedir (Frazzon vd. 2010, Garrido vd. 2014, Abauelnaga vd. 2016, Yılmaz vd. 2016, Reinseth vd. 2020, Wang vd. 2022).

Vankomisin başta olmak üzere birçok glikopeptid antibiyotik, enterokokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde uzun yıllar kullanılmıştır. Bu durum yıllar içinde vankomisine dirençli *Enterococcus* (Vancomycin Resistant Enterococci-VRE) suşlarının ortaya çıkmasına ve vankomisine direnç sıklığının artmasına neden olmuştur (Moosavian vd. 2018, Reinseth vd. 2020). Aynı zamanda bu antibiyotiklerin büyüme destekleyicisi olarak çiftlik hayvanları üzerinde kullanılması da *Enterococcus* spp. suşlarında antibiyotik dirençliliğinin gelişmesine neden olmuştur (Yılmaz vd. 2016).

Çevresel kaynaklardan ve gıdalardan izole edilen *Enterococcus* suşlarıyla klinik kaynaklı *Enterococcus* suşlarının çoklu antibiyotik dirençlilik düzeyleri karşılaştırıldığında, klinik kaynaklı suşların daha yüksek orana sahip olduğu bildirilmektedir (Abriouel vd. 2008). *E. faecalis* suşları klinik enfeksiyonlarla ilişkilendirilen en yaygın *Enterococcus* spp. türüdür. Antibiyotiklerin hayvan beslenmesinde gelişimi arttırıcı ajan olarak aşırı kullanımı, dirençli *E. faecium* suşlarının ortaya çıkmasında selektif ajan rolü taşımaktadır (Beganovic vd. 2018, Ruiz-Ripa vd. 2020). Hayvan besiciliğinde kullanılan bu antimikrobiyeller arasında bilinçsizce insan tedavisinde kullanılan antibiyotikler de yer almaktadır. Özellikle hayvansal kaynaklı gıdaların tüketilmesi sonucunda, antibiyotik dirençlilik durumunun insanlara aktarılabilmesi günümüzde halk sağlığını tehdit eden en önemli problem olarak görülmektedir (Fisher ve Phillips 2009, Abauelnaga vd. 2016, Lee vd. 2019, Biggel vd. 2021).

2.2.2 Virölans faktör

Enterokoklardaki virölans faktörler, genomlarında bulunan patojenite adaları denilen özel bölgelerde ve plazmitlerde kodlanan virölans genleri ile düzenlenir. *Enterococcus* suşlarında patojenite adaları ilk kez 1980 yılında nozokomiyal salgına neden olan *E. faecalis*'te tanımlanmıştır (Biswas vd. 2014, Chajęcka-Wierzchowska vd. 2016).

Hemolizin/sitolizin, jelatinaz, enterokokkal yüzey proteini, agregasyon faktörü, kapsül ve hücre duvarı polisakkaritleri, lipoteikoik asit, süperoksitler, serin proteaz, seks feromonları, hyaluronidaz, Efa A proteini (*E. faecalis* antijen A proteini), AS-48 ve antibiyotik dirençlilik enterokokların en önemli virölans faktörleridir (Klibi vd. 2015, Abauehnaga vd. 2016, Yılmaz vd. 2016).

Enterococcus spp.'nin virölansı sıklıkla aşağıda kısaca özetlenen maddelerle ilişkilendirilebilmektedir (Fisher ve Phillips 2009);

1. *Enterococcus* spp. suşlarının gastrointestinal sistemi kolonize edebilmesi,
2. Hücre dışı matris proteinlerine (laktoferrin, trombospondin, vitronektin vs.), ağız boşluğu epiteline, idrar yolu epiteline ve embriyo böbrek hücrelerine yapışabilmesi.

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının virölans özellikleri diğer *Enterococcus* spp. türleri ile kıyaslandığı zaman, bu iki suşun daha fazla virölansla ilgili gen taşıdığı saptanmıştır (Han vd. 2011, Chajęcka-Wierzchowska vd. 2016).

2.2.3 Probiyotik özellik

Probiyotikler, canlı olarak vücuda yeterli miktarda alındığında bağırsaklardaki mikrobiyel florayı koruyup dengeleyen, insan ve hayvan sağlığını olumlu şekilde etkileyen yararlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Probiyotikler sahip

oldukları antimikrobiyel ve antogonistik aktivite sayesinde sağlık üzerinde birçok iyileştirici etkiye sahiptir (Toğay 2010, Taban vd. 2014, Ben Braiek ve Smaoui 2019, Giraffa 2022). Bunlar;

1. Gastrointestinal enfeksiyonları kontrol altında tutmakta,
2. Antibiyotik kaynaklı ishalleri önlemekte,
3. Serum kolesterol düzeyi ile kan basıncının düşmesini sağlamakta,
4. Antimutajenik ve antikanserojenik aktiviteleri sayesinde bağışıklık sistemini düzenleyici etki göstermekte,
5. Anti-alerjik özelliklerinin yanı sıra metal detoksifikasyonu ile kalsiyum, çinko, demir, manganez, bakır ve fosfor gibi mineral ve iz elementlerin biyoyararlanımını arttırmakta,
6. Proteinlerin sindirimini kolaylaştırmakta.

Günümüzde bazı bilim adamları enterokokların gıda ürünlerinde probiyotik olarak kullanılması konusunda yoğun eleştirilerde bulunmasına rağmen, bazı enterokok türleri insan ve hayvanların bağırsak florasındaki mikrobiyel dengeyi sağlamak amacıyla gıdalarda starter kültür olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *E. faecium* ve *E. faecalis*, *Enterococcus* cinsi içinde gıda endüstrisinde probiyotik amaçlı kullanılan en önemli iki türdür (Karabıyık 2011, Akgül 2014, Uludağ 2015). *E. faecium* insanların tüketimi için formülize edilen gıdalarda probiyotik kültür olarak kullanılırken, hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* suşları hayvanlar için kullanılmaktadır. Özellikle *E. faecium* türlerinin hayvanların gelişimine ve hastalıklara karşı dirençlilik kazanmasına katkısından dolayı, hayvan yemi üretiminde probiyotik olarak kullanımı yaygındır (Moreno vd. 2006, Slyvka vd. 2022). Hatta hayvanların beslenmesinde antibiyotik kullanımı yerine *E. faecium* suşu kullanımı alternatif yöntem olarak gösterilmektedir (Iseppi vd. 2015). *E. faecium* WEFA23 suşu safra tuzu hidrolaz aktivitesine sahip olması ve kolesterolü düşürebilme özelliği göstermesi bakımından probiyotik özellikler gösterdiği rapor edilmiştir (Giraffa 2022). *E. faecium* SF-68 ve *E. faecium* M74 gibi bazı enterokok suşlarının güvenli olduğu kanıtlanmış ve çeşitli probiyotik preparatlara ilave edilmiştir. *E. mundtii* ST4SA suşunun ise potansiyel probiyotik suş olabileceği bildirilmiştir (Ben Braiek ve Smaoui 2019). Buna karşın, enterokokların hem probiyotik hem fırsatçı patojen özellik göstermesi, enterokokların probiyotik kültür olarak

kullanımı konusunda daha dikkatli olunması gerekliliğini hatırlatmaktadır (Giraffa 2022).

2.2.4 Bakteriyosin üretimi

Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen antimikrobiyel peptit veya proteinler olup, yakın akraba cinslere karşı bakteriyostatik veya bakteriyosidal etki göstermektedirler (Dişçioğlu 2014, Yüksel vd. 2015, Heilbronner vd. 2021). Hücrede prepeptit olarak oluşan bakteriyosinler, hücreden dışarı aktarılma sırasında olgunlaşmaktadır. Bakteriyosinlerin üretiminden bağışıklık geni, ABC bağışıklığı geni, prepeptidi kodlayan yapısal gen ve bakteriyosinin dışarı aktarılması için gerekli olan proteinin kodlayan gen olmak üzere başlıca dört gen sorumludur (Mokoena 2017, Beis ve Rebuffat 2019).

Enterococcus spp. tarafından üretilen bakteriyosinler; Sınıf II bakteriyosinler grubunun bir üyesidir. Enterokokların ürettikleri bakteriyosinler enterosin olarak adlandırılmakta ve genellikle güçlü antilisteriyal etkiye sahip lantibiyotik olmayan, küçük ve ısı stabil bakteriyosinler grubunda yer almaktadır. Bakteriyosin üreten enterokoklar süt ürünleri, fermente sucuklar, balık ve sebzelerden sıklıkla izole edilebilmekle beraber, doğada yaygın olarak bulunmaktadır (Moreno vd. 2006, Yüksel vd. 2015). *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları tarafından üretilen enterosinlerin en bilinenleri arasında Enterosin A, Enterosin B, Enterosin P, Enterosin 50, Bakteriyosin 31 ve AS-48 sitolisin'dir. Enterosinler *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. botulinum*, *C. perfringens* ve *Vibrio cholerae* gibi patojen türlere karşı antibakteriyel aktivite göstermektedirler (Oladipo vd. 2014, Avcı 2015).

2.2.5 Biyofilm oluşturma

Biyofilm, hücre dışı polimerik madde içerisinde organize olmuş mikroorganizma topluluklarının oluşturduğu bir yapıdır. Bu topluluklar tek bir mikroorganizma türünden oluşabileceği gibi farklı tür mikroorganizmalardan da meydana gelebilmektedir. Biyofilm yapısı sayesinde mikroorganizmalar konak bağışıklığı, antimikrobiyel maruziyeti, çevresel stres (pH değişikliği, besin yetersizliği vb.) gibi olumsuz  evre koşullarından korunabilmektedir (Singh vd. 2007, Shikongo-Nambabi vd. 2012, Chahales ve Thanassi 2020). Enterokoklar tarafından üretilen biyofilm yapısının da enterokokların patojenitesinde oldukça önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Biyofilm  retimi ile dezenfektanlara karşı dirençli hale gelen enterokoklar, gıda sektöründe önemli bir risk oluşturmaktadır (Shikongo-Nambabi vd. 2012, Chaj cka-Wierzchowska vd. 2016).

2.3 Biyojen Aminler ve Genel  zellikleri

Biyojen aminler bazik özellik gösteren azotlu bileşikler olup, çeşitli metabolik faaliyetler sonucunda oluşabilmektedir. Biyojen aminler genellikle düşük molekül ağırlığına sahip bileşiklerdir (Mohedano vd. 2015, Ord  ez vd. 2017). Biyojen aminler, dekarboksilasyon olarak tanımlanan amino asitlerin karboksil grubunda görülen parçalanma ile meydana gelebilmekte ve böylelikle ilgili amino asitin amini oluşmaktadır. Dekarboksilasyon mekanizmasını dekarboksilaz enzimi katalizlemektedir (Nu ez vd. 2016, Jain ve Verma 2018). Dekarboksilaz enzimi bitkisel ve hayvansal dokularda bulunabilmekle birlikte mikroorganizmalar tarafından da  retilenilmektedir. Mikrobiyel faaliyetler sonucu meydana gelen biyojen aminlere gıdalarda sıklıkla rastlanmaktadır (Aktop ve şanlıbaba 2018).

Biyojen amin oluşum mekanizmaları; i) serbest metabolizma ürünlerinin aminleşmesi, ii) amino asitlerin sekonder dönüşümü ve iii) azotlu parçalanma ürünlerinin hidrolize olmasıdır (Chong vd. 2011). Kararlı yapıdaki biyojen aminlerin ısıl işlem gibi

uygulamalarla degrade edilebilmeleri oldukça zordur (Saaid vd. 2010). Bu nedenle gıdaların işlenmesi veya depolanması gibi aşamalarda biyojen amin miktarı bir bozulma belirteci veya kalite kriteri olarak kullanılabilir (Ruiz-Capillas ve Herrero 2019).

Biyojen aminler çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılabilir. İçerdikleri azot sayılarına göre monoaminler, diaminler ve poliaminler olarak sınıflandırılabilirken, kimyasal özelliklerine göre ise alifatik, aromatik, uçucu ve heterosiklik olarak sınıflandırılabilir (Peña-Gallego vd. 2012, Jain ve Verma 2018). Çizelge 2.2.'de kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılan biyojen amin çeşitleri verilmiştir (Peña-Gallego vd. 2012).

Çizelge 2.2 Biyojen aminlerin kimyasal özelliklere göre sınıflandırılması

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

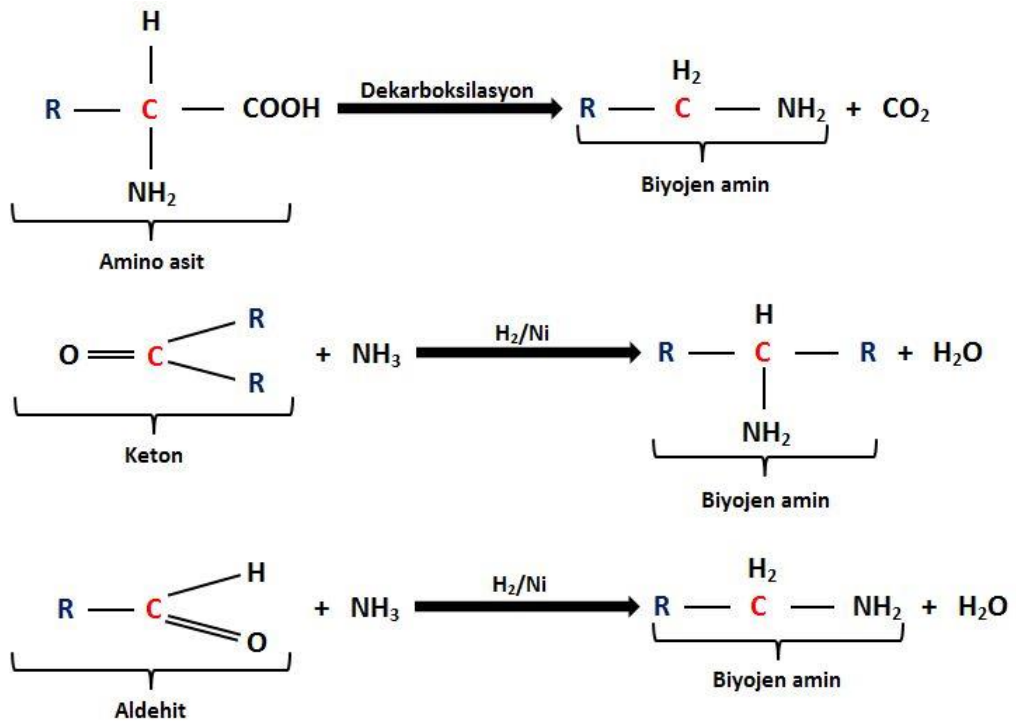
Tiramin, histamin, kadaverin, putresin, spermin, spermidin, triptamin, agmatin, etilamin ve metilamin gibi biyojen aminlerin gıdalarda sıklıkla bulunduğu çeşitli araştırmalarda saptanmıştır (Munir vd. 2020, Wójcik vd. 2021, Suzzi vd. 2022). Bu biyojen aminler başta fermente gıdalar olmak üzere proteince zengin gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Biyojen amin oluşma riski açısından peynir, şarap, fermente sosis ve bira gibi fermente gıdalar dikkat çekmektedir (Behera vd. 2021, Huang vd. 2021, Meng vd. 2022). Çizelge 2.3'de çeşitli fermente gıdalarda tespit edilen biyojen aminler ve konsantrasyonları verilmiştir.

Çizelge 2.3 Çeşitli fermente gıdalarda tespit edilen biyojen aminler ve konsantrasyonları

Gıda	Tespit Edilen Biyojen Amin	Tespit Edilen Konsantrasyon	Kaynakça
Otlu peynir (Türkiye)	Kadaverin	maks. 1844,5 mg/kg	Andiç vd. 2010
Kefir	Kadaverin, spermidin ve putresin	0,3-12,1 mg/L	Özdestan ve Üren 2010
Cabrales (İtalya)	Tiramin	maks. 2519,98 mg/kg	Restuccia vd. 2011
Salam	Putresin ve tiramin	maks. 77,14 mg/kg	Mayr and Schieberle 2012
Fermente sosis	Putresin, histamin ve kadaverin	maks. 689,89 mg/kg	Papavergou vd. 2012
Salam	Agmatin ve spermin	maks. 8,3 mg/kg	Palermo vd. 2013
Geleneksel Çin Sichuan-Style sosisleri	Histamin tiramin	114,33-327,35 mg/kg 88,84-285,89 mg/kg	Sun vd. 2016
Üzüm suyu ve şarap	Histamin, tiramin, putresin ve kadaverin	1.8-36.8 µg/L	Cunha vd. 2017
Şarap	Histamin, tiramin, putresin, kadaverin, spermin, spermidin, agmatin, triptamin	3,6-83 µg/L	Nalazek-Rudnicka ve Wasik 2017
Peynir, fermente soya ürünü ve balık eti	Histamin, kadaverin, putresin, tiramin ve triptamin	10-210 µg/kg	Ishimaru vd. 2019
Peynir	Histamin, tiramin ve triptamin	50 – 100 µg/kg	Gama ve Rocha 2020
Soy sosu	Histamin, putresin, Spermidin, Tiramin	20-60 µg/kg	Hao ve Sun 2020
Şarap	Histamin, kadaverin, putresin, tiramin ve triptamin	1-50 µg/L	Liu vd. 2020
Bira	Histamin, kadaverin, Feniletilamin, tiramin, spermin, spermidin,	130-520 µg/L	Lorencová vd. 2020
Fermente inek sütü	Tiramin Spermidin	249.6 mg/L 82.9 mg/L	Suzzi vd. 2022

2.3.1 Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları

Biyojen aminlerin oluşumunda başlıca iki mekanizma rol oynamaktadır. Birinci mekanizmada, dekarboksilaz enzimi sayesinde amino asitlerin dekarboksilasyonu sağlanmaktadır. İkinci mekanizmada ise aldehit ve ketonların aminasyonu ve transaminasyonu gerçekleşmektedir (Peña-Gallego vd. 2012, Stojanović ve Kos 2020). Şekil 2.1.'de biyojen amin oluşma mekanizmaları kısaca özetlenmiştir.



Şekil 2.1 Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları (Santos 1996)

Biyojen aminler dekarboksilaz enziminin parçaladığı prekürsör amino aside göre isimlendirilmektedirler. Çizelge 2.3'te prekürsör amino asitler ve biyojen amin çeşitleri verilmiştir (Biji vd. 2016, Özogul ve Özogul 2019).

Çizelge 2.4 Prekürsör amino asitler ve biyojen amin çeşitleri

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

2.3.2 Biyojen aminlerin sağlık üzerine etkileri

Gıdalar aracılığıyla vücuda alınan yüksek konsantrasyonlardaki biyojen aminler, ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Tüketilmeleri durumunda bağırsaklar tarafından absorbe edilen bu bileşikler, bağırsak mikroflorası tarafından inaktive edilebilmekte, ancak sistemik dolaşıma geçememektedirler (Aktop ve Şanlıbaba 2018). Mikroorganizmaların inaktive edemediği biyojen aminler ise absorbe edilmekte ve bağırsaklarda metabolize edilmektedir. Katabolizma mekanizması sınırlandırılmış veya kusurlu genetiğe sahip olan kişilerde, daha ciddi semptomlara rastlanmaktadır. Buna karşın düşük konsantrasyonları herhangi bir sağlık tehlikesi oluşturmamaktadır (Pradenas vd. 2016).

Biyojen aminlerin neden olduğu semptomlar ciddiyetine göre sınıflandırılabilir. Buna göre biyojen aminler çeşitli reaksiyonlara, intoleranslara veya zehirlenmelere neden olabilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda vücuda alınan biyojen aminlerin mide bulantısı, baş ağrısı, hipo- veya hiper-tansiyonu gibi rahatsızlıkların yanı sıra cilt alerjisi gibi semptomlara da neden olduğu bildirilmektedir (Stojanović ve Kos 2020, Vinci vd. 2021).

Biyojen aminler, sindirim sisteminde bulunan bazı enzimlerin aracılık etmesiyle detoksifiye edilebilmektedir. Bu enzimler arasında diaminooksidaz (DAO), histamin-N-metil transferaz (HNMT) ve monoaminooksidaz (MAO) bulunmaktadır (Munir vd. 2020). MAO inhibitörlerinin hasar gördüğü veya çalışmadığı durumlarda vücutta biyojen amin birikimi gerçekleşmektedir.

Vücutta birikerek zehirlenmelere neden olan ve en sık karşılaşılan biyojen aminlerden birisi ise histamindir. Prekürsör amino asit olan histidinin dekarboksilasyonu sonucu oluşan histamin, güçlü bir biyoaktiviteye sahip bir bileşiktir. Histamin başta balık olmak üzere çeşitli su ürünleriyle ve fermente gıdalarla sıklıkla ilişkilendirilmektedir (Gardini vd. 2016, Moreno-Arribas vd. 2022). Histaminin yüksek konsantrasyonlarda vücuda alınması ile solunum sıkıntıları, baş ağrısı, ateş, kusma ve sindirimle ilgili bazı rahatsızlıklar ortaya çıkabilmektedir. Bununla birlikte histaminin kaşıntı ve kızarıklık gibi cilt rahatsızlıklarına da neden olduğu bildirilmektedir (Durak-Dados vd. 2020, Zhao vd. 2022). Histamin için limit değer 10 mg'dır. Ancak 5-10 mg histamin tüketiminin hassas bireyleri etkileyebildiği bildirilmektedir. Ayrıca 100 mg histamin alımının orta düzeyde, 1000 mg histamin alımının ise yüksek düzeyde toksik etkiye neden olduğu kabul edilmektedir (Dong ve Xiao 2017).

Gıdalar aracılığıyla vücuda alınan ve vücutta birikerek zehirlenmelere neden olan başka bir diğer biyojen amin ise tiramindir. Tiraminin sıklıkla migrenle ilişkilendirildiği bilinmektedir. Bununla birlikte baş ağrısı, mide bulantısı, kusma, hedef organ hasarı ve intraserebral kanama gibi semptomlara neden olabilmektedirler. Yüksek konsantrasyonlarda vücuda alınan tiramin, arteryel kan basıncını arttırmaktadır. Bu durum kalp atış hızını arttırmakta ve hipertansif krize yol açabilmektedir (Özogul ve Özogul 2019, Rafehi vd. 2019). MAO'nun inhibe edildiği durumlarda, kan basıncının artması açısından 8 mg tiraminin yeterli olduğu belirlenmiştir (Stahl ve Felker 2008). Buna karşın, 400 mg doza kadar ki tiraminin hipertansif krizlere neden olmadan tüketilebileceği bildirilmektedir. Tiramin için bildirilen akut toksisite değerinin ise 2000 ppm'den fazla olduğu bulunmuştur (Ahmed 2019, Sanlier ve Bektesoglu 2021).

Toksik etkileri olduğu bilinen ve gıdalarda sıklıkla tespit edilen putresin ve kadaverinin, histamin ve tiramin gibi biyojen aminlerin toksik etkilerini arttırabilen nitelikte olduğu belirlenmiştir. Kadaverin ve putresinin bu özelliği detoksifiye edici enzimleri inhibe edebilmeleriyle açıklanabilmektedir (Dong ve Xiao 2017). Bununla birlikte, nitritle reaksiyona giren kadaverin ve putresin oldukça toksik etkiye sahip nitrosaminleri oluşturabilmektedir (Kim vd. 2009). Kadaverin için bildirilen akut toksisite değerin 2000 ppm'den fazla olduğu saptanmıştır (Ahmed 2019).

Toksik etkilerine rağmen birçok biyojen aminin insan ve hayvan fizyolojisinde önemli rolü bulunmaktadır. Feniletilamin türevleri (adrenalin, dopamin vs.) fizyolojik fonksiyonlarda görev alan biyojen aminlere örnek verilebilir. Bu biyojen aminler sinir sistemi ve düz kaslar üzerinde etkili olmalarının yanı sıra kan dolaşımının düzenlenmesinde de rol oynamaktadırlar (Aktop ve Şanlıbaba 2018). Bitkilerdeki çiçek açma ve meyve oluşumu gibi olaylarda spermin, spermidin ve putresinin rol oynadığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu biyojen aminler DNA ve RNA stabilitesinin sağlanması, hücre farklılaşması ve proliferasyonu, nükleik asit fonksiyonlarının düzenlenmesi ve hücre döngüsü regülasyonu gibi hücresel olaylarda görev almaktadır (Setia ve Setia 2018, Luengo ve Olivera 2020).

Gıdalarda sıklıkla bulunmalarına ve birçok toksik etkiye neden olmalarına rağmen, biyojen amin konsantrasyonları için ortak bir uluslararası düzenleme ile limit değerler belirlenmemiştir. Buna karşın sadece balıkçılık ürünleri için bir yasal düzenleme yapılmıştır. Avrupa Birliği (AB) tarafından oluşturulan ve limit histamin seviyelerinin belirlendiği bu düzenleme, balıkçılık ürünlerindeki limit değerin aşılp aşılmadığını kontrol etmeyi amaçlamaktadır (Papageorgiou vd. 2018). Bazı ülkelerde şarap için limit histamin seviyeleri belirlenmiştir. Örnek olarak Almanya'da 2 mg/L, Belçika'da 5-6 mg/L ve Fransa'da 8 mg/L olarak belirlenen histamin konsantrasyonları örnek olarak gösterilebilir (Costantini vd. 2019).

2.4 Gıdalarda Bulunan Mikrobiyel Kaynaklı Biyojen Aminler

Gıdalarda bulunan biyojen aminlerin oluşma mekanizmalarından biri, amino asitlerin mikroorganizmaların tarafından dekarboksilasyonudur (Wójcik vd. 2021). Bu mekanizmayı ortamda serbest amino asitlerin bulunması ve ayrıca dekarboksilaz aktivitesine sahip mikroorganizmaların ortamdaki bulunma düzeyi etkilemektedir. Bununla birlikte, mikroorganizmaların gelişimi için uygun çevre koşullarının bulunması ve mikroorganizmalar arasındaki sinerjistik etki de gıdalardaki biyojen amin oluşum mekanizmasını etkileyebilmektedir (Gardini vd. 2016).

Süt ürünleri, su ürünleri, fermente sebzeler, et ürünleri ve fermente içkilerde mikrobiyel faaliyetler sonucu oluşan biyojen aminlere sıklıkla rastlanılmaktadır (Benkerroum 2016, Doeun vd. 2017). Gıda ortamında fermente olabilen glikoz gibi karbonhidratların bulunması, bakterilerin gelişmesini teşvik etmektedir. Glikozun fermente olmasıyla oluşan laktik asit ortamda birikmekte ve ortam pH'sını düşürmektedir. Bu durum dekarboksilaz aktivitesinin artmasına ve dolayısıyla da biyojen amin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Aktop ve Şanlıbaba 2018). Glikoz konsantrasyonunun %0,5-2,0 düzeyinde olması biyojen amin oluşumu için bir optimal koşuldur. Buna karşın %3,0 düzeyindeki konsantrasyonun dekarboksilaz aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etkisi vardır (Miclotte 2016).

Dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip birçok bakteri türü bulunmakla birlikte, bu aktivite bakterilerin tümünde yaygın olarak gözlenmemektedir. Bu enzime sahip bazı bakteriler arasında *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* ve *Shigella* gibi bakteri türleri yer almaktadır. Bununla birlikte, LAB üyesi bazı bakteriler de sıklıkla biyojen amin oluşumuyla ilişkilendirilmektedir. Örneğin *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* gibi bazı LAB üyelerinin birden fazla amino asidi dekarboksile edebilme yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır (Özogul ve Hamed 2018, Čuboň vd. 2019, Luengo ve Olivera 2020). LAB türlerinden bazılarının özellikle tiramin üretiminden sorumlu olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte,

kadaverin, putresin ve 2-feniletilamin gibi biyojen aminlerin *Micrococcaceae* familyası üyelerince üretilbildiği belirlenmiştir. Doğal olarak gıdaların mikroflorasında bulunabilen bu dekarboksilaz pozitif bakteriler, kontaminasyon yoluyla gıdalara sonradan da bulaşabilmektedir (Akyol vd. 2015).

Mikroorganizmaların dekarboksilaz aktivitesini dolayısıyla da biyojen amin üretimini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonu bu faktörlerden bazılarıdır. Bununla birlikte ortamda starter kültürlerin bulunması da dekarboksilaz aktivitesini etkilemektedir (Doeun vd. 2017, Durak-Dados vd. 2020). pH 4,0'ın altındaki değerlerde dekarboksilaz pozitif bakterilerin gelişimi sınırlandığından, biyojen amin üretme yetenekleri de buna bağlı olarak sınırlanmaktadır (Yeğin ve Üren 2008). Bakterilerin biyojen amin üretebilmeleri için gerekli olan ortam sıcaklığı bakteri türüne göre değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin 10°C'de biyojen amin üretme yeteneği olmayan *Enterobacter cloacae*'nin, 20°C'de putresin üretebildiği tespit edilmiştir. Özellikle peynir ve balık üreten işletmeler için sıcaklık biyojen amin üretiminde önemli bir etken olarak görülmektedir (Gardini vd. 2016). Biyojen amin üretimi için önemli olan başka bir faktör ise tuz konsantrasyonudur. Yüksek tuz konsantrasyonları birçok bakterinin gelişimini ve bununla bağlantılı olarak biyojen amin üretimini baskılayabilmektedir. Örneğin %10'luk NaCl konsantrasyonunun *Carnobacterium divergens* tarafından üretilen tiramini inhibe ettiği belirlenmiştir (Masson vd. 1996). Ayrıca %5'in üzerindeki tuz konsantrasyonlarının üretilen histamin miktarında azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (Moniente vd. 2021). Buna karşın yüksek konsantrasyonlardaki tuzu tolere edebilmeleri nedeniyle halotolerant bakteriler için biyojen amin üretiminde tuz konsantrasyonunun önemli bir rolü bulunmamaktadır. Halotolerant bakterilerin sardalyada %12'lik NaCl konsantrasyonunda bile biyojen amin üretebildiği belirlenmiştir (Shalaby 1996).

2.4.1 Süt ve ürünleri

Süt ve ürünleri, biyojen amin oluşumunun en yaygın olarak bildirildiği gıda ürünlerinden birisidir. Bu ürünlerdeki biyojen amin üretimi hem fermentasyon hem de

olgunlaştırma sırasında meydana gelebilmektedir. Süt ürünlerinde biyojen amin oluşumundan başlıca LAB, maya ve küf gibi mikroorganizmalar sorumludur. Süt ürünlerinde başlıca biyojen amin üreticilerinin *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* türleri olduğu bildirilmektedir (Papageorgiou vd. 2018). *Lb. buchneri* ve *Lb. curvatus* histamin üreticisi türler olarak bilinirken; *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus*, *Lc. lactis* ve *Leu. mesenteroides* ise tiramin üreticisi LAB türleridir (Fernández vd. 2007, Coton vd. 2018).

Ev yapımı yoğurt üzerinde yapılan çalışmada 1-50 mg/L seviyelerindeki histaminin *Strep. thermophilus* tarafından üretildiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *Strep. thermophilus*'un tiramin üreticisi olduğu da belirlenmiştir (Gezginc vd. 2013). Vieira vd. (2020) tarafından probiyotik yoğurtlar üzerinde yapılan bir çalışmada tespit edilen biyojen amin konsantrasyonlarının kadaverin için 2,63-13,22 mg/L, spermin için 1,61-6,34 mg/L ve tiramin için 6,78-22,82 mg/L seviyelerinde olduğu bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise fermente inek sütündeki histamin konsantrasyonu 17,97 mg/kg, putresin konsantrasyonu 20,26 mg/kg, kadaverin konsantrasyonu 29,09 mg/kg, spermidin konsantrasyonu 82,07 mg/kg ve tiramin konsantrasyonu 249,55 mg/kg olarak belirlenmiştir (Costa vd. 2015). Kefirde ise putresin, tiramin, kadaverin, histamin ve spermidinin bulunduğu ve kefir örneklerinde tespit edilen toplam biyojen amin konsantrasyonunun 2,4-35,2 mg/L olduğu rapor edilmiştir (Özdestan ve Üren 2010).

2.4.1.1 Peynir

Peynir, biyojen amin oluşumu açısından üzerinde en fazla çalışma yapılan süt ürünlerinden biridir. Peynirde biyojen amin üretiminden başlıca Gram (+) bakteriler sorumludur. Bununla birlikte, peynirde mikroorganizmalar tarafından üretilen biyojen aminler sıklıkla tiramin ile ilişkilendirilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda tiramin içeren peynirin tüketilmesi “peynir reaksiyonu” adı verilen önemli bir reaksiyona neden olmaktadır (Şanlı ve Şenel 2015, de la Torre ve Conte-Junior 2018).

Çeşitli peynirlerden sıklıkla izole edilen *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans*'ın başlıca güçlü tiramin üreticileri olduğu kabul edilmektedir. Vücuda alınan 125 mg/kg ve üzerindeki tiramin miktarlarının, insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu bildirilmektedir (Fernández vd. 2007, Andiç vd. 2010). Tiraminin yanı sıra kadaverin, histamin, putresin, triptamin ve feniletilamin gibi biyojen aminlerin de peynirlerden izole edildiği bilinmektedir (Mayer ve Fiechter 2018, Gama ve Rocha 2020, Ramos vd. 2020). Yapılan çalışmalarda, çeşitli peynirlerde en yaygın olarak üretilen biyojen aminin kadaverin olduğu rapor edilmiştir (Restuccia vd. 2011, Mayr ve Schieberle 2012, Palermo vd. 2013). Otlu peynirler üzerinde yapılan bir çalışmada tespit edilen kadaverin konsantrasyonunun 1844,5 mg/kg ile yüksek bir değere ulaştığı saptanmıştır (Andiç vd. 2010). Yedi farklı peynir türünde yapılan başka bir çalışmada ise kadaverin konsantrasyonunun 2-748,2 mg/kg olduğu rapor edilmiştir (Mayr ve Schieberle 2012). Ramos vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada Gouda peynirindeki putresin konsantrasyonunun $7,1 \pm 1,3$ mg/kg, kadaverin konsantrasyonunun $3,4 \pm 1,0$ mg/kg ve tiramin konsantrasyonunun $24,7 \pm 1,3$ mg/kg olduğunu tespit etmiştir. Başka bir çalışmada, peynir örneklerinin %79'unda histaminin tespit edildiği ve maksimum histamin konsantrasyonunun 116 mg/100 g seviyesinde olduğu belirlenmiştir (Mayer ve Fiechter 2018). Herrero-Fresno vd. (2012), Emmental peynirinden izole ettikleri *Lb. casei* suşu tarafından tiramin ve histamin üretildiğini ve biyojen amin konsantrasyonlarının tiramin için $14,92 \pm 2,60$ mg/kg ve histamin için $42,86 \pm 0,32$ mg/kg olduğunu tespit etmişlerdir.

Peynirde üretilen biyojen amin miktarları bazı faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Peynir türü, peynirin üretim yöntemi, olgunlaştırma aşamasında ortama katılan mikroorganizmalar, olgunlaştırma ve depolama süreleri, dekarboksilaz aktivitesini etkileyen faktörlerden bazılarıdır (Papageorgiou vd. 2018). Olgunlaştırma aşaması genellikle peynirlerdeki biyojen amin miktarını arttıran bir süreçtir. Bununla birlikte, sert yapıdaki peynirlerin yumuşak veya yarı sert yapıdaki peynirlere kıyasla daha çok biyojen amin içerdiği tespit edilmiştir (Botello-Morte vd. 2022). Ayrıca pastörize sütle yapılan peynirlerde biyojen amin üretiminin kısıtlandığı bildirilmektedir (Alvarez ve Moreno-Arribas 2014).

Dekarboksilasyon aktivitesine sahip bakterilerin kaynağı starter kültürler olabileceği gibi, peynire çiğ süt aracılığıyla veya işleme ve olgunlaşma aşamalarındaki kontaminasyon ile de bulaşabilmektedir (O’Sullivan vd. 2015).

2.4.2 Et ve ürünleri

Et ve ürünleri biyojen aminlerin en fazla bulunduğu gıda gruplarından biridir. *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella* ve *Citrobacter* gibi bakterilerin et ve ürünlerdeki biyojen amin üretiminden sorumlu olduğu bildirilmektedir. Çiğ etlerdeki bu bakteriler sıklıkla histamin, tiramin, kadaverin ve putresin oluşumuyla ilişkilendirilmektedir (Schirone vd. 2022). Bununla birlikte, taze ette spermin ve spermidin oluşumunun önemli miktarlarda olduğu saptanmıştır (Papageorgiou vd. 2018).

Biyojen amin oluşumu pH değerlerinin farklılığından dolayı kırmızı ve beyaz etlerde farklılık göstermektedir. Farklı etlerin biyojen amin indeksinin (BAI) karşılaştırıldığı bir çalışmada tavuk etinin kalitesinin en kötü, sığır etinin ise çalışma boyunca kalitesi kabul edilebilir düzeyde olduğu rapor edilmiştir (Triki vd. 2018, Wang vd. 2021). Et ve ürünlerinde biyojen amin oluşumunu engellemek amacıyla bazı yöntemler geliştirilmiştir. Isıl işlem, katkı maddesi eklenmesi ve yüksek hidrostatik basınç uygulaması bu yöntemlerden bazılarıdır. Çeşitli katkı maddeleri, fermente et ürünlerinde patojen gelişiminin ve dolayısıyla biyojen amin oluşumunun önlenmesi amacıyla kullanılabilir. Nitrit, tiramin ve kadaverin başta olmak üzere birçok biyojen aminin oluşumunu engelleyebilmektedir. Isıl işlem uygulamaları ise fermente et ürünlerindeki fermentasyon süresini kısaltmaktadır. Böylece biyojen amin oluşumunun kontrol altına alınması sağlanmaktadır (Prpich vd. 2015).

Fermente sosiste histamin, putresin, kadaverin ve spermin seviyeleri araştırılmış ve konsantrasyonların 150-280 µg/kg olduğu tespit edilmiştir (Alves vd. 2017). Başka bir çalışmada ise salam örneklerinde saptanan spermin ve agmatin miktarlarının 8,3 mg/kg düzeyinde olduğu bildirilmiştir (Palermo vd. 2013). Wu vd. (2015) tarafından yapılan

bir çalışmada ise sosislerdeki putresin, tiramin ve 2-feniletilamin konsantrasyonlarının çalışmadaki en yüksek değerler olduğu belirtilmektedir.

2.4.3 Su ürünleri

Su ürünlerinin doğal mikroflorasında *Vibrionaceae*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Acinetobacter* ve *Flavobacterium* gibi mikroorganizmalar baskın olarak bulunmaktadır. Su ürünlerinde bu baskın mikroflora tarafından üretilen başta histamin olmak üzere tiramin, putresin, kadaverin ve triptamin gibi birçok biyojen aminin varlığı bildirilmektedir (Visciano vd. 2012, Biji vd. 2016). Balıklardan izole edilen *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia*, *Hafnia alvei* ve *Photobacterium phosphoreum*'un güçlü histamin üreticileri olduğu belirlenmiştir (Russo vd. 2010).

Su ürünlerinde oluşan biyojen aminler ciddi zehirlenme vakalarıyla anılmaktadır. Çeşitli balık türleri ile yüksek konsantrasyonlarda vücuda alınan histamin, “scombroid zehirlenmesi” veya “histamin zehirlenmesi” adı verilen ve ölümlle sonuçlanabilecek ciddi bir zehirlenmeye neden olmaktadır (Durak-Dados vd. 2020). Scombroid zehirlenmeleri genellikle *Scombridae* familyasına ait balıklarla ilişkilendirilmektedir. Scombroid zehirlenmelerinin semptomları arasında baş ağrısı, diyare, bulantı, kusma, kaşıntı, yanma ve ürtiker bulunmaktadır (Zhao vd. 2022). Zehirlenmenin semptomları histamin içeren gıdanın tüketilmesinden birkaç saat sonra ortaya çıkmaktadır (Harmelin vd. 2017).

Su ürünlerinin depolanma süreleri biyojen amin konsantrasyonları üzerinde etkili olmaktadır. Yeni yakalanan balıklardaki histamin miktarının 0,1 mg düzeyinde bulunduğu tespit edilmiştir. Depolama süresince biyojen amin konsantrasyonları genellikle yükselmektedir. Marinasyon, fermentasyon ve olgunlaştırma gibi işlemler sırasında oluşabilecek kontaminasyon riskinden dolayı biyojen amin oluşum riski de artabilmektedir (Visciano vd. 2012, Papageorgiou vd. 2018).

Yapılan bir çalışmada, çeşitli işlemlerden geçirilmiş balık örneklerindeki histamin konsantrasyonlarının $110,33 \pm 9,87$ mg/kg olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada $116,53 \pm 2,90$ mg/kg putresin, $122,18 \pm 68$ mg/kg kadaverin ve $190,61 \pm 7,67$ mg/kg triptamin konsantrasyonları bildirilmiştir (Bilgin ve Genççelep 2015). Hamsiler üzerinde yapılan bir çalışmada ise, 120 ± 1 mg/kg'a kadar trimetilamin konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu durumun olumsuz muhafaza koşullarından kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Palermo vd. 2013).

2.4.4 Fermente sebze ve soya ürünleri

Taze meyve ve sebzelerde biyojen amin oluşumunun nedeni mikrobiyel kaynaklı enzimatik aktivitenin kontrolsüz şekilde gerçekleşmesidir (Jastrzebska vd. 2015). Fermente veya taze meyve ve sebzelerde sıklıkla bulunan biyojen aminler arasında tiramin, histamin, putresin, kadaverin, spermin ve spermidin sayılabilmektedir (Papageorgiou vd. 2018).

Biyojen amin içeriklerinde fermente sebze ve meyvelerin çeşidine göre farklılık olabilmektedir. Soya sütü, tofu, moromi, soya sosu ve natto gibi fermente ürünlerin üretim, fermentasyon ve depolama gibi aşamalarında gerçekleşen farklılıklar buna neden olmaktadır. Uygulanan farklı prosesler, hijyenik koşullar, hammadde ve proteolitik özellik gösteren mikroorganizmaların ortamda bulunması biyojen amin içeriğini etkileyen faktörlerden bazılarıdır (Toro-Funes vd. 2015).

Yapılan bir çalışmada douchiden izole edilen *Stap. capitis*, *Stap. pasteurii* ve *Bac. subtilis*'un 11,7-601 ppm düzeyinde histamin ürettiği saptanmıştır (Tsai vd. 2007). Fermente lahana örneklerinde yapılan bir çalışmada ise, 37,01 mg/kg düzeyinde histamin tespit edilmiştir. Bununla birlikte aynı çalışmada 60,66 mg/kg tiramin ve 108,9 mg/kg putresin seviyeleri belirlenmiştir (Mayr ve Schieberle 2012).

2.4.5 Fermente içecekler

Yüksek biyojen amin seviyelerinin gözlemlendiği fermente alkollü içecekler arasında bira, şarap, sirke ve likör gibi içecekler bulunmaktadır. LAB ile *Saccharomyces carlsbergensis* ve *Sac. cerevisiae* gibi maya türleri bira üretiminde fermantasyondan sorumludur. Bira üretimi sırasında mikroorganizmalar tarafından histamin ve tiramin üretimi olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte maltta putresin, agmatin, spermin, spermidin ve 2-feniletilamin oluşumu belirlenmiştir (Papageorgiou vd. 2018). Şarapta baskın olan biyojen aminler ise tiramin, histamin ve putresindir. Ayrıca şarapta düşük miktarlarda kadaverin ve feniletilamin varlığı gözlenmektedir (Guo vd. 2015).

Şaraptaki biyojen amin oluşumu genellikle LAB ile ilişkilendirilmektedir. *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Oenococcus* türleri şaraptan izole edilen başlıca biyojen amin üreticileridir. Şaraptaki *Leu. mesenteroides*'in yüksek konsantrasyonlarda tiramin ve histamin ürettiği tespit edilmiştir (Aflaki vd. 2014). Şarap üretim prosesinde uygulanan koşulların biyojen amin oluşumu üzerinde etkileri bulunmaktadır. Hammadde kalitesi, farklı üretim proseslerinin uygulanması, depolama koşulları ve depolama süresi şaraptaki biyojen amin oluşumunu etkileyen faktörlerden bazılarıdır. Şaraptaki putresin ve kadaverin birikimi, hammadde olarak kullanılan üzümün olumsuz koşullara maruz kalmasıyla ilişkilendirilmektedir (Russo vd. 2016, Papageorgiou vd. 2018).

Alkolsüz bira örneklerinde tespit edilen biyojen amin düzeylerinin 1,17 mg/L'nin altında olduğu belirlenmiştir (Aflaki vd. 2014). Şaraptaki biyojen aminler üzerine yapılan çalışmalarda histamin seviyeleri İtalya'daki örnekler için 10,8 mg/L, Fransa'dakiler için 14,05 mg/L ve Portekiz'dekiler için ise 23,2±2,2 mg/L düzeylerinde bulunmuştur (Bach vd. 2012, Martuscelli vd. 2013, Ramos vd. 2014).

2.4.6 Özel gıdalar

Çikolata ve kahve gibi özel gıdalarda biyojen amin oluşumundan genellikle LAB, mayalar ve asetik asit bakterileri sorumludur (Shukla vd. 2010). Çikolatanın hammaddesi olan kakao çekirdeklerinde histamin, serotonin, dopamin ve feniletilamin gibi biyojen aminler saptanmıştır. Bununla birlikte hem kakaoda hem de çikolatada tiramin, histamin, triptamin, 2-feniletilamin, dopamin ve serotonin bulunabilmektedir (Guillen-Casla vd. 2012, Oracz ve Nebesny 2014). Çikolata genellikle feniletilamin içeriğinin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu özel bir gıdadır. Yüksek konsantrasyonlarda vücuda alınan feniletilaminin kızarıklık gibi cilt reaksiyonlarının yanı sıra baş ağrısı ve kan basıncının yükselmesi gibi ciddi semptomlara neden olabileceği bilinmektedir (Papageorgiou vd. 2018). Bununla birlikte, kahve ve kahve çekirdeklerinde en yaygın bulunan biyojen aminler arasında putresin, spermin, spermidin ve serotonin olduğu bildirilmektedir. Tiramin, kadaverin, histamin ve feniletilaminin, kahve ve kahve çekirdeklerinde olduğu bildirilen diğer biyojen aminlerdir (Restuccia vd. 2015, Gloria ve Engeseth 2019).

Çikolatada 2-feniletilamin, tiramin, spermidin ve etanolamin konsantrasyonlarının $7,40 \pm 3,4$ mg/kg düzeylerinde olduğu belirlenmiştir (Mayr ve Schieberle 2012). Öğütülmüş kahve örnekleriyle yapılan başka bir çalışmada ise kahve örneklerinde tiramin, triptamin, kadaverin ve serotonin bulunduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada serotonin konsantrasyonunun 170,8 mg/kg ve tiramin konsantrasyonunun ise 83,94 mg/kg olduğu saptanmıştır (Özdestan 2014).

2.5 Gıdalardaki Biyojen Amin Miktarlarının Tespit Edilmesi

Gıdalardaki biyojen amin miktarlarının tespit edilmesinde, bazı önemli unsurlar göz önünde bulundurulmalıdır. Bu unsurlar;

1. Biyojen aminin toksik eşik değerinin belirlenmesi,
2. Gıda üretim prosesinde kalitenin izlenmesi.

Gıdalardaki biyojen amin miktarının bilinmesi, yasal düzenlemelerde kriter konulması ve gıdanın kalite ve güvenliğinin sağlanması bakımından önem taşımaktadır. Gıdalarda bulunan biyojen amin miktarlarıyla ilgili uluslararası otoritelerce belirlenen spesifik bir limit değeri bulunmamaktadır. Bununla birlikte, bazı ülkeler şarap ve balık gibi gıda ürünlerindeki histamin miktarlarıyla ilgili yasal düzenlemeler yapmıştır (Çizelge 2.5). Türkiye’de ise sadece balıkçılık ürünlerinde bulunan histamin seviyeleriyle ilgili yasal düzenleme bulunmaktadır (Anonim 2011).

Çizelge 2.5 Otoriteler tarafından gıda ürünlerindeki biyojen aminler için belirlenen yasal limitler ve toksik seviyeler (Mah vd. 2019)

Sorumlu otorite	Gıda	Biyojen amin için limit değeri	Biyojen amin	Referans
Bağımsız araştırmacı	Tüm gıdalar	Toksisite eşiği: 100-800 mg/kg	Tiramin	ten Brink vd. 1990
Avrupa Ekonomik Komisyonu	Taze balık	Maksimum izin verilen seviye: 200 mg/kg	Histamin	Directive 1991
Bağımsız araştırmacı	Balık	Tüketim için güvenli seviye: <50 mg/kg; olası toksik seviye: 50-200 mg/kg; muhtemel toksik seviye: 200-1000 mg/kg; toksik seviye: >1000 mg/kg	Histamin	Shalaby 1996
Avrupa Komisyonu	Balık	Düzenleyici sınır: 100 mg/kg	Histamin	EC 2005
*ABD	Balık ve balıkçılık ürünleri	Toksik seviye: 500 mg/kg	Histamin	FDA 2011
*FAO/WHO (Kodeks Komitesi)	Balık ve balıkçılık ürünleri	Kalite ve hijyen indikatörü olarak: 200 mg/kg	Histamin	Codex 2012
FAO/WHO	Balık ve balıkçılık ürünleri	Maksimum izin verilen seviye: 200 mg/kg	Histamin	FAO/WHO 2013
Avustralya ve Yeni Zelanda	Balık ve balıkçılık ürünleri	Maksimum izin verilen seviye: 200 mg/kg	Histamin	FSANZ 2016

* FAO/WHO: Gıda ve Tarım Örgütü-Dünya Sağlık Örgütü (Food and Agriculture Organization–World Health Organization); ABD: Amerika Birleşik Devletleri.

Günümüzde HPLC ve GC gibi analitik yöntemler biyojen amin varlığı ve miktarının tespitinde ön plana çıkmaktadır. Bu yöntemler yüksek ayırma verimliliklerinin yanı sıra

hassasiyet ve tekrarlanabilirlik açısından tercih edilmektedirler (Mohedano vd. 2015, Michalski vd. 2021). Buna karşın bu yöntemlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemlerin pahalı ekipmanlar gerektirmesi, analitlerin türevlendirilmesi aşamasında emek ve zaman harcanması bunlardan bazılarıdır (Munir ve Badri 2020). Bu nedenle daha ekonomik ve daha az karmaşık analiz yöntemleri, alternatif stratejiler olarak önerilmektedir. Bu stratejilerden biri, bromokresol moru ve prekürsör amino asit içeren besiyeri ortamındaki pH değişiminin esas alındığı yöntemlerdir. Bu yöntemlerde, ortamın tamponlama gücü düşüktür. Bu nedenle ortam, pH metrede renk değişiminin olduğu değerden daha düşük bir değere ayarlanmaktadır. Biyojen amin üretimi ile ortam pH'sı daha alkali bir değere geçmekte ve ortam rengi mora dönüşmektedir. Bu yöntem biyojen amin üretici suşlarının ön ve hızlı tespiti amacıyla araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır (Mohedano vd. 2015).

2.5.1 Analitik yöntemler

Biyojen aminlerin toksik bir ajan olması ve gıdalarda sıklıkla bulunması, konsantrasyon seviyelerinin tespit edilmesi açısından çeşitli analitik tekniklerin geliştirilmesine neden olmuştur. Son yıllarda biyojen aminlerin tespit edilmesinde HPLC, TLC, GC, iyon değişim kromatografisi (IEC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi birçok analitik yöntem kullanılabilmektedir (Zhang vd. 2019, Michalski vd. 2021).

Biyojen aminlerin belirlenmesi amacıyla kullanılacak analitik yöntemin seçiminde belirli faktörlerin dikkate alınması gerekmektedir. Analit konsantrasyon aralığı, doğruluk, örnek hacmi ve analiz edilen matrislerin fizikokimyasal özellikleri bu faktörlerden bazılarıdır. Günümüzde HPLC tabanlı yaklaşımların biyojen aminlerin tespit edilmesinde kullanılan en hassas ve güvenilir yöntemler olduğu kabul edilmektedir (Stojanović ve Kos 2020).

Kromatografik yöntemlerde optimal bir analizin sağlanabilmesi için ekstraksiyon, temizleme ve türevlendirme prosedürlerinin uygulanması gerekmektedir (Mohedano vd. 2015). Seçiciliği ve duyarlılığı arttırmak amacıyla katı faz ekstraksiyon yöntemleri

uygulanabilmektedir. Son yıllarda minyatürleştirilmiş bir ekstraksiyon yöntemi olan mikroekstraksiyon yöntemi ön plana çıkmaktadır (Papageorgiou vd. 2018, Stojanović ve Kos 2020). Katı faz mikroekstraksiyonu, dağıtıcı sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon (DLLME), gaz-difüzyon mikro ekstraksiyonu ve içi boş fiber sıvı fazlı mikroekstraksiyon gibi çeşitli ekstraksiyon yöntemlerinin biyojen amin tespitinde kullanılabileceği bildirilmektedir (Custodio-Mendoza vd. 2022).

Biyojen aminlerin kromatografik yöntemlerle tespit edilmesinde kolon öncesi veya sonrasında türevlendirme işleminin yapılması ve daha sonra ilgili türevin floresan veya UV (Ultra Viyole) ışık altında algılanması gerekmektedir (Mohedano vd. 2015). Gıdalardaki biyojen aminlerin tespitinde kullanılan reaktiflerden bazıları dansil klorür (dansil-Cl), dabsil klorür, o-ftaldialdehit (OPA), 6-aminokinolil-N-hidroksisüksinimidil karbamat (AQC), 4-kloro-3,5-dinitrobenzotriflorür (CNBF) ve benzoil klorürdür (Restuccia vd. 2018, Han vd. 2022). Kolon öncesi türevlendirmede en yaygın olarak kullanılan reaktif Dansil-Cl'dir. Kolon sonrası türevlendirmede ise sıklıkla OPA kullanılmaktadır (Pernica vd. 2015, Kounnoun vd. 2020).

2.5.2 Moleküler yöntemler

Biyojen amin üreticisi suşların hızlı bir şekilde tespit edilmesini sağlayan moleküler yöntemler geliştirilmiştir. 1995 yılında PCR'ın biyojen amin üreticisi suşların tespit edilmesinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Moleküler yöntemler, gıda üretiminin erken aşamalarında bakterilerin sahip olduğu amino asit dekarboksilaz enzim genlerinin spesifik, hızlı ve güvenilir tespit edilmesi için araçlar sağlamaktadır. Bu doğrultuda moleküler bir yaklaşımla gıdalardaki biyojen amin birikiminin önlenmesi amacıyla erken risk değerlendirmesi yapılabilmekte ve kontrol önlemleri alınabilmektedir (Moreno-Arribas vd. 2022).

PCR yönteminde aminoasit dekarboksilaz enzimini kodlayan gen bölgelerine özgü primerler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, farklı gıda kaynaklı LAB suşları için tirozin-, histidin-, lizin- ve ornitin dekarboksilaz genine özgü primerler geliştirilmiştir

(Çizelge 2.6). de las Rivas vd. (2006) tarafından gıda kaynaklı bakterilerde lizin dekarboksilaz enzimine ait gen bölgesinin PCR ile tespit edilebilmesi için ilk oligonükleotitler tanımlanmıştır. Tiramin üreticisi LAB'ın tespit edilmesi amacıyla birkaç primer setinin geliştirildiği ve peynir üretimi sırasında tiramin üreten bakterilerin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanıldığı rapor edilmiştir (Loizzo vd. 2013).

Çizelge 2.6 Aminoasit dekarboksilaz enzimlerini kodlayan farklı genlere özgü primerler

Genler	Dizilim (5'→3')	Amplikon boyutu (bp)	Referans
<i>tdc</i> -F <i>tdc</i> -R	ACATAGTCAACCATRTTGAA CAAATGGAAGAAGAAGTAGG	1100	Semedo vd. 2003
<i>hdc1</i> -F <i>hdc1</i> -R	AGATGGTATTGTTTCTTATG AGACCATAACCCATAACCTT	367	Reviriego vd. 2005
<i>hdc2</i> -F <i>hdc2</i> -R	AAYTCNTTYGAYTTYGARAARGARG ATNGGNGANCCDATCATYTTTRTGNC	534	
<i>ldc1</i> -F <i>ldc1</i> -R	TTYGAYWCNGCNTGGGTNCCNTAAC CCRTGDATRTCNGTYTCRAANCCN	1098	
<i>odc</i> -F <i>odc</i> -R	TGCACTTCCATATCCTCCAG GAATTTCTGGAGCAAATC	127	Landete vd. 2007

odc: ornitin dekarboksilaz geni; *ldc*: lizin dekarboksilaz geni; *hdc*: histidin dekarboksilaz geni; *tdc*: tirozin dekarboksilaz geni

Gıdalarda tiramin, histamin, kadaverin ve putresin üreten bakterilerin eş zamanlı saptanabilmesi amacıyla multipleks PCR yöntemi kullanılmaktadır (Mohedano vd. 2015, Schirone vd. 2017). Başka bir moleküler yöntem ise gıda matrislerinde biyojen amin biyosentetik yolak ekspresyonunun saptanmasını amaçlayan q-PCR analizleridir. qPCR ile histamin üreticisi olan bakterilerin varlığı ve miktarı belirlenirken, çok sayıda numunenin hızlı ve kolay bir şekilde analiz edilmesi sağlanabilmektedir (Perin ve Nero 2017). qPCR yöntemi ile histamin üreten LAB'ın tespit edilebilmesi amacıyla, Lucas vd. (2008) tarafından bir primer seti tasarlanmıştır. Analiz süresinin 2 saat olduğu bu yöntemde, hedef suşun histamin üretme yeteneği ve kapasitesi belirlenebilmekte ve bu

yöntem, peynir gibi nihai ürünler üzerinde başarıyla kullanılabilir. Ayrıca peynirlerdeki tiramin üreticisi bakterilerin belirlenmesi amacıyla kullanılan bir qPCR yönteminin de olduğu ifade edilmektedir (Ladero vd. 2010). Moleküler yöntemlerle biyojen amin biyosentezinde görev alan bakteri genlerinin, mikrodamlılık tabanlı multipleks PCR aracılığıyla direkt olarak gıda matrisi üzerinde tespit edildiği çalışmalar da literatürde mevcuttur (Sciacalepore vd. 2013, Mohedano vd. 2015).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Gıda örnekleri

Tez kapsamında, Ankara ve çevre illerdeki çeşitli market ve pazarlarda satışa sunulan ve starter kültür kullanılmadan üretilen geleneksel peynirler çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Peynir örnekleri tek kullanımlık steril örnekleme kaplarına alınmış ve soğuk zinciri korunarak Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarları'na ulaştırılmıştır. Peynir örneklerine depolama işlemi uygulanmamış ve hemen *Enterococcus* spp. suşlarının izolasyonu için çalışmalara başlanmıştır.

3.1.2 Referans bakteriler

Tez çalışmasında kontrol amaçlı olarak kullanılmış olan *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* LMG 3083 (ETEC) ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 referans suşları Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.3 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar

Tez çalışması kapsamında kullanılan besiyerleri ve kimyasallar Çizelge 3.1'de yer almaktadır.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar

BESİYERİ ADI	KODU	FİRMA
Acetonitrile	34851	Sigma Aldrich
Ammonium acetate	73594	Supelco
Bactident Oxidase	1.13300.0001	Merck
Bile Eskulin Azide Agar	1.00072.0500	Merck
Brain Heart Infusion Broth	1.10493.0010	Merck
Bromocresol purple	114375-25G	Sigma Aldrich
Dansyl chloride	D2625	Sigma Aldrich
D(+)-Glucose	1.08337.1000	Merck
Etanol	1.00983.2511	Merck
Gliserol	1.04092.2500	Merck
Gram-Boyama Seti	1.11885.0001	Merck
Hidrojen Peroksit	1.08597.2500	Merck
Kanamisin Eskulin Azide Agar	1.05222.0500	Merck
L-Histidine, Reagent Plus, ≥99% (TLC)	H8000-25G	Sigma Aldrich
L-Lysine, ≥98% (TLC)	L5501-25G	Sigma Aldrich
L-Ornithine monohydrochloride, ≥99%	O2375-25G	Sigma Aldrich
L-Tyrosine, reagent grade, ≥98% (HPLC)	T3754-50G	Sigma Aldrich
Peptone from meat (pancreatic)	1.07214.1000	Merck
Perklorik asit (%70'lik)	100519	Supelco
Ringer Tableti	1.15525.0001	Merck
Sodyum bikarbonat	S5761	Sigma Aldrich
Sodyum Hidroksit (NaOH)	1.06462.1000	Merck
Sodyum Klorür	1.06404.1000	Merck
Triptik Soy Agar (TSA)	1.05458.0500	Merck
Triptik Soy Broth (TSB)	1.05459.0500	Merck
Yeast Extract	92144-500G-F	Sigma Aldrich

3.2 Yöntem

3.2.1 Gıda örneklerinin analize hazırlanması ve enterokok suşlarının izolasyonu

Net ağırlığı 10 g olacak şekilde steril kaplara tartılan peynir örnekleri, 90 mL'lik seyreltme sıvısı olan ¼ kuvvetindeki Ringer çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun tam sağlanabilmesi amacıyla peynir örnekleri oda sıcaklığında 10 dk süre ile bekletilmiştir. Daha sonra homojenize edilen örneklerin, %0,85'lik NaCl çözeltisiyle 10^{-5} düzeyine kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonların her birinden 100'er µL alınmış ve Kanamisin Eskulin Azid Agar (KAA) besiyerine yayma plak yöntemine göre ekim yapılmıştır. 18-48 h süreyle 37°C'de inkübasyona bırakılan petrilere zeytin yeşili/siyah arası renk veren koloniler muhtemel enterokok olarak değerlendirilmiştir. Saf kültür elde etmek amacıyla, tipik koloni morfolojisi gösteren koloniler nokta ekim yöntemine göre Tryptic Soy Agar (TSA)'a aktarılmıştır. Bu aşamada petrilere 37°C'de 24 h süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda TSA ortamından tek koloniler alınarak Tryptic Soy Broth (TSB) ortamına aktarılmıştır. Bu ortam 37°C'de 18 h süreyle tekrar inkübasyona bırakılmış ve saf kültür elde edilmiştir.

3.2.2 Enterokok izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal yolla ön tanımlamasının yapılması

3.2.2.1 Gram boyama

İzolatların morfolojik yapılarını belirleyebilmek için Gram boyama testi uygulanmıştır. Tek ya da kısa zincirler halinde kok ya da kokobasil morfolojisine sahip Gram (+) izolatlar, tez çalışmasına dahil edilmiştir.

3.2.2.2 Katalaz testi

TSA besiyerinde 37°C’de 24 h inkübe edilerek gelişimi sağlanan kolonilerden, temiz bir lam üzerine tek bir koloni aktarılmıştır. Koloni üzerine %3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi damlatılarak gaz çıkışı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Kabarcıkların görülmesi halinde test pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000). *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 kontrol suşu, katalaz testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.3 Enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktivitesinin belirlenmesi

Morfolojik ve biyokimyasal ön tanısı yapılan ve muhtemel *Enterococcus* spp. olarak tanımlanan izolatların biyogen amin üreticisi olup olmadığı saptanmıştır. Tez kapsamında peynirde en fazla bulunan ve enterokok suşları tarafından yaygın olarak üretilen histamin, kadaverin, putresin ve tiramin hedef biyogen aminler olarak saptanmıştır. Bu dört biyogen aminin enterokok suşları tarafından üretim durumu ayrı ayrı broth ortamlarda test edilmiştir. Bu amaçla aminoasit dekarboksilaz testi uygulanmıştır. Bu test Bover-Cid ve Holzapfel (1999) tarafından geliştirilmiş olup, prekürsor amino asitlerin 1 g/L nihai konsantrasyonunu içeren dekarboksilaz broth besiyeri ortamında yapılmıştır. Histamin için histidin, kadaverin için lisin, putresin için ornitin ve tiramin için tirozin aminoasitleri prekürsor aminoasit olarak kullanılmıştır. Dekarboksilaz broth ortamı içerikten hazırlanmış olup, kontrol olarak aminoasit ilave edilmemiş besiyeri kullanılmıştır. 24 h süre ile aktiveleştirilmiş taze bakteri kültürlerinden 0,1 mL dekarboksilaz sıvı besiyerine inokülasyon yapılmış ve 37°C’de 4-5 gün inkübasyona bırakılmıştır (Bover-Cid ve Holzapfel, 1999). Her bir deney tüpü incelendiğinde; sıvı besiyeri ortamındaki mor rengin inkübasyon sonunda sarı renge dönüşmesi sonucun negatif olduğunu gösterirken, rengin sarıdan tekrardan mora dönmesi ise pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1). Bununla birlikte, kiramit kırmızısı renge sahip sıvı besiyeri ortamlarındaki suşlar da zayıf biyogen amin üreticileri olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1). Bu işlem her izolat için iki kez tekrar edilmiştir.



Şekil 3.1 Enterokok izolatlarının aminoasit içeren dekarboksilaz broth besiyerindeki gelişimi

Dekarboksilaz Broth Besiyerinin Hazırlanışı:

Analizlerde kullanılmak üzere dekarboksilaz broth ortamı içerikten hazırlanmıştır. Hazırlanan dekarboksilaz broth ortamına çalışılacak prekürsor amino asitten eklenmiş ve pH 6,8'e ayarlanmıştır. pH ayarlanırken 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılmıştır. Daha sonra dekarboksilaz broth 10 mL'lik hacimlerle deney tüplerine dağıtılmış ve 121°C'de 15 dk boyunca sterilize edilmiştir.

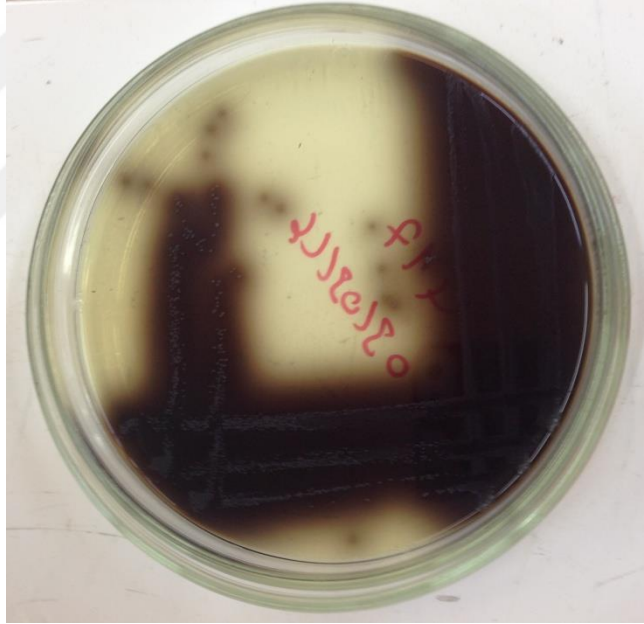
Besiyeri İçeriği:

Pepton	5 g
Maya ekstraktı	3 g
Dekstroz	1 g
Bromocresol purple	0,02 g
Prekürsor aminoasit*	5 g
Destile su	1000 mL
*Prekürsor aminoasitler: L-lisin, L-histidin, L-tirozin, L-ornitin	

3.2.4 Biyojen amin üreticisi enterokok izolatlarının biyokimyasal tanımlamasının yapılması

3.2.4.1 Eskulin hidrolizi

Biyojen amin üreticisi muhtemel enterokok izolatlarından Bile Eskulin Azide Agar besiyeri üzerine sürme ekimler yapılmıştır. 37 °C’de 24 h inkübe edilerek, besiyerinde siyah renkli koloni oluşumu eskulin hidrolizi testinin pozitif olduğunu göstermiştir (Navidghasemizad vd. 2009). Şekil 3.2’de muhtemel enterokok izolatlarının Bile Eskulin Azide Agar besiyerindeki gelişimi gösterilmiştir. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kontrol suşu, eskulin hidrolizi testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2 Enterokok izolatlarının Bile Eskulin Azide agar besiyerinde gelişimi

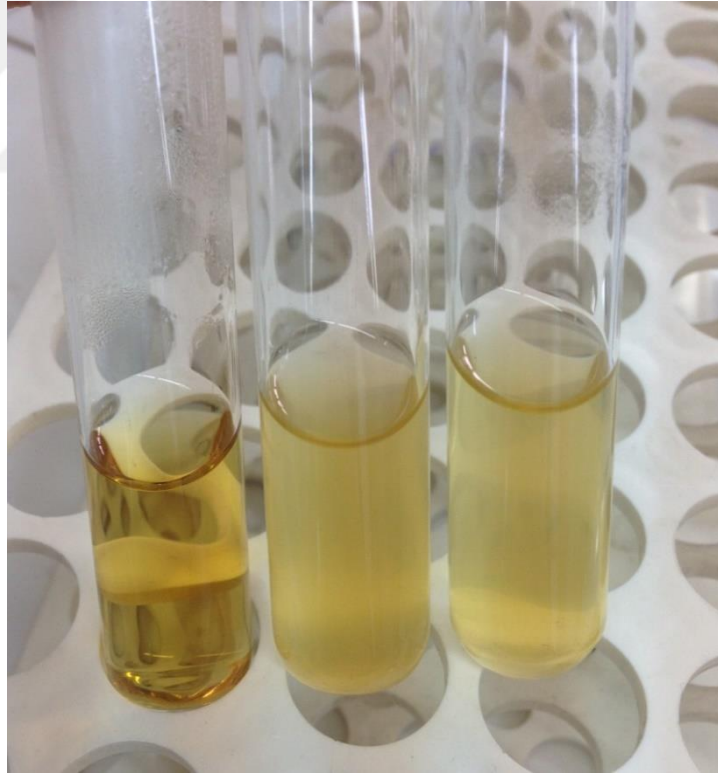
3.2.4.2 pH 9,6’da gelişme

Muhtemel enterokok izolatlarının pH 9,6’da gelişim düzeyini saptayabilmek amacıyla, pH’sı 9,6’ya ayarlanmış olan BHI broth besiyeri kullanılmıştır. %1 oranında inokülasyonu yapılan kültürlerin, 37°C’de 24-48 h inkübasyon sonunda gelişimleri

incelenmiştir (Manero ve Blanch 1999). *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kontrol suşu, pH 9,6'da gelişme testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sıvı besiyerinde bulanıklığın gözlenmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3).

3.2.4.3 Tuz toleransının belirlenmesi

Muhtemel enterokok izolatlarının tuz toleransının belirlenmesi amacıyla, %6,5 NaCl içeren BHI broth besiyeri kullanılmıştır. %1 oranında inokülasyonu yapılan kültürlerin, 37°C'de 24-48 h inkübasyon sonunda gelişimleri incelenmiştir (Facklam vd. 2002). *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kontrol suşu, tuz toleransının belirlenmesi testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sıvı besiyerinde bulanıklığın gözlenmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Muhtemel enterokok izolatlarının broth ortamda gelişmesi

3.2.4.4 Sıcaklık toleranslarının belirlenmesi

Muhtemel enterokok izolatlarının sıcaklık toleranslarının belirlenmesi amacıyla, BHI broth ortamına %1 oranında inoküle edilmiş kültürlerin 10°C ve 45°C'de 24-48 h inkübasyon sonunda gelişme özellikleri incelenmiştir (Facklam vd. 2002, Harwood vd. 2004). *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kontrol suşu, sıcaklık toleranslarının belirlenmesi testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sıvı besiyerinde bulanıklığın gözlenmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3).

3.2.4.5 Hemoliz testi

Muhtemel enterokok izolatlarında hemolizin aktivitesinin belirlenmesinde Valenzuela vd. (2009) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. İzolatlardan %5 (w/v) koyun kanı içeren TSA besiyerine çizgi ekim şeklinde sürme işlemi uygulanmıştır. Kanlı agar ortamları 37°C'de 24-48 h tutulmuş ve gelişen koloniler etrafındaki zonlar incelenmiştir. Kolonilerin etrafında kenarları keskin hatlı olmayan, bulanık ve yeşilimsi bir zon oluşumu α -hemolitik, düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir zon oluşumu ise β -hemolitik olarak tanımlanmıştır. Kanlı agar üzerinde hemoliz oluşturmayan izolatlar ise γ -hemolitik olarak belirlenmiştir. Çalışmada kontrol bakterileri olarak *Escherichia coli* LMG 3083 (ETEC) ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 kullanılmıştır.

3.2.5 Bakterilerin stok kültürlerinin hazırlanması

Hem referans bakterilerin hem de tez çalışması kapsamında izole edilen ve biyojen amin üreticisi olarak tanımlanan enterokok izolatlarının, %20 gliserol içeren BHI broth ortamında stok kültürleri hazırlanmıştır. Stok kültür ortamları -20°C'de muhafaza edilmiştir. Tez çalışması süresince kültürler BHI broth ortamında ve/veya TSB ortamında 37°C'de 18 h geliştirildikten sonra denemeye alınmıştır.

3.2.6 Enterokok izolatlarının biyojen amin üretim miktarlarının HPLC metodu ile belirlenmesi

Tez çalışmasının bu kısmına aminoasit dekarboksilaz broth ortamlarında güçlü biyojen amin üreticisi olarak saptanan enterokok suşları ile devam edilmiştir. Enterokok suşlarının ürettiği dört biyojen aminin (histamin, tiramin, kadaverin ve putresin) miktarını belirlemek amacıyla HPLC analizi yapılmıştır. Bu amaçla Eerola vd. (1993) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.

3.2.6.1 Biyojen amin standart çözeltilerinin hazırlanması

Standart stok çözeltileri 1 mg/mL (1000 ppm) olacak şekilde tartılmış ve ultra saf suda çözündürülerek 25 mL'ye tamamlanmıştır. Çalışma çözeltisi 1 için, her biyojen aminin stok çözeltisinden 1 mL alınmış ve ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin konsantrasyonu her bir biyojen amin için 100 µg/mL (100 ppm)'dir. Çalışma çözeltisi 2 için ise, 100 µg/mL (100 ppm)'lik çözeltiden 1 mL alınmış ve ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin konsantrasyonu 10 µg/mL (10 ppm)'dir.

Analizlerde kullanılan çözeltiler, kimyasallar ve bunların hazırlanışı aşağıdaki gibidir:

0,4 mol/L perklorik asit çözeltisi: 40 mL perklorik asit (HClO₄: %70-72) 1000 mL'lik bir ölçülü balonda işaret çizgisine kadar destile suyla seyreltilmiş ve karıştırılmıştır.

2 mol/L sodyum hidroksit (NaOH): 8,0 g sodyum hidroksit (NaOH) tartılmış ve 100 mL'lik ölçülü balona aktarılmıştır. NaOH destile suda çözölmüş ve hacim seyreltilmiştir.

Doymuş sodyum bikarbonat (NaHCO₃): NaHCO₃ destile su ile karıştırılmış (örneğin 60 mL suda 20 g NaHCO₃) ve su banyosunda ısıtılarak doymuş çözelti hazırlanmıştır.

Dansil klorür çözeltisi: 200 mg dansil klorür (5-dimetilaminonaftalin-İsülfonil klorür) tartılmış ve 20 mL aseton içerisinde çözölmüştür. Çözelti günlük olarak hazırlanmış ve çalışma boyunca ışıktan korunmuştur.

Amonyak çözeltisi: %25'lik amonyak (NH₃) çözeltisi hazırlanmıştır.

Biyojen aminlerin HPLC grade formları: Biyojen aminlerin HPLC grade formları tartılmış ve analize hazır hale getirilmiştir. Miktarları ise aşağıda belirtilmiştir.

Kadaverin dihidroklorür 42,87 mg

Putresin dihidroklorür 45,72 mg

Histamin dihidroklorür 41,43 mg

Tiramin hidroklorür 31,65 mg

3.2.6.2 Mobil faz

HPLC analizinde kullanılmak üzere iki ayrı mobil faz ve bunların karışımı hazırlanmıştır. Mobil fazların içeriğı ve hazırlanışı aşağıdaki belirtilmiştir.

Mobil faz A (0,1 mol/L amonyum asetat): 7,708 g amonyum asetat (CH₃COONH₄) hassas terazide tam olarak tartılmış ve 1000 mL'lik ölçölü balona aktarılmıştır. Amonyum asetat destile suda çözölmüş ve 1000 mL'ye tamamlanarak karıştırılmıştır. Çözelti daha sonra vakum süzme aparatı ve 0,45 µm steril membrane filtre kullanılarak süzölmüştür. Çözelti haftalık olarak hazırlanmıştır.

Mobil faz B (asetonitril): Asetonitril (CH₃CN) çözeltisi hazırlanmış ve vakum süzme aparatı kullanılarak 0,45 µm steril membrane filtre ile süzölmüştür.

0,1 mol/L amonyum asetat : asetonitril karışımı: Amonyum asetat ve asetonitril eşit hacimlerde (1:1, v:v) olacak şekilde hazırlanmış ve karıştırılmıştır.

3.2.6.3 Örneklerin ekstraksiyonu ve türevlendirilmesi

Biyojen aminlerin tespit edilmesinde kullanılan numunelerin matrisleri genellikle kompleks olduğundan, kromatografik analizlerden önce ekstraksiyon ve türevlendirme işlemlerinin yapılması gerekmektedir. Bu işlemler, numunelerdeki biyojen aminlerin düşük derişimlerinin bile tespit edilebilmesi açısından önemlidir. Tez çalışmasında 10 mL'lik TSB'ye inoküle edilen ve 37 °C'de 4-5 gün süreyle inkübasyona bırakılan güçlü biyojen amin üreticisi enterokok suşları numune olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüm tüpler vorteksle karıştırılmıştır. Mikropipet yardımıyla her bir tüpten 5 mL alınarak 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra üzerine hazırlanan 0,4 mol perklorik asit çözeltisinden 10 mL eklenmiştir. Hazırlanan çözelti 3 dk boyunca ultra turrax homojenizatörde homojenize edilmiştir. Bu homojenat, 4°C'de ve 3000 devirde soğutmalı santrifüjde 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme işlemi sonunda üstte kalan berrak kısım Whatman No.2 filtre kâğıdı ile 25 mL'lik balon jojeye süzölmüştür. Santrifüj tüpüne yeniden 0,4 mol perklorik asit çözeltisinden 10 mL eklenmiştir. Vortekste 1 dk boyunca karıştırılan çözelti, bir önceki işlem gibi santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemi takiben üstte kalan berrak kısım yeniden filtre kâğıdından geçirilerek balon jojeye süzölmüştür. Balon joje içerisindeki süzöntü 25 mL'ye kadar 0,4 mol perklorik asit çözeltisiyle tamamlanmıştır. Bu çözelti vortekste 1 dk boyunca karıştırılmıştır.

Sonraki aşama ise ekstrakte edilen numunelerin türevlendirilmesidir. Bu aşamada numuneden veya miks standarttan 0,5 mL alınarak, 5 mL'lik amber balon jojelere aktarılmıştır. HPLC'de 50 ppm okunacak miks standart için 100 µg/mL (100 ppm)'lik çalışma çözeltisi 1'den 50 µL alınmıştır. Üzerine 450 µL perklorik asit ilave edilmiş ve son hacmin 0,5 mL olması sağlanmıştır. Balon joje içerisindeki numune veya miks standart üzerine sırasıyla doymuş sodyum bikarbonat (NaHCO₃) çözeltisinden 150 µL, 2 N NaOH çözeltisinden 100 µL ve dansil klorür çözeltisinden 1 mL ilave edilmiştir. Bu çözelti vortekste 15 saniye boyunca karıştırılmış ve 40°C'deki etüvde 45 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda numuneler oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 10 dk boyunca bekletilmiş ve üzerlerine %25'lik amonyak (NH₃) çözeltisinden 50 µL eklenmiştir. Hazırlanan bu çözelti 15 saniye boyunca vorteksle karıştırılmış ve

yine oda sıcaklığındaki karanlık bir ortamda 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hazırlanan çözelti 1:1 (v:v) oranındaki amonyum asetat:asetonitril ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Son olarak çözelti 30 saniye boyunca vorteks ile karıştırılmış ve HPLC analizi için hazır hale gelmiştir.

3.2.6.4 HPLC analizi

Ektraksiyon ve türevlendirme işlemleri yapılan çözelti, bir şırınga yardımıyla 0,45 µm'lik membrane filtreden geçirilmiş ve HPLC viallerine alınmıştır. Son olarak HPLC'de elde edilen pikler incelenmiş ve okuma yapılmıştır. Analizler sırasında HPLC'de kullanılan kromatografik koşullar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 HPLC analizi sırasında kullanılan kromatografik koşullar

Enjeksiyon miktarı	20 µL
Akış hızı	0,8 mL/dk
Kolon tipi	C 18 (Inertsil ODS-3, 5 µm 4,6 x 250 mm)
Dedektör tipi	DAD
Kolon fırını sıcaklığı	40 °C
Taşıyıcı faz A	0,1 mol Amonyum asetat
Taşıyıcı faz B	Asetonitril %50- %50 16 dk, %10- %90 16-22 dk, %50-%50 22-35 dk post run
Dalga boyu	254 nm
Süre	35 dk

3.2.7 *Enterococcus* suşlarının 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde moleküler tanısı

Histamin, kadaverin, putresin ve tiramin üretim miktarları HPLC analizi ile en yüksek üretici olarak belirlenen enterokok suşları 16S rDNA analizlerine tabi tutularak moleküler düzeyde tanımlaması yapılmıştır.

3.2.7.1 Genomik DNA izolasyonu

TSB besiyerinde 37°C’de 18 h süreyle geliştirilen enterokok suşlarının ve şahit suşun (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) genomik DNA izolasyonu için Exgene Cell SV genomik DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. İzlenen protokol aşağıda yer almaktadır.

- 1) Bakteri örneği 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. 10000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek örnek çöktürülmüştür.
- 2) 180 µL Lizozim enzim solüsyonu her bir tüpe eklenmiştir. Lizozim solüsyonu kit protokolüne göre hazırlanmıştır. 1 mL lizozim solüsyonu için, 30 mg NZY Lizozim tartılarak kit içeriğinde bulunan GP buffer içerisinde çözündürülmüştür.
- 3) Karışım 37°C’de 30 dk bekletilmiştir.
- 4) Lizat üzerine 20 µL RNaz A eklenmiştir. Vorteks yardımı ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 2 dk bekletilmiştir.
- 5) 20 µL Proteinaz K solüsyonu (20 mg/mL) ve 200 µL Buffer BL tüpe eklenerek vorteks yardımıyla karıştırılmıştır.
- 6) 56°C’de 30 dk ve daha sonra 70°C’de tekrar 30 dk inkübe edilmiştir.
- 7) Lizat üzerine 200 µL absolut etanol eklenmiş, pulse-vortex metodu ile karıştırılmıştır.
- 8) Tüm karışım alınarak Type-G spin kolana aktarılmış ve santrifüj edilmiştir (13000 rpm, 1 dk). Santrifüj sonrasında kolondan geçen kısım atılmıştır.
- 9) Kolon üzerine 600 µL Buffer BW eklenerek santrifüj edilmiştir (13000 rpm, 1 dk). Kolonun altındaki tüp yenisiyle değiştirilmiştir.
- 10) Kolon üzerine 700 µL Buffer TW eklenerek santrifüj edilmiştir (13000 rpm, 1 dk).
- 11) Kolonda herhangi bir yıkama solüsyonu artığı kalmaması için kolon boş bir şekilde en yüksek rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir (14000 rpm, 1 dk).
- 12) Kolon yeni bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 200 µL Buffer AE eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve sonra santrifüj edilmiştir (14000 rpm, 1 dk).
- 13) Elde edilen DNA örneği -20°C’de saklanmıştır.

3.2.7.2 16S rDNA gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması

16S rDNA gen bölgesinin PZR reaksiyonu için, Applied Biosystems™ ProFlex Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. 16S rDNA gen bölgesinin çoğaltılmasında 16S ileri (27 F: AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) ve 16S geri (907R: CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT) evrensel primer dizileri kullanılmıştır. Toplam 20 µL hacimde olacak şekilde ve Çizelge 3.3.'de belirtilen miktarlarda PZR karışımı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3 Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan karışım

PCR 2X Master Mix	10 µL
16S ileri primer	0,5 µL
16S geri primer	0,5 µL
Genomik DNA	2 µL
Moleküler destile su	7 µL
TOPLAM HACİM	20 µL

Hazırlanan 20 µL hacmindeki PZR karışımı, steril 0,2 mL'lik PZR tüplerine aktarılmıştır. PZR tüpleri cihazdaki kuyucuklara yerleştirilerek, bir çevrimi 95°C'de 5 dk (denatürasyon), 95°C'de 30 saniye (çift zincirin açılması), 52°C'de 45 saniye (primerlerin bağlanması), 72°C'de 1 dk (zincir uzaması) ve 72°C'de 5 dk (son uzama) olarak gerçekleştirilen toplam 32 döngülük PZR protokolü uygulanmıştır. Son aşamada ise, elde edilen PZR ürünlerinin saflaştırılmasında GeneJET PZR Purifikasyon Kiti kullanılmıştır.

3.2.7.3 16S rDNA gen bölgelerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi

PZR'de amplifiye edilen gen bölgelerinin elektroforezi için, %1 agaroz içeren jel hazırlanmıştır. Agaroz jeli hazırlanmak amacıyla, 1 g agaroz 100 mL 1X Tris-Asetat elektroforez tamponu (TEB) içine aktarılmıştır. Mikrodalga fırın yardımıyla jel

içeriğinin tamamen çözünmesi sağlanmış ve jelin oda sıcaklığında 45-50°C'ye kadar soğuması beklenilmiştir. Daha sonra jel ortamı elektroforez tankına dökülmüş ve akışkan haldeki jel içine elektroforez tarakları yerleştirilmiştir. Jel içerisindeki agarozun polimerize olmasını sağlamak amacıyla, oda sıcaklığında 30-40 dk beklenmiştir. Agarozun polimerizasyonu sağlandıktan sonra elektroforez tankına jelin üzerini tamamen kapatacak miktarda TEB tampon eklenmiştir. Elektroforez tarakları iki ucundan nazikçe tutularak, jele zarar vermeden hafifçe hareket ettirilmek suretiyle jelden çekilerek alınmıştır. Agaroz jel üzerindeki ilk kuyucuğa 2 µL 1 kb'lık DNA ladder marker yüklenmiştir. Devamındaki diğer kuyucuklara ise araştırılan örneklerden sırasıyla 10'ar µL DNA örneği ile 2 µL 6X DNA yükleme boyası karışımları dikkatlice yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 110 V'luk elektrik akımında 40-45 dk süreyle gerçekleştirilmiştir. Marker boyanın agaroz jel sistemini terk etmesinden sonra, elektroforez işlemi sonlandırılmıştır. Ortamdan alınan jeller 0,2 µg/mL etidyum bromür içeren TEB tampon içine aktararak, yaklaşık 60 dk boyunca beklenmiştir. Boyanan DNA bantları 366 nm dalga boyundaki UV ışık altında translüminatör kullanılarak incelenmiş ve agaroz jeller Kodak Gel Logic 200 Imaging System kullanılarak fotoğraflanmıştır.

Tris-Asetat Tamponu (1X) (TEB) Hazırlanması

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

DNA Ladder Marker Çözeltilisinin Hazırlanması

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

3.2.7.4 PZR ürünlerinin dizilenmesi

16S rDNA gen bölgesine ait PZR ürünlerinin saflaştırılması için, ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents (Thermo Fischer) kullanılmıştır. PZR ürünlerinin çift yönlü DNA dizi analizi, hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Dizi analiz sonuçları BLAST (Basic Local Alingment Search Tool/ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/web>) programına aktarılmış ve *Enterococcus* spp. için NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında yer alan diziler ile benzerliği karşılaştırılmıştır. Benzerlik yüzdesi kontrol edilerek, aranan dizi sırasının hangi türe ait olabileceği belirlenmiştir.

3.2.8 Aminoasit dekarboksilaz aktivitesinin moleküler olarak tanımlanması

TSB besiyerinde 37 °C’de 18 h süreyle geliştirilen enterokok suşlarının genomik DNA izolasyonu, “3.2.7.1 Genomik DNA izolasyonu” başlığı altında yer alan protokol takip edilerek yapılmıştır. Sonrasında tez çalışması kapsamında denenen histamin, kadaverin, tiramin ve putresin üretiminden sorumlu aminoasit dekarboksilaz enzim gen bölgelerine ait primerler kullanılarak (Çizelge 3.4), “3.2.7.2 16S rDNA gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması” başlığı altında belirtilen protokol takip edilmiştir. Gen bölgelerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi amacıyla da “3.2.7.3 16S rDNA gen bölgelerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi” başlığı altındaki protokol takip edilmiştir.

Çizelge 3.4 Biyojen amin gen bölgeleri

Biyojen amin	Primer Adı	Dizilim (5'→3')	Uzunluk (bp)	Kaynak
Histamin	HDC3	AGATGGTATTGTTTCTTATG	435	Coton vd. (1998)
	HDC4	AGACCATACACCATAACCTT		
Kadaverin	CAD2F	CACATACCAGGACACAA	1098	Delas Rivas vd. (2005)
	CAD2R	GGTATACCAGGAGGATA		
Tiramin	TDC1	CACGTTGACGCTGCTTACGGTGG	720	Fernández vd. (2004)
	TDC2	ACATATCCCATCTTATGTGGATC		
Putresin	ODC1	GTTTTCAACGCTGACAAACTTACT TCGT	972	Marcobal vd. (2004)
	ODC2	ATTGAATTTAGTTCACATTCTCTGG		

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Peynir Örneklerinden Muhtemel Enterokok Suşlarının İzolasyonu

Tez kapsamında Ankara ve çevre illerdeki çeşitli market ve pazarlardan temin edilen ve starter kültür kullanılmadan geleneksel olarak üretilen peynir örnekleri izolasyon materyali olarak kullanılmıştır. Toplam 452 peynir örneği araştırma kapsamında temin edilmiştir. Örneklerin 391'inde tipik *Enterococcus* spp. koloni morfolojisi tespit edilmiştir. Tez çalışma kapsamında örneklerin %86,50'sinde enterokoklar için tipik koloni morfolojisi tespit edilmiş ve bu örneklerden tek koloni alma yoluna gidilmiştir. İzolatlar öncelikli olarak Gram boyama ve katalaz testleri uygulanmıştır. 391 izolatın tamamının Gr (+) ve katalaz (-) olduğu saptanmıştır. Mikroskopik incelemede tek ya da kısa zincirler halinde kok ya da kokobasil morfolojisine sahip olduğu gözlemlenen bu izolatlar, muhtemel enterokok suşu olarak tanımlanmıştır. Gr (+) ve katalaz (-) olarak saptanan muhtemel enterokok izolatlarına BA kodu verilmiştir. Bu izolatlar çalışma kapsamında diğer kültürel testlerde kullanılmak üzere %20 steril gliserol içeren BHI broth ortamlarında mikrosantrifüj tüplerine alınarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2 Enterokok İzolatlarının Aminoasit Dekarboksilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Biyokimyasal ön tanımlama analizleri sonucunda muhtemel *Enterococcus* spp. olarak belirlenen 391 izolatın biyojen amin üreticisi olup olmadığı tespit edilmiştir. Enterokok suşları tarafından peynirde en fazla üretilen biyojen aminler, tez çalışması kapsamında hedef biyojen aminler olarak seçilmiştir. Kadaverin, histamin, tiramin ve putresin olmak üzere dört farklı biyojen aminin enterokok suşları tarafından üretilme durumları, öncül aminoasitlerini içeren dekarboksilaz broth ortamlarında ayrı ayrı test edilmiştir. Kadaverin için lisin, histamin için histidin, tiramin için tirozin ve putresin için ornitin öncül aminoasit olarak kullanılmıştır. Renk değişiminin esas alındığı aminoasit dekarboksilaz aktivitesi testinde, rengin sarıdan mora dönmesi biyojen amin oluşumu bakımından pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.1.'de peynir

örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının kadaverin, histamin, tiramin ve putresin bakımından dekarboksilaz aktiviteleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri

No	İzolat No	Aminoasit Dekarboksilaz Aktiviteleri			
		Kadaverin	Putresin	Tiramin	Histamin
1	BA1	–	–	+++	++
2	BA2	–	–	–	–
3	BA3	–	–	+++	++
4	BA4	–	–	–	–
5	BA5	–	–	–	–
6	BA6	–	–	+++	++
7	BA7	–	–	–	++
8	BA8	–	–	+++	++
9	BA9	–	–	–	–
10	BA10	–	–	–	–
11	BA11	–	–	–	–
12	BA12	–	–	–	–
13	BA13	–	–	+++	++
14	BA14	–	–	–	++
15	BA15	–	–	–	++
16	BA16	–	–	–	–
17	BA17	+++	+++	–	+++
18	BA18	–	–	–	–
19	BA19	–	–	–	–
20	BA20	–	–	–	++
21	BA21	–	–	–	–
22	BA22	–	–	–	++
23	BA23	–	–	–	++
24	BA24	–	–	–	–
25	BA25	–	–	–	–
26	BA26	–	–	–	–
27	BA27	–	–	–	++
28	BA28	–	–	–	–
29	BA29	–	–	–	++
30	BA30	–	–	–	–
31	BA31	–	–	–	–
32	BA32	–	–	–	–
33	BA33	+++	+++	+++	+++
34	BA34	–	–	+++	++
35	BA35	–	–	–	–
36	BA36	–	–	+++	++

Çizelge 4.1 Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri (devam)

No	İzolat No	Aminoasit Dekarboksilaz Aktiviteleri			
		Kadaverin	Putresin	Tiramin	Histamin
37	BA37	–	–	+++	++
38	BA38	–	–	+++	++
39	BA39	–	–	+++	++
40	BA40	–	–	–	–
41	BA41	–	–	–	++
42	BA42	–	–	+++	++
43	BA43	–	–	+++	++
44	BA44	–	–	–	–
45	BA45	–	–	–	++
46	BA46	+	–	+	+++
47	BA47	–	–	–	–
48	BA48	–	–	–	–
49	BA49	–	–	–	++
50	BA50	–	–	–	++
51	BA51	–	–	–	–
52	BA52	–	–	–	++
53	BA53	–	–	–	–
54	BA54	–	–	–	++
55	BA55	–	–	–	–
56	BA56	–	–	–	++
57	BA57	–	–	+++	++
58	BA58	–	–	–	–
59	BA59	–	–	–	++
60	BA60	+	–	+++	+++
61	BA61	–	–	–	++
62	BA62	–	–	–	++
63	BA63	–	–	–	++
64	BA64	–	–	–	++
65	BA65	–	–	–	–
66	BA66	–	–	–	–
67	BA67	–	–	+++	++
68	BA68	–	–	–	–
69	BA69	–	–	+++	++
70	BA70	–	–	–	–
71	BA71	–	–	+++	+++
72	BA72	–	–	–	–
73	BA73	–	–	–	–
74	BA74	–	–	–	–
75	BA75	–	–	+	++
76	BA76	–	–	+++	++
77	BA77	–	–	–	++
78	BA78	–	–	–	–
79	BA79	–	–	–	–

Çizelge 4.1 Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri (devam)

No	İzolat No	Aminoasit Dekarboksilaz Aktiviteleri			
		Kadaverin	Putresin	Tiramin	Histamin
80	BA80	–	–	–	++
81	BA81	–	–	–	–
82	BA82	–	–	–	–
83	BA83	–	–	–	–
84	BA84	–	–	–	++
85	BA85	–	–	–	++
86	BA86	–	–	–	++
87	BA87	–	–	–	–
88	BA88	–	–	–	++
89	BA89	–	–	–	–
90	BA90	–	–	+++	++
91	BA91	–	–	–	++
92	BA92	–	+	+++	+++
93	BA93	–	–	+++	++
94	BA94	–	–	+	++
95	BA95	–	–	–	++
96	BA96	–	–	–	–
97	BA97	–	–	–	++
98	BA98	–	–	+++	++
99	BA99	–	–	–	–
100	BA100	–	–	+++	++
101	BA101	–	–	+++	++
102	BA102	–	–	–	++
103	BA103	–	–	–	–
104	BA104	–	–	–	++
105	BA105	–	–	–	–
106	BA106	–	–	–	++
107	BA107	–	–	–	++
108	BA108	–	–	+++	++
109	BA109	–	–	–	–
110	BA110	–	–	–	–
111	BA111	–	–	+++	++
112	BA112	–	–	+++	++
113	BA113	–	–	–	++
114	BA114	–	–	–	++
115	BA115	–	–	–	++
116	BA116	–	–	–	–
117	BA117	–	–	–	++
118	BA118	–	–	–	–
119	BA119	–	–	+++	++
120	BA120	–	–	+	++
121	BA121	–	–	–	++
122	BA122	–	–	–	++

Çizelge 4.1 Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri (devam)

No	İzolat No	Aminoasit Dekarboksilaz Aktiviteleri			
		Kadaverin	Putresin	Tiramin	Histamin
123	BA123	–	–	+++	++
124	BA124	–	–	–	++
125	BA125	+	+	+++	+++
126	BA126	–	–	–	++
127	BA127	–	–	–	–
128	BA128	–	–	–	++
129	BA129	–	–	–	–
130	BA130	–	–	+++	++
131	BA131	–	–	–	–
132	BA132	–	–	+++	++
133	BA133	–	–	+++	++
134	BA134	–	–	+++	++
135	BA135	–	–	–	++
136	BA136	–	–	+++	++
137	BA137	–	–	–	–
138	BA138	–	–	+++	++
139	BA139	–	–	+++	++
140	BA140	–	–	–	++
141	BA141	–	–	–	–
142	BA142	–	–	–	++
143	BA143	–	–	–	++
144	BA144	–	–	–	–
145	BA145	–	–	+++	++
146	BA146	–	–	–	++
147	BA147	–	+	+++	+++
148	BA148	–	–	–	++
149	BA149	–	–	–	–
150	BA150	–	–	+++	++
151	BA151	–	–	+++	++
152	BA152	–	–	+++	++
153	BA153	–	–	+++	++
154	BA154	–	–	–	–
155	BA155	–	–	–	++
156	BA156	–	–	–	++
157	BA157	–	–	+++	++
158	BA158	–	–	+++	++
159	BA159	–	–	–	–
160	BA160	–	–	–	–
161	BA161	–	–	–	++
162	BA162	–	–	–	++
163	BA163	–	–	+++	++
164	BA164	–	–	+++	++
165	BA165	–	–	+++	++

Çizelge 4.1 Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri (devamı)

No	İzolat No	Aminoasit Dekarboksilaz Aktiviteleri			
		Kadaverin	Putresin	Tiramin	Histamin
166	BA166	–	–	+++	++
167	BA167	–	–	–	++
168	BA168	–	–	–	–
169	BA169	–	–	–	++
170	BA170	–	–	–	++
171	BA171	–	–	–	++
172	BA172	–	–	–	–
173	BA173	–	–	–	++
174	BA174	–	–	–	–
175	BA175	–	–	–	++
176	BA176	–	–	+++	++
177	BA177	–	–	–	++
178	BA178	–	–	–	–
179	BA179	–	–	–	–
180	BA180	–	–	+++	++
181	BA181	–	–	+++	++
182	BA182	–	–	+++	++
183	BA183	–	–	+++	++
184	BA184	+	+	+++	+++
185	BA185	–	–	–	–
186	BA186	–	–	–	–
187	BA187	–	–	+++	++
188	BA188	+++	+++	+++	+++
189	BA189	–	–	–	++
190	BA190	–	–	–	–
191	BA191	–	–	–	–
192	BA192	–	–	–	–
193	BA193	–	–	+++	++
194	BA194	–	–	–	++
195	BA195	–	–	–	++
196	BA196	–	–	–	++
197	BA197	–	–	+++	++
198	BA198	–	–	+++	++
199	BA199	–	–	+++	++
200	BA200	–	–	–	–
201	BA201	–	–	–	–
202	BA202	–	–	–	++
203	BA203	–	–	–	++
204	BA204	–	–	+++	++
205	BA205	–	–	+	++
206	BA206	–	+	+++	+++
207	BA207	–	–	–	–
208	BA208	–	–	+++	++

Çizelge 4.1 Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktivitei (devam)

No	İzolat No	Aminoasit Dekarboksilaz Aktivitei			
		Kadaverin	Putresin	Tiramin	Histamin
209	BA209	–	–	+++	++
210	BA210	–	–	–	++
211	BA211	–	–	–	++
212	BA212	–	–	+++	++
213	BA213	–	–	+++	++
214	BA214	–	–	+++	++
215	BA215	–	–	+++	++
216	BA216	–	–	–	–
217	BA217	–	–	–	++
218	BA218	–	–	–	++
219	BA219	–	–	–	–
220	BA220	–	–	–	–
221	BA221	–	–	+++	++
222	BA222	–	–	+++	+
223	BA223	–	–	+++	++
224	BA224	–	–	+++	++
225	BA225	–	–	–	++
226	BA226	–	–	+++	++
227	BA227	–	–	+++	++
228	BA228	–	–	+++	++
229	BA229	–	–	–	++
230	BA230	–	–	+++	++
231	BA231	–	–	+++	++
232	BA232	–	–	–	–
233	BA233	–	–	+++	++
234	BA234	–	–	+++	++
235	BA235	–	–	–	++
236	BA236	–	+	+++	+++
237	BA237	–	–	–	–
238	BA238	–	–	–	++
239	BA239	–	–	–	++
240	BA240	–	–	+++	++
241	BA241	–	–	+++	++
242	BA242	–	–	+++	++
243	BA243	–	–	+++	++
244	BA244	–	–	+++	++
245	BA245	–	–	+++	++
246	BA246	–	–	–	++
247	BA247	–	–	+++	++

Çizelge 4.1 Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktivitei (devam)

No	İzolat No	Aminoasit Dekarboksilaz Aktivitei			
		Kadaverin	Putresin	Tiramin	Histamin
248	BA248	–	–	+++	++
249	BA249	–	–	–	++
250	BA250	–	–	–	–
251	BA251	+	+	+++	+++
252	BA252	–	–	–	++
253	BA253	–	–	–	++
254	BA254	–	–	–	++
255	BA255	–	–	–	–
256	BA256	–	–	–	–
257	BA257	–	–	+++	++
258	BA258	–	–	–	–
259	BA259	–	–	+++	++
260	BA260	–	–	+++	++
261	BA261	–	–	–	++
262	BA262	–	+	+++	+++
263	BA263	–	–	+++	++
264	BA264	–	–	+++	++
265	BA265	–	–	–	–
266	BA266	–	–	+++	++
267	BA267	–	–	–	++
268	BA268	–	–	+++	++
269	BA269	–	–	+++	++
270	BA270	–	–	+++	++
271	BA271	–	+	+++	+++
272	BA272	–	–	–	++
273	BA273	–	–	–	–
274	BA274	–	–	+++	++
275	BA275	–	–	+++	++
276	BA276	–	–	+++	++
277	BA277	–	–	+++	++
278	BA278	–	–	+++	++
279	BA279	–	–	–	++
280	BA280	+	+	+++	+++
281	BA281	–	–	–	–
282	BA282	–	–	–	++
283	BA283	–	–	–	–
284	BA284	–	–	+++	++
285	BA285	–	–	+++	++
286	BA286	–	–	+++	++
287	BA287	–	–	+++	++
288	BA288	–	–	+++	++
289	BA289	–	–	–	–
290	BA290	–	–	+++	++

Çizelge 4.1 Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri (devam)

No	İzolat No	Aminoasit Dekarboksilaz Aktiviteleri			
		Kadaverin	Putresin	Tiramin	Histamin
291	BA291	–	–	+++	++
292	BA292	–	–	+++	++
293	BA293	–	–	–	++
294	BA294	–	–	+++	++
295	BA295	–	–	+++	++
296	BA296	–	–	–	++
297	BA297	–	–	–	–
298	BA298	–	+	+++	+++
299	BA299	–	–	+++	++
300	BA300	–	–	+++	++
301	BA301	–	–	+++	++
302	BA302	–	–	+++	++
303	BA303	–	–	–	++
304	BA304	–	–	–	–
305	BA305	–	–	–	–
306	BA306	–	–	–	–
307	BA307	+	+	+++	+++
308	BA308	–	–	–	++
309	BA309	–	–	–	–
310	BA310	+	+	+++	+++
311	BA311	–	–	–	–
312	BA312	–	–	–	–
313	BA313	–	–	+++	++
314	BA314	–	–	–	–
315	BA315	–	–	+++	++
316	BA316	–	–	+++	++
317	BA317	–	–	–	–
318	BA318	–	–	–	++
319	BA319	–	–	–	–
320	BA320	–	–	–	–
321	BA321	–	–	–	++
322	BA322	–	–	–	++
323	BA323	–	+	+++	+++
324	BA324	–	–	–	–
325	BA325	–	–	+++	++
326	BA326	–	–	–	–
327	BA327	–	–	+++	++
328	BA328	–	–	+++	++
329	BA329	–	–	+++	++
330	BA330	–	–	+++	++
331	BA331	–	–	+++	++
332	BA332	–	–	+++	++
333	BA333	–	–	–	++

Çizelge 4.1 Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri (devam)

No	İzolat No	Aminoasit Dekarboksilaz Aktiviteleri			
		Kadaverin	Putresin	Tiramin	Histamin
334	BA334	+	+	+++	+++
335	BA335	–	–	–	–
336	BA336	–	–	–	–
337	BA337	–	–	–	–
338	BA338	–	–	+++	++
339	BA339	–	–	–	–
340	BA340	–	–	+++	++
341	BA341	–	–	+++	++
342	BA342	–	–	–	–
343	BA343	+	+	+++	+++
344	BA344	–	–	+++	++
345	BA345	–	–	+++	++
346	BA346	–	–	+++	++
347	BA347	–	–	+++	++
348	BA348	–	–	+++	++
349	BA349	–	–	+++	++
350	BA350	–	–	–	++
351	BA351	–	–	–	–
352	BA352	–	–	+++	++
353	BA353	–	–	–	–
354	BA354	–	–	+++	++
355	BA355	–	–	–	++
356	BA356	–	–	+++	++
357	BA357	–	–	+++	++
358	BA358	–	–	+++	++
359	BA359	–	–	+++	++
360	BA360	–	–	–	–
361	BA361	–	–	+++	++
362	BA362	–	+	+++	+++
363	BA363	–	–	+++	++
364	BA364	–	–	+++	++
365	BA365	–	–	+++	++
366	BA366	–	–	+++	++
367	BA367	–	–	+++	++
368	BA368	–	–	+++	+++
369	BA369	–	–	+++	++
370	BA370	–	–	–	++
371	BA371	–	–	–	–
372	BA372	–	–	+++	++
373	BA373	–	–	+++	++
374	BA374	–	–	–	–
375	BA375	–	–	+++	++
376	BA376	–	–	+++	++

Çizelge 4.1 Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının aminoasit dekarboksilaz aktiviteleri (devam)

No	İzolat No	Aminoasit Dekarboksilaz Aktiviteleri			
		Kadaverin	Putresin	Tiramin	Histamin
377	BA377	–	–	+++	++
378	BA378	–	–	–	–
379	BA379	–	–	–	–
380	BA380	–	–	+++	++
381	BA381	–	–	+++	++
382	BA382	–	–	+	++
383	BA383	–	–	–	–
384	BA384	–	–	–	++
385	BA385	–	–	–	–
386	BA386	–	–	–	–
387	BA387	–	–	+++	++
388	BA388	–	+	+++	+++
389	BA389	–	–	–	–
390	BA390	–	–	+++	++
391	BA391	–	–	+	++

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

(+): Zayıf üretici (Broth ortamda görülen hafif mor renk)

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

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

276 enterokok suşunun histamin üreticisi olduğu tespit edilirken, 115'inin histamin üreticisi olmadığı saptanmıştır. 250 izolat orta derecede histamin üreticisi olarak tespit edilirken, 1 izolat zayıf üretici olarak tanımlanmıştır. 25 izolat ise güçlü histamin üreticisi (BA17, BA33, BA46, BA60, BA71, BA92, BA125, BA147, BA184, BA188, BA206, BA236, BA251, BA262, BA271, BA280, BA298, BA307, BA310, BA323, BA334, BA343, BA362, BA368 ve BA388) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Tez çalışmasında enterokok suşları tarafından histaminden sonra en fazla üretilen biyojen aminin tiramin olduğu saptanmıştır. Toplamda 179 suşun tiramin üreticisi olduğu tespit edilirken, 212'sinin tiramin üretmediği saptanmıştır. 7 izolat zayıf tiramin üreticisi olarak tespit edilirken, 172 izolat ise güçlü tiramin üreticisi (BA1, BA3, BA6, BA8, BA13, BA33, BA34, BA36, BA37, BA38, BA39, BA42, BA43, BA57, BA60,

BA67, BA69, BA71, BA76, BA90, BA92, BA93, BA98, BA100, BA101, BA108, BA111, BA112, BA119, BA123, BA125, BA130, BA132, BA133, BA134, BA136, BA138, BA139, BA145, BA147, BA150, BA151, BA152, BA153, BA157, BA158, BA163, BA164, BA165, BA166, BA176, BA180, BA181, BA182, BA183, BA184, BA187, BA188, BA193, BA197, BA198, BA199, BA204, BA206, BA208, BA209, BA212, BA213, BA214, BA215, BA221, BA222, BA223, BA224, BA226, BA227, BA228, BA230, BA231, BA233, BA234, BA236, BA240, BA241, BA242, BA243, BA244, BA245, BA247, BA248, BA251, BA257, BA259, BA260, BA262, BA263, BA264, BA266, BA268, BA269, BA270, BA271, BA274, BA275, BA276, BA277, BA278, BA280, BA284, BA285, BA286, BA287, BA288, BA290, BA291, BA292, BA294, BA295, BA298, BA299, BA300, BA301, BA302, BA307, BA310, BA313, BA315, BA316, BA323, BA325, BA327, BA328, BA329, BA330, BA331, BA332, BA334, BA338, BA340, BA341, BA343, BA344, BA345, BA346, BA347, BA348, BA349, BA352, BA354, BA356, BA357, BA358, BA359, BA361, BA362, BA363, BA364, BA365, BA366, BA367, BA368, BA369, BA372, BA373, BA375, BA376, BA377, BA380, BA381, BA387, BA388 ve BA390) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

13 enterokok suşunun kadaverin üreticisi olduğu, 378 suşun ise kadaverin üreticisi olmadığı tespit edilmiştir. 10 enterokok suşu zayıf kadaverin üreticisi olarak tanımlanırken, 3'ü güçlü kadaverin üreticisi (BA17, BA33, BA188) olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.1).

Tez çalışması kapsamında 21 enterokok izolatu putresin üreticisi olarak belirlenmiştir. Bu suşlardan 3'ü (BA17, BA33 ve BA188) güçlü, 18'i ise zayıf putresin üreticisi olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.1).

Çalışmada, BA33 ve BA188 izolatları, dört biyogen amin bakımından güçlü üreticiler olarak tespit edilmiştir. Enterokok izolatları tarafından farklı düzeylerde üretilen biyogen aminlerin sayı bakımından kıyaslanması ise Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Enterokok izolatları tarafından üretilen biyojen amin sayılarının kıyaslanması

Biyojen amin sayısı	İzolat sayısı	İzolat No
4 biyojen amin	10	BA33, BA125, BA184, BA188, BA251, BA280, BA307, BA310, BA334 ve BA343
3 biyojen amin	13	BA17, BA46, BA60, BA92, BA147, BA206, BA236, BA262, BA271, BA298, BA323, BA362 ve BA388
2 biyojen amin	157	BA1, BA3, BA6, BA8, BA13, BA34, BA36, BA37, BA38, BA39, BA42, BA43, BA57, BA67, BA69, BA71, BA75, BA76, BA90, BA93, BA94, BA98, BA100, BA101, BA108, BA111, BA112, BA119, BA120, BA123, BA130, BA132, BA133, BA134, BA136, BA138, BA139, BA145, BA150, BA151, BA152, BA153, BA157, BA158, BA163, BA164, BA165, BA166, BA176, BA180, BA181, BA182, BA183, BA187, BA193, BA197, BA198, BA199, BA204, BA205, BA208, BA209, BA212, BA213, BA214, BA215, BA221, BA222, BA223, BA224, BA226, BA227, BA228, BA230, BA231, BA233, BA234, BA240, BA241, BA242, BA243, BA244, BA245, BA247, BA248, BA257, BA259, BA260, BA263, BA264, BA266, BA268, BA269, BA270, BA274, BA275, BA276, BA277, BA278, BA284, BA285, BA286, BA287, BA288, BA290, BA291, BA292, BA294, BA295, BA299, BA300, BA301, BA302, BA313, BA315, BA316, BA325, BA327, BA328, BA329, BA330, BA331, BA332, BA338, BA340, BA341, BA344, BA345, BA346, BA347, BA348, BA349, BA352, BA354, BA356, BA357, BA358, BA359, BA361, BA363, BA364, BA365, BA366, BA367, BA368, BA369, BA372, BA373, BA375, BA376, BA377, BA380, BA381, BA382, BA387, BA390 ve BA391

Çizelge 4.2 Enterokok izolatları tarafından üretilen biyojen amin sayılarının kıyaslanması (devam)

Biyojen amin sayısı	İzolat sayısı	İzolat No
1 biyojen amin	96	BA7, BA14, BA15, BA20, BA22, BA23, BA27, BA29, BA41, BA45, BA49, BA50, BA52, BA54, BA56, BA59, BA61, BA62, BA63, BA64, BA77, BA80, BA84, BA85, BA86, BA88, BA91, BA95, BA97, BA102, BA104, BA106, BA107, BA113, BA114, BA115, BA117, BA121, BA122, BA124, BA126, BA128, BA135, BA140, BA142, BA143, BA146, BA148, BA155, BA156, BA161, BA162, BA167, BA169, BA170, BA171, BA173, BA175, BA177, BA189, BA194, BA195, BA196, BA202, BA203, BA210, BA211, BA217, BA218, BA225, BA229, BA235, BA238, BA239, BA246, BA249, BA252, BA253, BA254, BA261, BA267, BA272, BA279, BA282, BA293, BA296, BA303, BA308, BA318, BA321, BA322, BA333, BA350, BA355, BA370 ve BA384
Biyojen amin üreticisi olmayan	115	BA2, BA4, BA5, BA9, BA10, BA11, BA12, BA16, BA18, BA19, BA21, BA24, BA25, BA26, BA28, BA30, BA31, BA32, BA35, BA40, BA44, BA47, BA48, BA51, BA53, BA55, BA58, BA65, BA66, BA68, BA70, BA72, BA73, BA74, BA78, BA79, BA81, BA82, BA83, BA87, BA89, BA96, BA99, BA103, BA105, BA109, BA110, BA116, BA118, BA127, BA129, BA131, BA137, BA141, BA144, BA149, BA154, BA159, BA160, BA168, BA172, BA174, BA178, BA179, BA185, BA186, BA190, BA191, BA192, BA200, BA201, BA207, BA216, BA219, BA220, BA232, BA237, BA250, BA255, BA256, BA258, BA265, BA273, BA281, BA283, BA289, BA297, BA304, BA305, BA306, BA309, BA311, BA312, BA314, BA317, BA319, BA320, BA324, BA326, BA335, BA336, BA337, BA339, BA342, BA351, BA353, BA360, BA371, BA374, BA378, BA379, BA383, BA385, BA386 ve BA389

Enterokok suşları tarafından en fazla üretilen biyojen aminin histamin ve tiramin olduğu çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir (Marcobal vd. 2004, Reviriego vd. 2005, Burdychova ve Komprda 2007, Muñoz-Atienza vd. 2011, Schirone vd. 2013, Tabanelli vd. 2014, Espinosa-Pesqueira vd. 2018, Merabti vd. 2019). Tez çalışmamızda enterokok izolatları tarafından en fazla histamin ve tiramin üretilmesi, literatür verilerini destekler niteliktedir. Benzer şekilde çeşitli araştırmalarda enterokok suşlarının birden fazla biyojen amini aynı anda üretebilme yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır (Ladero vd. 2011, Pleva vd. 2012, Benkerroum 2016, Alfaia vd. 2018, Espinosa-Pesqueira vd. 2018, del Rio vd. 2019). Tez çalışmamızda elde edilen veriler literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur.

4.3 Biyojen Amin Üreticisi Enterokok İzolatlarının Biyokimyasal Tanımlamasının Yapılması

Tez çalışmamızda enterokok izolatlarının 276'sının en az bir biyojen amin üretebilme yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Toplam 276 izolat biyokimyasal tanımlama testlerine tabi tutulmuştur. Enterokok izolatlarına eskulin hidrolizi, %6,5 NaCl'de gelişim, 10-45°C'de gelişim, pH 9,6'da gelişme ve hemoliz doğrulama testleri uygulanmıştır.

Enterococcus spp. eskulin hidrolizi pozitif olan, %6,5 NaCl'de, 10-45°C'de ve pH 9,6'da gelişim gösterebilen mikroorganizmalardır (Sanlibaba vd. 2018, Giraffa 2022). Çalışma kapsamında bu özellikleri gösteren 276 izolat *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmıştır. Hemoliz testi sonuçlarına göre ise; 173 izolatın α -hemolitik, 17 izolatın β -hemolitik ve 86 izolatın γ -hemolitik olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Enterokok izolatlarının kısmi karakterizasyonu

No	İzolat No	Eskulin Hidrolizi	%6,5 NaCl'de gelişim	Hemoliz Testi	10°C'de Gelişim	45°C'de Gelişim	pH 9,6'da Gelişim
1	BA1	+	+	α -hemolitik	+	+	+
2	BA3	+	+	α -hemolitik	+	+	+
3	BA6	+	+	α -hemolitik	+	+	+
4	BA7	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
5	BA8	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
6	BA13	+	+	α -hemolitik	+	+	+
7	BA14	+	+	α -hemolitik	+	+	+
8	BA15	+	+	α -hemolitik	+	+	+
9	BA17	+	+	β -hemolitik	+	+	+
10	BA20	+	+	α -hemolitik	+	+	+
11	BA22	+	+	α -hemolitik	+	+	+
12	BA23	+	+	α -hemolitik	+	+	+
13	BA27	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
14	BA29	+	+	α -hemolitik	+	+	+
15	BA33	+	+	α -hemolitik	+	+	+
16	BA34	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
17	BA36	+	+	α -hemolitik	+	+	+
18	BA37	+	+	α -hemolitik	+	+	+
19	BA38	+	+	α -hemolitik	+	+	+
20	BA39	+	+	α -hemolitik	+	+	+
21	BA41	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
22	BA42	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
23	BA43	+	+	α -hemolitik	+	+	+
24	BA45	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
25	BA46	+	+	β -hemolitik	+	+	+
26	BA49	+	+	α -hemolitik	+	+	+
27	BA50	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
28	BA52	+	+	α -hemolitik	+	+	+
29	BA54	+	+	α -hemolitik	+	+	+
30	BA56	+	+	α -hemolitik	+	+	+
31	BA57	+	+	α -hemolitik	+	+	+
32	BA59	+	+	α -hemolitik	+	+	+
33	BA60	+	+	α -hemolitik	+	+	+
34	BA61	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
35	BA62	+	+	α -hemolitik	+	+	+
36	BA63	+	+	α -hemolitik	+	+	+
37	BA64	+	+	α -hemolitik	+	+	+
38	BA67	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
39	BA69	+	+	α -hemolitik	+	+	+

Çizelge 4.3 Enterokok izolatların kısmi karakterizasyonu (devamı)

No	İzolat No	Eskulin Hidrolizi	%6,5 NaCl'de gelişim	Hemoliz Testi	10°C'de Gelişim	45°C'de Gelişim	pH 9,6'da Gelişim
40	BA71	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
41	BA75	+	+	α-hemolitik	+	+	+
42	BA76	+	+	α-hemolitik	+	+	+
43	BA77	+	+	α-hemolitik	+	+	+
44	BA80	+	+	α-hemolitik	+	+	+
45	BA84	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
46	BA85	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
47	BA86	+	+	α-hemolitik	+	+	+
48	BA88	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
49	BA90	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
50	BA91	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
51	BA92	+	+	α-hemolitik	+	+	+
52	BA93	+	+	α-hemolitik	+	+	+
53	BA94	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
54	BA95	+	+	α-hemolitik	+	+	+
55	BA97	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
56	BA98	+	+	α-hemolitik	+	+	+
57	BA100	+	+	α-hemolitik	+	+	+
58	BA101	+	+	α-hemolitik	+	+	+
59	BA102	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
60	BA104	+	+	α-hemolitik	+	+	+
61	BA106	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
62	BA107	+	+	β-hemolitik	+	+	+
63	BA108	+	+	α-hemolitik	+	+	+
64	BA111	+	+	α-hemolitik	+	+	+
65	BA112	+	+	α-hemolitik	+	+	+
66	BA113	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
67	BA114	+	+	β-hemolitik	+	+	+
68	BA115	+	+	α-hemolitik	+	+	+
69	BA117	+	+	α-hemolitik	+	+	+
70	BA119	+	+	α-hemolitik	+	+	+
71	BA120	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
72	BA121	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
73	BA122	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
74	BA123	+	+	α-hemolitik	+	+	+
75	BA124	+	+	α-hemolitik	+	+	+
76	BA125	+	+	α-hemolitik	+	+	+
77	BA126	+	+	α-hemolitik	+	+	+
78	BA128	+	+	γ-hemolitik	+	+	+

Çizelge 4.3 Enterokok izolatların kısmi karakterizasyonu (devamı)

No	İzolat No	Eskulin Hidrolizi	%6,5 NaCl'de gelişim	Hemoliz Testi	10°C'de Gelişim	45°C'de Gelişim	pH 9,6'da Gelişim
79	BA130	+	+	α -hemolitik	+	+	+
80	BA132	+	+	β -hemolitik	+	+	+
81	BA133	+	+	α -hemolitik	+	+	+
82	BA134	+	+	α -hemolitik	+	+	+
83	BA135	+	+	α -hemolitik	+	+	+
84	BA136	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
85	BA138	+	+	β -hemolitik	+	+	+
86	BA139	+	+	α -hemolitik	+	+	+
87	BA140	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
88	BA142	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
89	BA143	+	+	α -hemolitik	+	+	+
90	BA145	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
91	BA146	+	+	α -hemolitik	+	+	+
92	BA147	+	+	α -hemolitik	+	+	+
93	BA148	+	+	α -hemolitik	+	+	+
94	BA150	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
95	BA151	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
96	BA152	+	+	α -hemolitik	+	+	+
97	BA153	+	+	α -hemolitik	+	+	+
98	BA155	+	+	α -hemolitik	+	+	+
99	BA156	+	+	α -hemolitik	+	+	+
100	BA157	+	+	α -hemolitik	+	+	+
101	BA158	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
102	BA161	+	+	α -hemolitik	+	+	+
103	BA162	+	+	α -hemolitik	+	+	+
104	BA163	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
105	BA164	+	+	α -hemolitik	+	+	+
106	BA165	+	+	α -hemolitik	+	+	+
107	BA166	+	+	α -hemolitik	+	+	+
108	BA167	+	+	α -hemolitik	+	+	+
109	BA169	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
110	BA170	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
111	BA171	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
112	BA173	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
113	BA175	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
114	BA176	+	+	α -hemolitik	+	+	+
115	BA177	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
116	BA180	+	+	α -hemolitik	+	+	+
117	BA181	+	+	α -hemolitik	+	+	+

Çizelge 4.3 Enterokok izolatların kısmi karakterizasyonu (devamı)

No	İzolat No	Eskulin Hidrolizi	%6,5 NaCl'de gelişim	Hemoliz Testi	10°C'de Gelişim	45°C'de Gelişim	pH 9,6'da Gelişim
118	BA182	+	+	α -hemolitik	+	+	+
119	BA183	+	+	α -hemolitik	+	+	+
120	BA184	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
121	BA187	+	+	β -hemolitik	+	+	+
122	BA188	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
123	BA189	+	+	α -hemolitik	+	+	+
124	BA193	+	+	α -hemolitik	+	+	+
125	BA194	+	+	α -hemolitik	+	+	+
126	BA195	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
127	BA196	+	+	α -hemolitik	+	+	+
128	BA197	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
129	BA198	+	+	α -hemolitik	+	+	+
130	BA199	+	+	α -hemolitik	+	+	+
131	BA202	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
132	BA203	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
133	BA204	+	+	β -hemolitik	+	+	+
134	BA205	+	+	α -hemolitik	+	+	+
135	BA206	+	+	α -hemolitik	+	+	+
136	BA208	+	+	α -hemolitik	+	+	+
137	BA209	+	+	α -hemolitik	+	+	+
138	BA210	+	+	α -hemolitik	+	+	+
139	BA211	+	+	α -hemolitik	+	+	+
140	BA212	+	+	α -hemolitik	+	+	+
141	BA213	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
142	BA214	+	+	α -hemolitik	+	+	+
143	BA215	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
144	BA217	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
145	BA218	+	+	α -hemolitik	+	+	+
146	BA221	+	+	α -hemolitik	+	+	+
147	BA222	+	+	α -hemolitik	+	+	+
148	BA223	+	+	α -hemolitik	+	+	+
149	BA224	+	+	α -hemolitik	+	+	+
150	BA225	+	+	α -hemolitik	+	+	+
151	BA226	+	+	α -hemolitik	+	+	+
152	BA227	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
153	BA228	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
154	BA229	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
155	BA230	+	+	α -hemolitik	+	+	+
156	BA231	+	+	γ -hemolitik	+	+	+

Çizelge 4.3 Enterokok izolatların kısmi karakterizasyonu (devamı)

No	İzolat No	Eskulin Hidrolizi	%6,5 NaCl'de gelişim	Hemoliz Testi	10°C'de Gelişim	45°C'de Gelişim	pH 9,6'da Gelişim
157	BA233	+	+	α-hemolitik	+	+	+
158	BA234	+	+	α-hemolitik	+	+	+
159	BA235	+	+	α-hemolitik	+	+	+
160	BA236	+	+	β-hemolitik	+	+	+
161	BA238	+	+	α-hemolitik	+	+	+
162	BA239	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
163	BA240	+	+	α-hemolitik	+	+	+
164	BA241	+	+	α-hemolitik	+	+	+
165	BA242	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
166	BA243	+	+	α-hemolitik	+	+	+
167	BA244	+	+	α-hemolitik	+	+	+
168	BA245	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
169	BA246	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
170	BA247	+	+	α-hemolitik	+	+	+
171	BA248	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
172	BA249	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
173	BA251	+	+	β-hemolitik	+	+	+
174	BA252	+	+	α-hemolitik	+	+	+
175	BA253	+	+	α-hemolitik	+	+	+
176	BA254	+	+	α-hemolitik	+	+	+
177	BA257	+	+	α-hemolitik	+	+	+
178	BA259	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
179	BA260	+	+	α-hemolitik	+	+	+
180	BA261	+	+	α-hemolitik	+	+	+
181	BA262	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
182	BA263	+	+	α-hemolitik	+	+	+
183	BA264	+	+	α-hemolitik	+	+	+
184	BA266	+	+	α-hemolitik	+	+	+
185	BA267	+	+	α-hemolitik	+	+	+
186	BA268	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
187	BA269	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
188	BA270	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
189	BA271	+	+	α-hemolitik	+	+	+
190	BA272	+	+	α-hemolitik	+	+	+
191	BA274	+	+	α-hemolitik	+	+	+
192	BA275	+	+	α-hemolitik	+	+	+
193	BA276	+	+	α-hemolitik	+	+	+
194	BA277	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
195	BA278	+	+	α-hemolitik	+	+	+

Çizelge 4.3 Enterokok izolatların kısmi karakterizasyonu (devamı)

No	İzolat No	Eskulin Hidrolizi	%6,5 NaCl'de gelişim	Hemoliz Testi	10°C'de Gelişim	45°C'de Gelişim	pH 9,6'da Gelişim
196	BA279	+	+	α-hemolitik	+	+	+
197	BA280	+	+	α-hemolitik	+	+	+
198	BA282	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
199	BA284	+	+	α-hemolitik	+	+	+
200	BA285	+	+	α-hemolitik	+	+	+
201	BA286	+	+	β-hemolitik	+	+	+
202	BA287	+	+	α-hemolitik	+	+	+
203	BA288	+	+	α-hemolitik	+	+	+
204	BA290	+	+	α-hemolitik	+	+	+
205	BA291	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
206	BA292	+	+	α-hemolitik	+	+	+
207	BA293	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
208	BA294	+	+	α-hemolitik	+	+	+
209	BA295	+	+	α-hemolitik	+	+	+
210	BA296	+	+	α-hemolitik	+	+	+
211	BA298	+	+	α-hemolitik	+	+	+
212	BA299	+	+	α-hemolitik	+	+	+
213	BA300	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
214	BA301	+	+	α-hemolitik	+	+	+
215	BA302	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
216	BA303	+	+	β-hemolitik	+	+	+
217	BA307	+	+	α-hemolitik	+	+	+
218	BA308	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
219	BA310	+	+	α-hemolitik	+	+	+
220	BA313	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
221	BA315	+	+	α-hemolitik	+	+	+
222	BA316	+	+	α-hemolitik	+	+	+
223	BA318	+	+	α-hemolitik	+	+	+
224	BA321	+	+	α-hemolitik	+	+	+
225	BA322	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
226	BA323	+	+	α-hemolitik	+	+	+
227	BA325	+	+	α-hemolitik	+	+	+
228	BA327	+	+	α-hemolitik	+	+	+
229	BA328	+	+	α-hemolitik	+	+	+
230	BA329	+	+	α-hemolitik	+	+	+
231	BA330	+	+	α-hemolitik	+	+	+
232	BA331	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
233	BA332	+	+	γ-hemolitik	+	+	+
234	BA333	+	+	α-hemolitik	+	+	+

Çizelge 4.3 Enterokok izolatların kısmi karakterizasyonu (devamı)

No	İzolat No	Eskulin Hidrolizi	%6,5 NaCl'de gelişim	Hemoliz Testi	10°C'de Gelişim	45°C'de Gelişim	pH 9,6'da Gelişim
235	BA334	+	+	α -hemolitik	+	+	+
236	BA338	+	+	β -hemolitik	+	+	+
237	BA340	+	+	α -hemolitik	+	+	+
238	BA341	+	+	β -hemolitik	+	+	+
239	BA343	+	+	α -hemolitik	+	+	+
240	BA344	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
241	BA345	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
242	BA346	+	+	β -hemolitik	+	+	+
243	BA347	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
244	BA348	+	+	α -hemolitik	+	+	+
245	BA349	+	+	α -hemolitik	+	+	+
246	BA350	+	+	α -hemolitik	+	+	+
247	BA352	+	+	α -hemolitik	+	+	+
248	BA354	+	+	α -hemolitik	+	+	+
249	BA355	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
250	BA356	+	+	α -hemolitik	+	+	+
251	BA357	+	+	α -hemolitik	+	+	+
252	BA358	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
253	BA359	+	+	α -hemolitik	+	+	+
254	BA361	+	+	α -hemolitik	+	+	+
255	BA362	+	+	α -hemolitik	+	+	+
256	BA363	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
257	BA364	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
258	BA365	+	+	β -hemolitik	+	+	+
259	BA366	+	+	α -hemolitik	+	+	+
260	BA367	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
261	BA368	+	+	α -hemolitik	+	+	+
262	BA369	+	+	α -hemolitik	+	+	+
263	BA370	+	+	α -hemolitik	+	+	+
264	BA372	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
265	BA373	+	+	α -hemolitik	+	+	+
266	BA375	+	+	α -hemolitik	+	+	+
267	BA376	+	+	α -hemolitik	+	+	+
268	BA377	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
269	BA380	+	+	γ -hemolitik	+	+	+
270	BA381	+	+	α -hemolitik	+	+	+
271	BA382	+	+	α -hemolitik	+	+	+
272	BA384	+	+	α -hemolitik	+	+	+
273	BA387	+	+	γ -hemolitik	+	+	+

Çizelge 4.3 Enterokok izolatların kısmi karakterizasyonu (devamı)

No	İzolat No	Eskulin Hidrolizi	%6,5 NaCl'de gelişim	Hemoliz Testi	10°C'de Gelişim	45°C'de Gelişim	pH 9,6'da Gelişim
274	BA388	+	+	β-hemolitik	+	+	+
275	BA390	+	+	α-hemolitik	+	+	+
276	BA391	+	+	α-hemolitik	+	+	+

4.4 *Enterococcus* Suşları Tarafından Üretilen Biyojen Amin Miktarının HPLC Metodu ile Saptanması

Enterococcus spp. suşları tarafından peynirde en fazla üretilen biyojen aminin histamin olduğu çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir (Barbieri vd. 2019, Merabti vd. 2019, Hu vd. 2021). Literatür verileri temel alınarak, tez çalışmasının bundan sonraki aşamasına, güçlü histamin üreticisi olarak tanımlanan 25 enterokok izolatı ile devam edilmiştir. Seçilen bu izolatların aynı zamanda tiramin, kadaverin ve putresin üreticisi olmasına dikkat edilmiştir (Çizelge 4.4).

Tez çalışması kapsamında histamin, tiramin, kadaverin ve putresin üretme yetenekleri açısından toplam 25 enterokok izolatının üretmiş olduğu biyojen amin miktarları HPLC analizi ile belirlenmiştir. HPLC analizleri sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 HPLC analizine tabi tutulan biyojen amin üreticisi enterokok izolatları

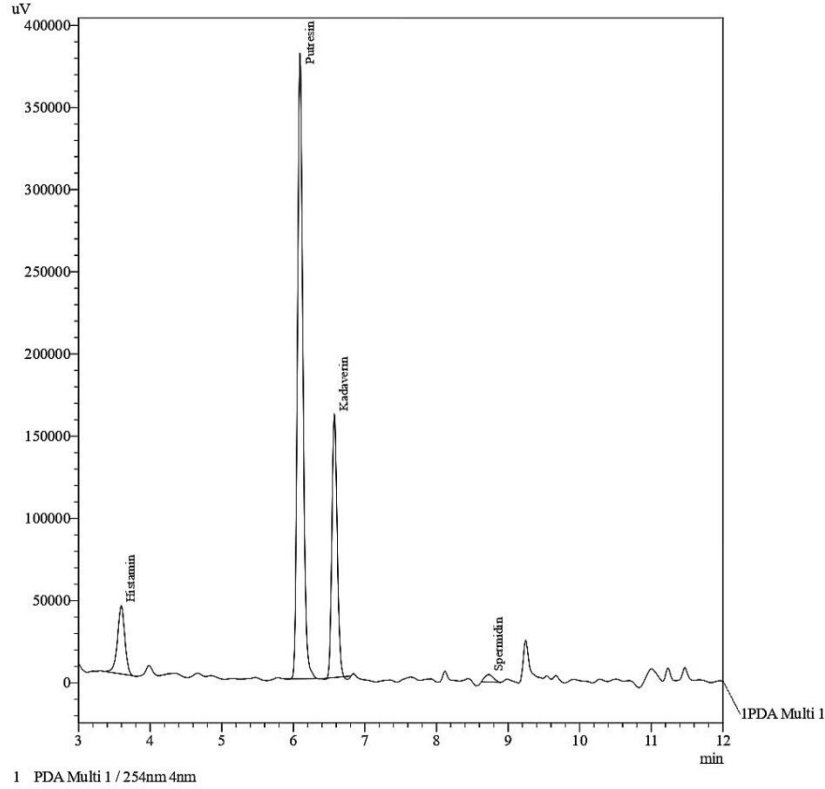
No	İzolat No	Aminoasit Dekarboksilaz Aktiviteleri			
		Kadaverin	Putresin	Tiramin	Histamin
1	BA17	+++	+++	–	+++
2	BA33	+++	+++	+++	+++
3	BA46	+	–	+	+++
4	BA60	+	–	+++	+++
5	BA71	–	–	+++	+++
6	BA92	–	+	+++	+++
7	BA125	+	+	+++	+++
8	BA147	–	+	+++	+++
9	BA184	+	+	+++	+++
10	BA188	+++	+++	+++	+++
11	BA206	–	+	+++	+++
12	BA236	–	+	+++	+++
13	BA251	+	+	+++	+++
14	BA262	–	+	+++	+++
15	BA271	–	+	+++	+++
16	BA280	+	+	+++	+++
17	BA298	–	+	+++	+++
18	BA307	+	+	+++	+++
19	BA310	+	+	+++	+++
20	BA323	–	+	+++	+++
21	BA334	+	+	+++	+++
22	BA343	+	+	+++	+++
23	BA362	–	+	+++	+++
24	BA368	–	–	+++	+++
25	BA388	–	+	+++	+++

(-): Üretici değil

(+): Zayıf üretici

(+++): Güçlü üretici

Sample Information
Sample Name : Sample 1
Vali# : 26
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Sample 1.lcd
Method Filename : BA.lcm
Data Processed : 25/11/2021 14:28:33



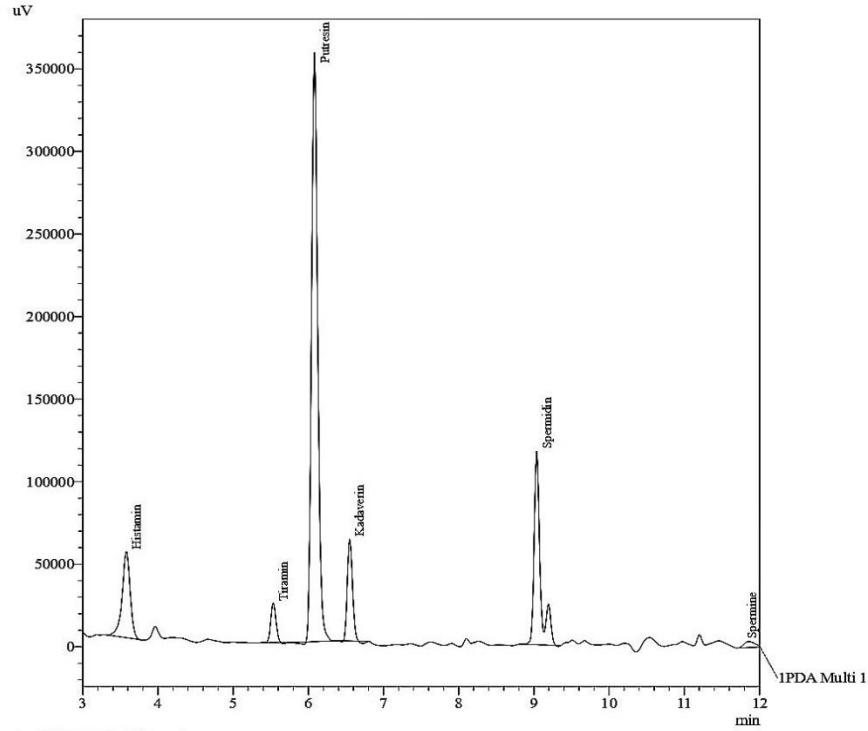
Quantitative Results				
PDA				
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.591	297006	14.874	mg/L
Tiramin	0.000	0	0.000	mg/L
Putresin	6.088	2019924	96.169	mg/L
Kadaverin	6.569	814374	52.433	mg/L

Şekil 4.1 BA17 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA17 suşu tarafından en fazla miktarda üretilen biyojen aminin 96,169 mg/L ile putresin olduğu tespit edilmiştir. Putresini 52,433 mg/L ile kadaverin ve 14,874 mg/L ile histamin izlemiştir. Bununla birlikte, BA17 kodlu suşun tiramin üreticisi olmadığı belirlenmiştir. BA17 suşuna ait HPLC analizi sonuçları, aminoasit dekarboksilaz testi sonuçlarını doğrulamaktadır. Bu doğrultuda BA17 suşunun putresin, kadaverin ve histaminin güçlü üreticisi olduğu, ancak tiraminin üreticisi olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

Sample Name : Sample 2
 Vial# : 25
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 2.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 30/11/2021 10:08:39

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

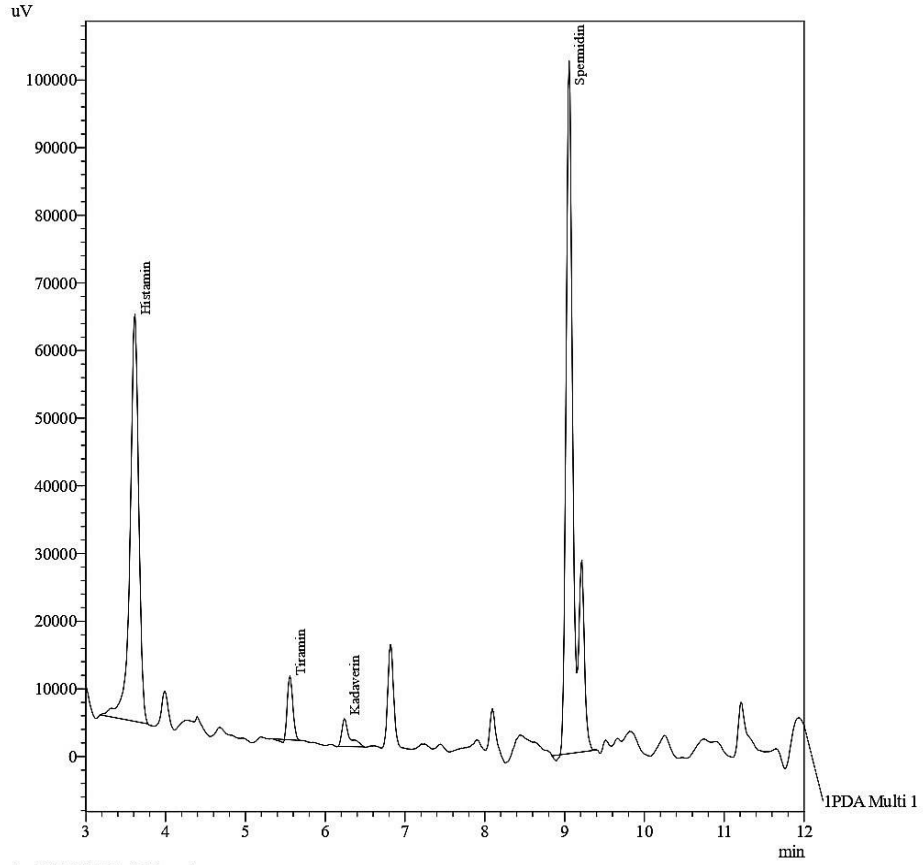
Quantitative Results

Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.574	390159	19.269	mg/L
Tiranin	5.528	115991	6.333	mg/L
Putresin	6.076	2037038	96.977	mg/L
Kadaverin	6.545	290244	19.290	mg/L

Şekil 4.2 BA33 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA33 suşunun tez çalışmasında varlığı incelenen dört biyojen aminin de üretiminden sorumlu olduğu belirlenmiştir. Bu doğrultuda HPLC analizleri ile aminoasit dekarboksilaz testi sonuçları benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.4.). HPLC analizi sonuçlarına göre, BA33 suşunun 96,977 mg/L konsantrasyon ile en fazla putresin ürettiği tespit edilmiştir. Üretilen putresin miktarını sırasıyla kadaverin, histamin ve tiramin izlemiş olup, konsantrasyonları sırasıyla 19,290 mg/L, 19,269 mg/L ve 6,333 mg/L olarak belirlenmiştir.

Sample Information
Sample Name : Sample 3
Vial# : 24
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Sample 3.lcd
Method Filename : BA.lcm
Data Processed : 25/11/2021 14:11:15



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Quantitative Results

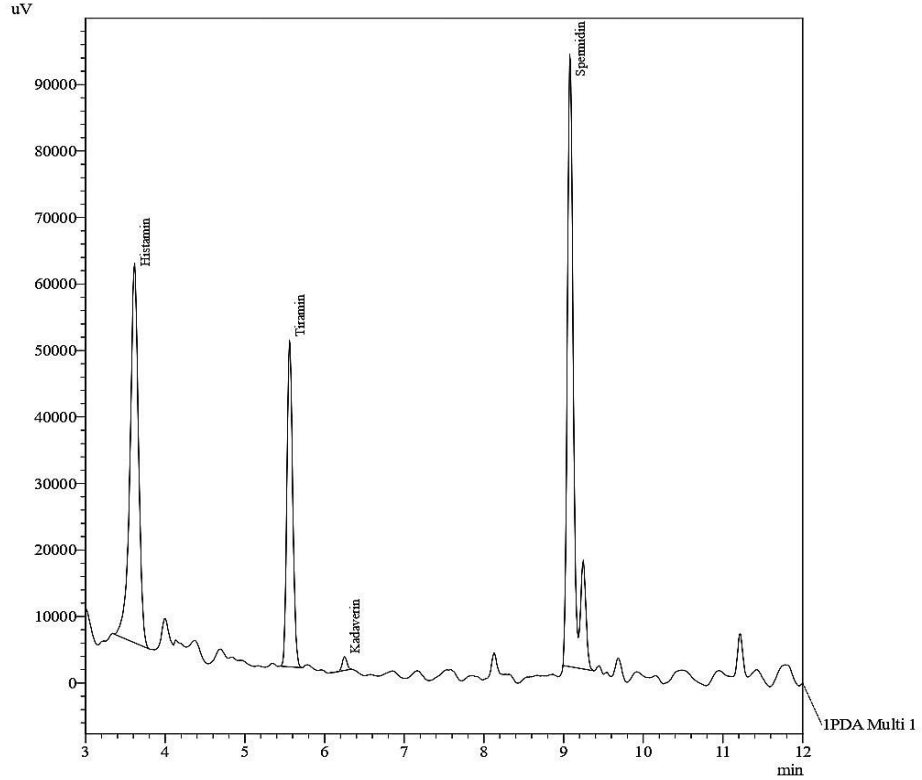
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.607	458345	22.487	mg/L
Tiramın	5.552	43263	2.901	mg/L
Putresin	0.000	0	0.000	mg/L
Kadaverin	6.236	27157	2.653	mg/L

Şekil 4.3 BA46 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

HPLC analizi sonuçlarına göre, BA46 suşunun histamin, tiramin ve kadaverin üreticisi olduğu ve bu biyojen aminlerin konsantrasyonlarının sırasıyla 22,487 mg/L, 2,901 mg/L ve 2,653 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın, BA46 suşunun putresin üretmediği belirlenmiştir. Aminoasit dekarboksilaz testi sonuçları da HPLC analizi sonucu elde edilen verileri destekler nitelikte (Çizelge 4.4).

Sample Name : Sample 4
 Vial# : 23
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 4.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 30/11/2021 10:09:22

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Quantitative Results

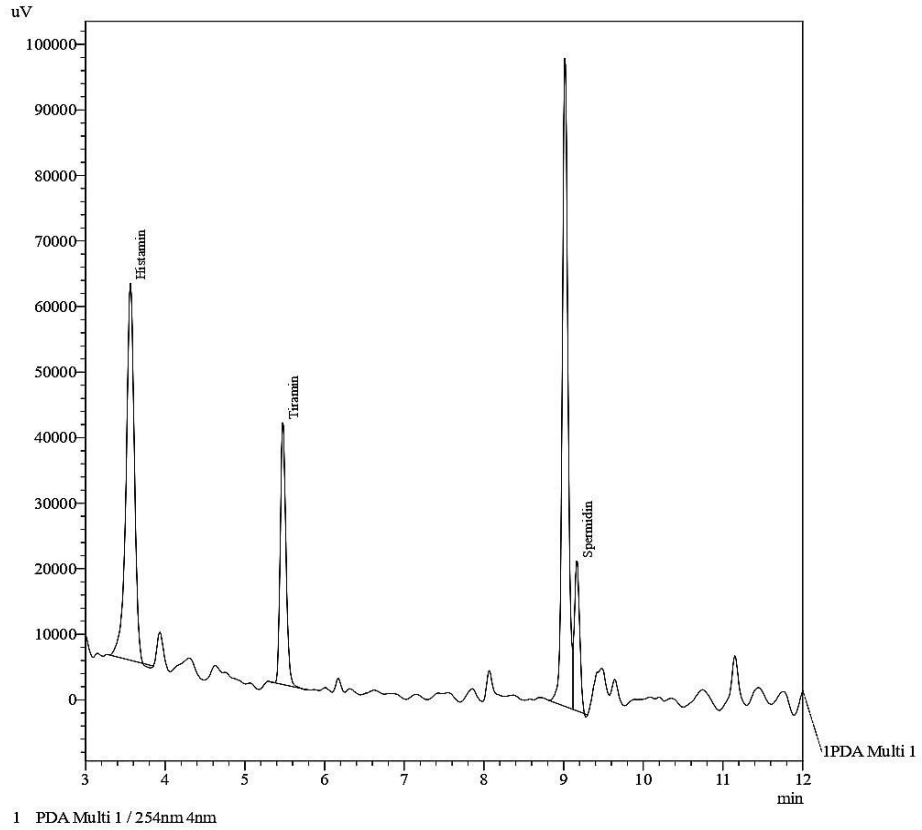
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.608	421632	20.754	mg/L
Tiramin	5.556	247212	12.524	mg/L
Putresin	0.000	0	0.000	mg/L
Kadaverin	6.246	8441	1.470	mg/L

Şekil 4.4 BA60 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

HPLC analizi ve aminoasit dekarboksilaz testi sonuçlarına göre BA60 suşunun histamin, tiramin ve kadaverin üreticisi olduğu belirlenirken; putresin üreticisi olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4). 20,754 mg/L konsantrasyon ile histamin, BA60 suşu tarafından en fazla üretilen biyojen amin olmuştur. Histamini 12,524 mg/L ile tiramin izlemiştir. Bununla birlikte, BA60 suşunun kadaverini 1,470 mg/L konsantrasyonu ile düşük miktarda ürettiği tespit edilmiştir.

Sample Name : Sample 5
 Vial# : 22
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 5.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:10:52

Sample Information



PDA

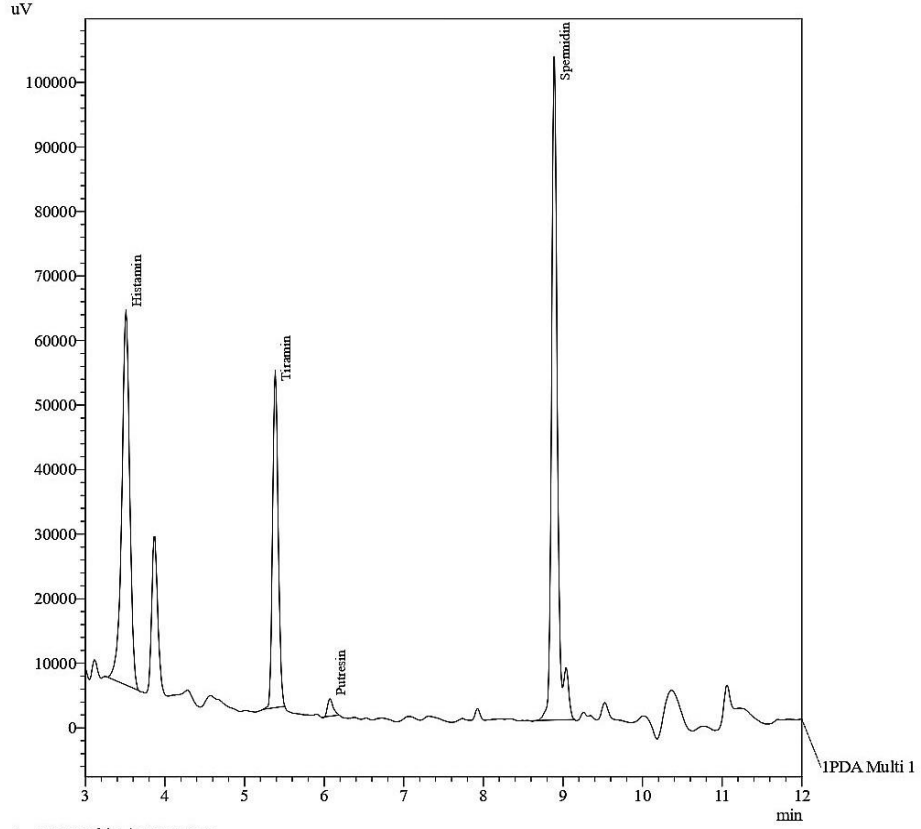
Quantitative Results

Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.558	411614	20.282	mg/L
Tiramin	5.471	197362	10.172	mg/L
Putresin	0.000	0	0.000	mg/L
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L

Şekil 4.5 BA71 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

Aminoasit dekarboksilaz testi sonuçlarına göre BA71 suşunun histamin ve tiramin üreticisi olduğu belirlenmiştir. HPLC analizi sonuçlarına göre de bu suşun histamin ve tiramin üreticisi olduğu ve bu suş tarafından en yüksek konsantrasyonda üretilen biyojen aminin 20,282 mg/L ile histamin olduğu saptanmıştır. Tiramin konsantrasyonu ise 10,172 mg/L olarak bulunmuştur. BA71 suşu tarafından putresin ve kadaverinin üretilmediği her iki analizin sonuçlarıyla da doğrulanmıştır (Çizelge 4.4).

Sample Information
Sample Name : Sample 6
Vial# : 21
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Sample 6.lcd
Method Filename : BA.lcm
Data Processed : 25/11/2021 14:10:45



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

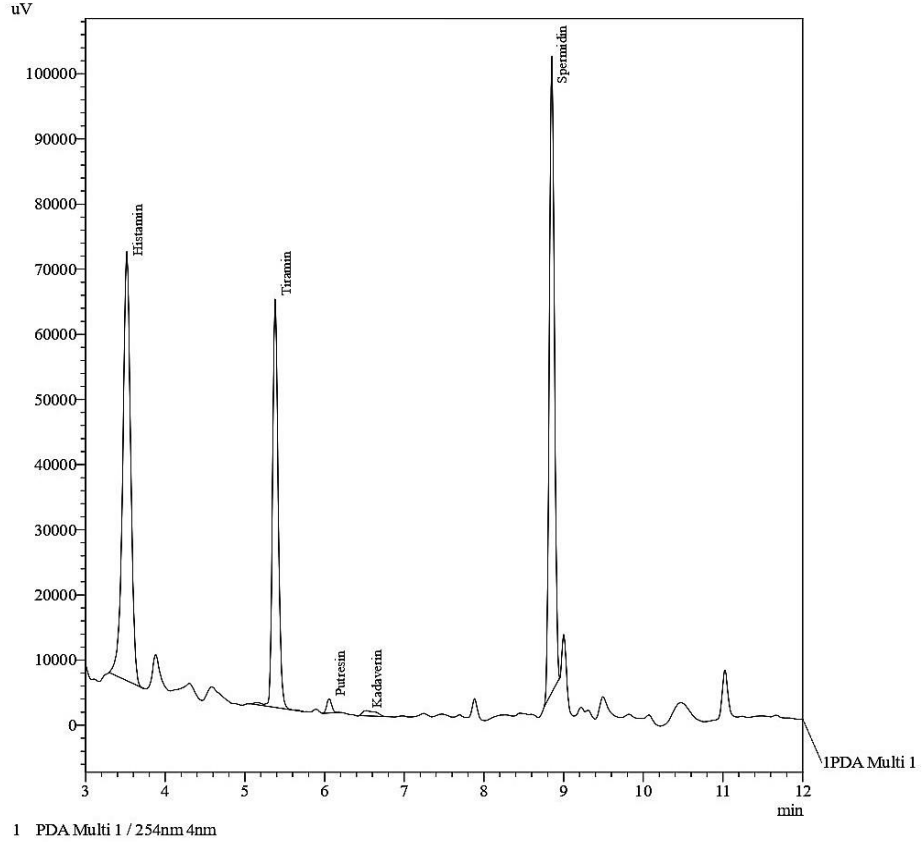
Quantitative Results

Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.505	399295	19.700	mg/L
Tiramın	5.380	254272	12.858	mg/L
Putresin	6.067	12844	1.466	mg/L
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L

Şekil 4.6 BA92 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

HPLC’de elde edilen verilere göre, BA92 suşu tarafından üretilen en yüksek konsantrasyona sahip biyojen aminin 19,700 mg/L ile histamin olduğu belirlenmiştir. Çalışmada BA92 suşu tarafından üretilen tiramin miktarı ise 12,858 mg/L olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, putresinin düşük miktarda (1,466 mg/L) üretildiği tespit edilmiştir. BA92 suşunun kadaverin üreticisi olmadığı yapılan analizler sonucunda bulunmuştur. BA92 suşuna ait aminoasit dekarboksilaz testi sonuçları, HPLC’de elde edilen verilerle uyumlu bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Sample Information
Sample Name : Sample 7
Vali# : 20
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Sample 7.lcd
Method Filename : BA.lcm
Data Processed : 25/11/2021 14:10:36



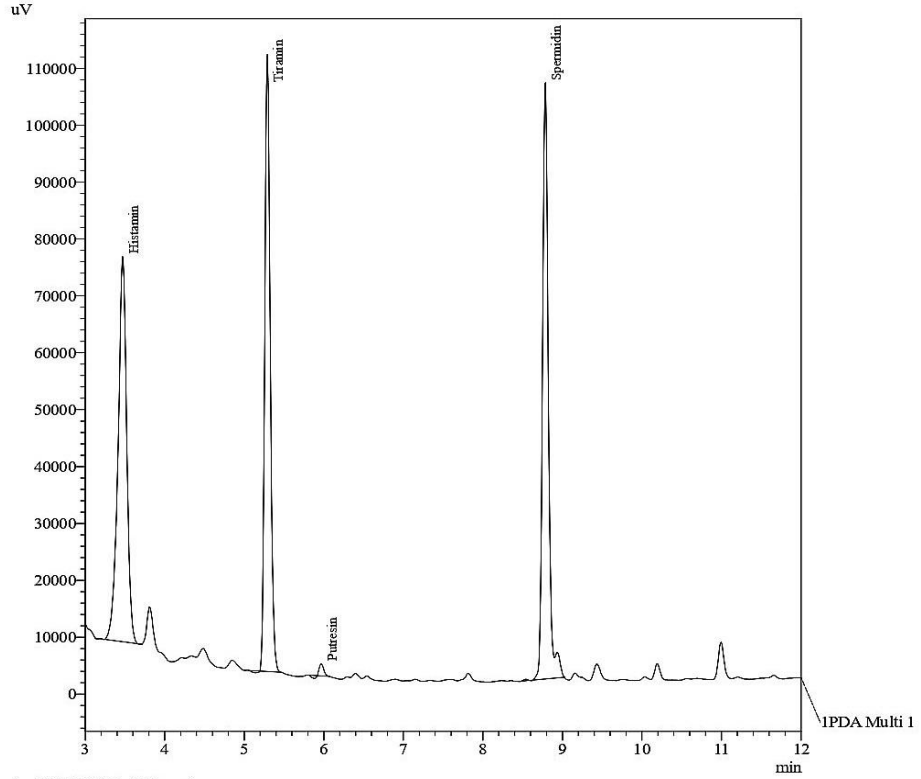
Quantitative Results				
PDA				
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.512	453756	22.270	mg/L
Tiramin	5.374	309278	15.453	mg/L
Putresin	6.052	9386	1.303	mg/L
Kadaverin	6.519	9478	1.535	mg/L

Şekil 4.7 BA125 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA125 suşunun çalışmada varlığı incelenen dört biyojen amini de ürettiği belirlenmiştir. Bu suşun 22,270 mg/L konsantrasyon ile en fazla ürettiği biyojen aminin histamin olduğu tespit edilmiştir. Üretilen histamin miktarını sırasıyla tiramin, kadaverin ve putresin izlemiş olup, konsantrasyonları sırasıyla 15,453 mg/L, 1,535 mg/L ve 1,303 mg/L olarak belirlenmiştir. Aminoasit dekarboksilaz testi sonuçlarına göre de BA125 suşu, tiramin, histamin, kadaverin ve putresinin üreticisi olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Sample Name : Sample 26
 Vial# : 4
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 26.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:13:47

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

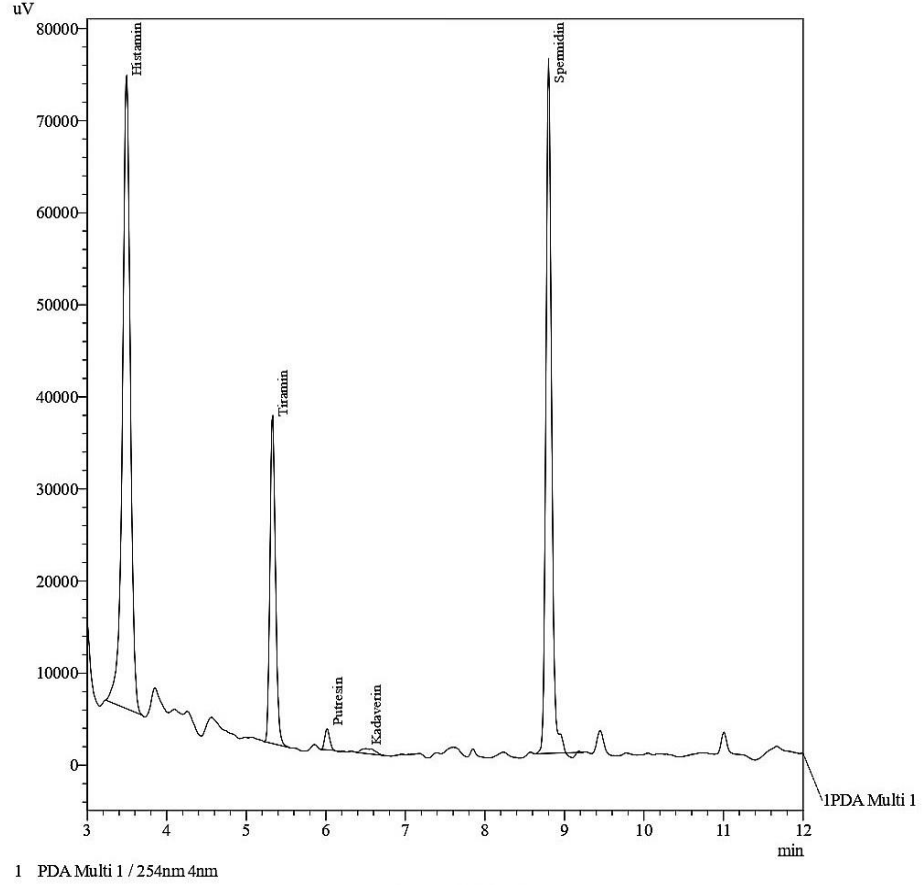
Quantitative Results

Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.466	510487	24.947	mg/L
Tiram	5.285	515224	25.170	mg/L
Putresin	5.961	6285	1.156	mg/L
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L

Şekil 4.8 BA147 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

HPLC analizi sonuçları BA147 suşu tarafından üretilen en yüksek konsantrasyona sahip biyojen aminin 25,170 mg/L ile tiramin olduğunu göstermiştir. Çalışmada BA147 suşu tarafından üretilen histamin miktarı ise 24,947 mg/L olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, putresinin 1,156 mg/L konsantrasyonla düşük miktarda üretildiği tespit edilmiştir. Aminoasit dekarboksilaz testi de BA147 suşunun histamin, tiramin ve putresin üreticisi olduğunu teyit etmektedir. Ayrıca yapılan analizlerde BA147 suşunun kadaverin üreticisi olmadığı bulunmuştur (Çizelge4.4).

Sample Information
Sample Name : Sample 9
Vial# : 19
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Sample 9.lcd
Method Filename : BA.lcm
Data Processed : 25/11/2021 14:10:29



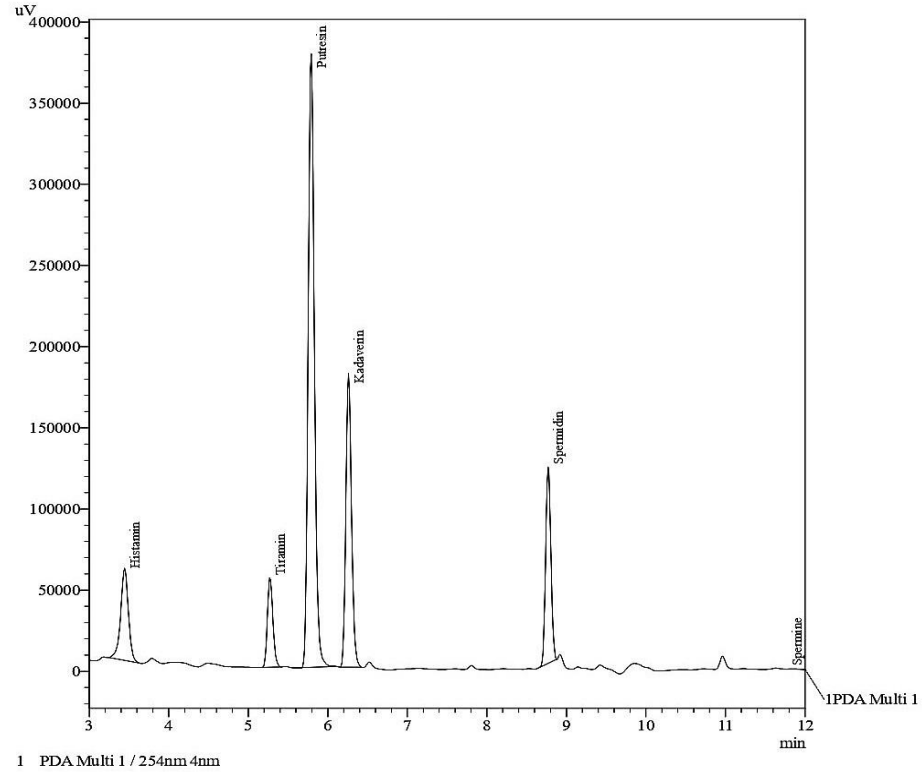
Quantitative Results				
PDA	Name	Ret. Time	Area	Conc. Units
	Histamin	3.489	472449	23.152 mg/L
	Tiramın	5.324	171855	8.969 mg/L
	Putresin	6.011	9847	1.324 mg/L
	Kadaverin	6.491	6376	1.339 mg/L

Şekil 4.9 BA184 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA184 suşunun çalışmada varlığı incelenen dört biyojen amini de ürettiği hem HPLC analizinde hem de aminoasit dekarboksilaz testinde belirlenmiştir (Çizelge 4.4). HPLC analizi sonuçlarına göre BA184 suşunun 23,152 mg/L ile en fazla ürettiği biyojen aminin histamin olduğu tespit edilmiştir. Üretilen histamin miktarını sırasıyla tiramin, kadaverin ve putresin izlemiş olup, bu biyojen aminlerin konsantrasyonları sırasıyla 8,969 mg/L, 1,339 mg/L ve 1,324 mg/L olarak belirlenmiştir.

Sample Name : Sample 10
 Vial# : 18
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 10.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:27:41

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

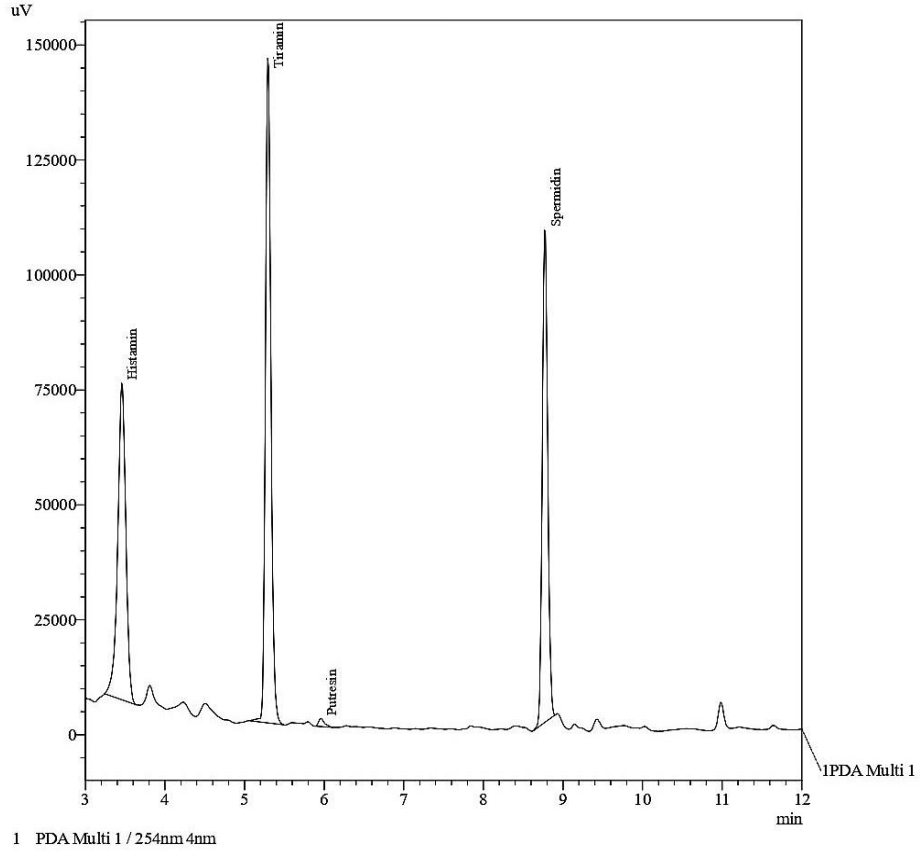
Quantitative Results

Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.439	383844	18.971	mg/L
Tiramın	5.267	265697	13.397	mg/L
Putresin	5.785	2045141	97.359	mg/L
Kadaverin	6.255	899809	57.836	mg/L

Şekil 4.10 BA188 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyogen amin miktarları

BA188 suşunun çalışmada araştırılan biyogen aminlerin hepsini üretme yeteneği gösterdiği tespit edilmiştir. Buna göre tespit edilen en yüksek konsantrasyonun 97,359 mg/L ile putresine ait olduğu ve bunu 57,836 mg/L ile kadaverinin izlediği belirlenmiştir. Çalışmada BA188 suşu tarafından üretilen histamin ve tiramin konsantrasyonları ise sırasıyla 18,971 mg/L ve 13,397 mg/L olarak bulunmuştur. Aminoasit dekarboksilaz testi sonuçlarına göre BA188 suşunun çalışmada araştırılan biyogen aminlerin hepsi için güçlü üretici olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Bu doğrultuda HPLC analizi sonuçlarıyla aminoasit dekarboksilaz testi sonuçları paralellik göstermektedir.

Sample Information
Sample Name : Sample 11
Vial# : 17
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Sample 11.lcd
Method Filename : BA.lcm
Data Processed : 25/11/2021 14:27:00



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

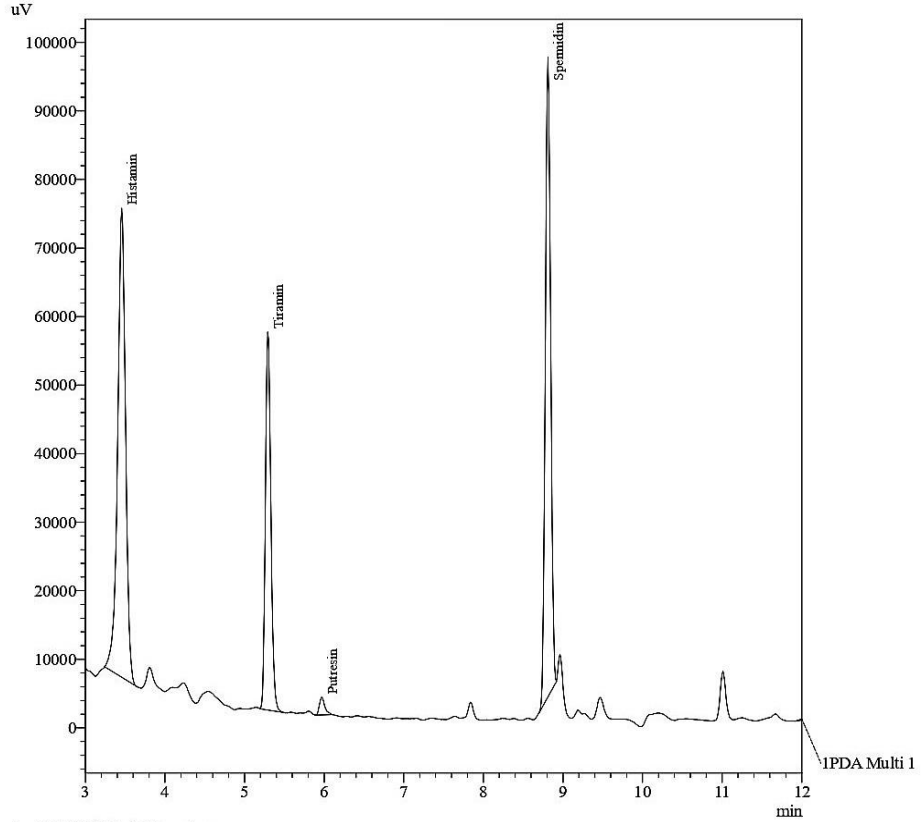
Quantitative Results

Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.454	484631	23.727	mg/L
Tiranin	5.289	691158	33.472	mg/L
Putresin	5.953	9048	1.287	mg/L
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L

Şekil 4.11 BA206 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

HPLC analizindeki veriler BA206 suşunun tiramin, histamin ve putresin üreticisi olduğunu ve bu biyojen aminlerin konsantrasyonlarının sırasıyla 33,472 mg/L, 23,727 mg/L ve 1,287 mg/L olduğunu göstermiştir. Aminoasit dekarboksilaz testi sonuçları da BA206 suşunun histamin ve tiraminin güçlü üreticisi olduğunu, putresinin ise zayıf üreticisi olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.4). Buna karşın, çalışmada BA206 suşunun kadaverin üretmediği her iki analiz sonucunda da belirlenmiştir.

Sample Information
Sample Name : Sample 12
Vial# : 16
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Sample 12.lcd
Method Filename : BA.lcm
Data Processed : 25/11/2021 14:26:09



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Quantitative Results

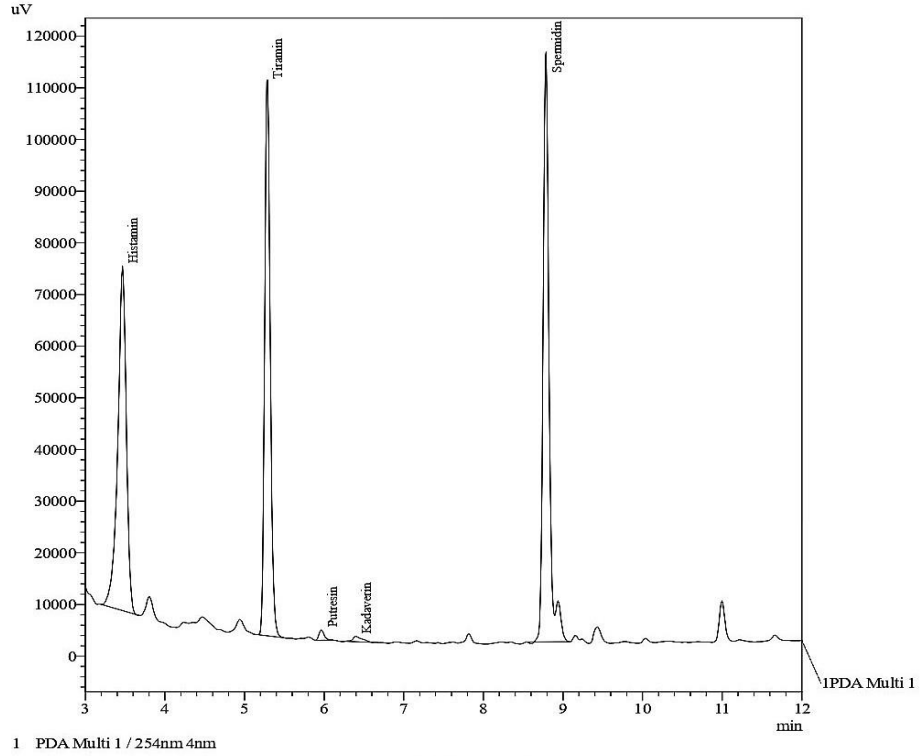
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.452	469538	23.015	mg/L
Tiramin	5.289	263526	13.294	mg/L
Putresin	5.964	12344	1.442	mg/L
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L

Şekil 4.12 BA236 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA236 suşunun histamin, tiramin ve putresin üreticisi olduğu belirlenirken, kadaverin üreticisi olmadığı hem HPLC analizi hem de aminoasit dekarboksilaz testi sonuçlarına göre belirlenmiştir (Çizelge 4.4). 23,015 mg/L konsantrasyon ile histamin, çalışmada BA236 suşu tarafından en fazla üretilen biyojen amin olmuştur. Histamini 13,294 mg/L ile tiramin izlemiştir. Çizelge 4.4 incelendiğinde BA236 suşunun histamin ve tiraminin güçlü üreticileri olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, BA236 kodlu suşun putresini 1,442 mg/L konsantrasyonu ile düşük miktarda ürettiği tespit edilmiştir.

Sample Name : Sample 27
 Vial# : 3
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 27.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:11:23

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Quantitative Results

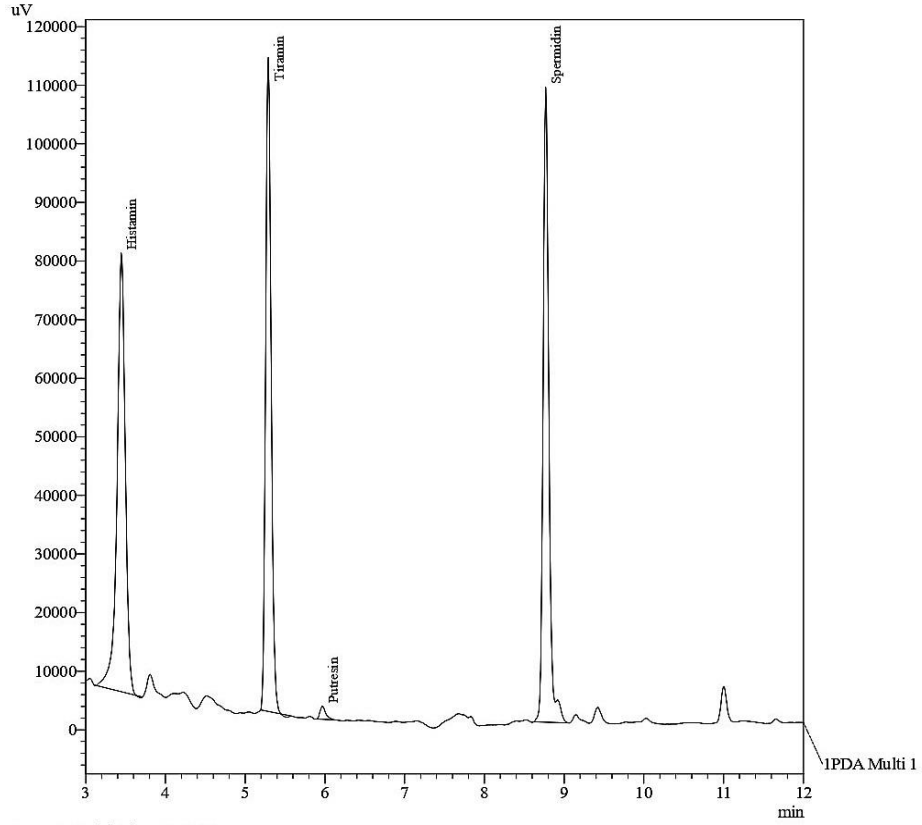
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.462	495851	24.256	mg/L
Tiranin	5.280	523151	25.544	mg/L
Putresin	5.960	9248	1.296	mg/L
Kadaverin	6.394	8228	1.456	mg/L

Şekil 4.13 BA251 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

HPLC analizi sonuçlarına göre BA251 suşunun çalışmada varlığı incelenen dört biyojen amini de ürettiği belirlenmiştir. BA251 kodlu suşun 25,544 mg/L konsantrasyon ile en fazla ürettiği biyojen aminin tiramin olduğu ve bunu 24,256 mg/L ile histaminin izlediği belirlenmiştir. Düşük miktarlarda üretilen kadaverin ve putresin konsantrasyonlarının ise sırasıyla 1,456 mg/L ve 1,296 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Aminoasit dekarboksilaz testi sonuçları da BA251 suşunun tiramin ve histaminin güçlü, putresin ve kadaverinin ise zayıf üreticisi olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.4).

Sample Name : Sample 14
 Vial# : 15
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 14.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:26:43

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Quantitative Results

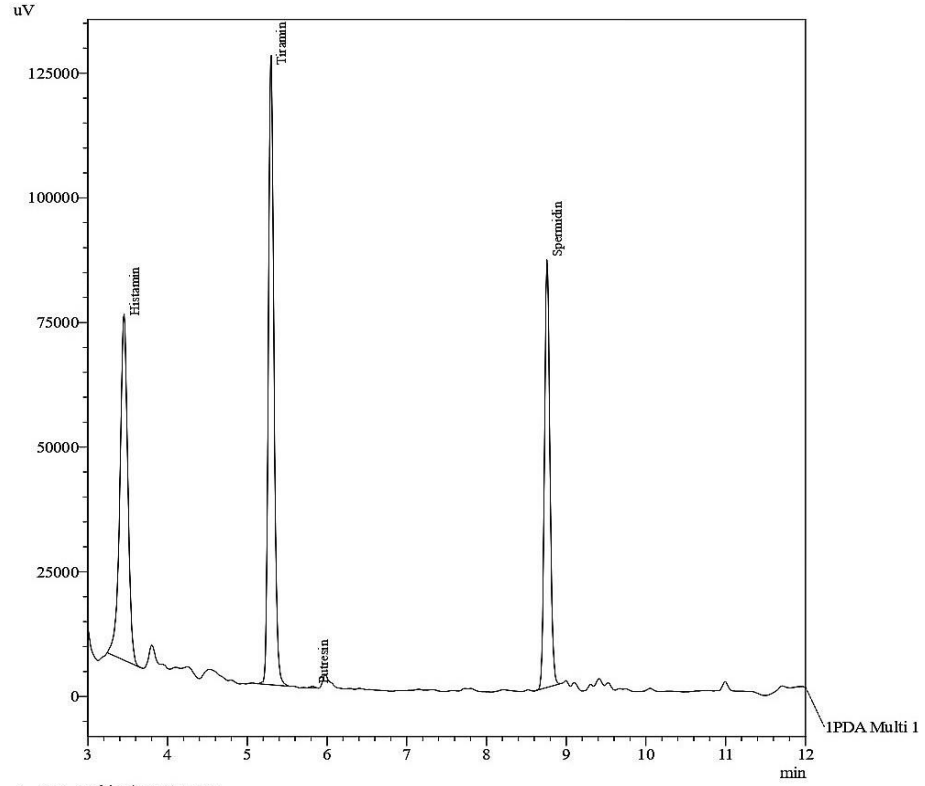
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.443	537872	26.239	mg/L
Tiramin	5.284	532440	25.983	mg/L
Putresin	5.963	11048	1.381	mg/L
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L

Şekil 4.14 BA262 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA262 suşunun histamin, tiramin ve putresin üreticisi olduğu ve bu biyojen aminlerin konsantrasyonlarının sırasıyla 26,239 mg/L, 25,983 mg/L ve 1,381 mg/L olduğu HPLC analizi sonucunda tespit edilmiştir. Buna karşın, BA262 suşunun kadaverin üretmediği belirlenmiştir. Tiramin, putresin ve histamin üreticisi olarak bulunan BA262 suşunun, kadaverin üretmediği aminoasit dekarboksilaz testi sonucunda da doğrulanmıştır (Çizelge 4.4).

Sample Name : Sample 15
 Vial# : 14
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 15.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:25:04

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

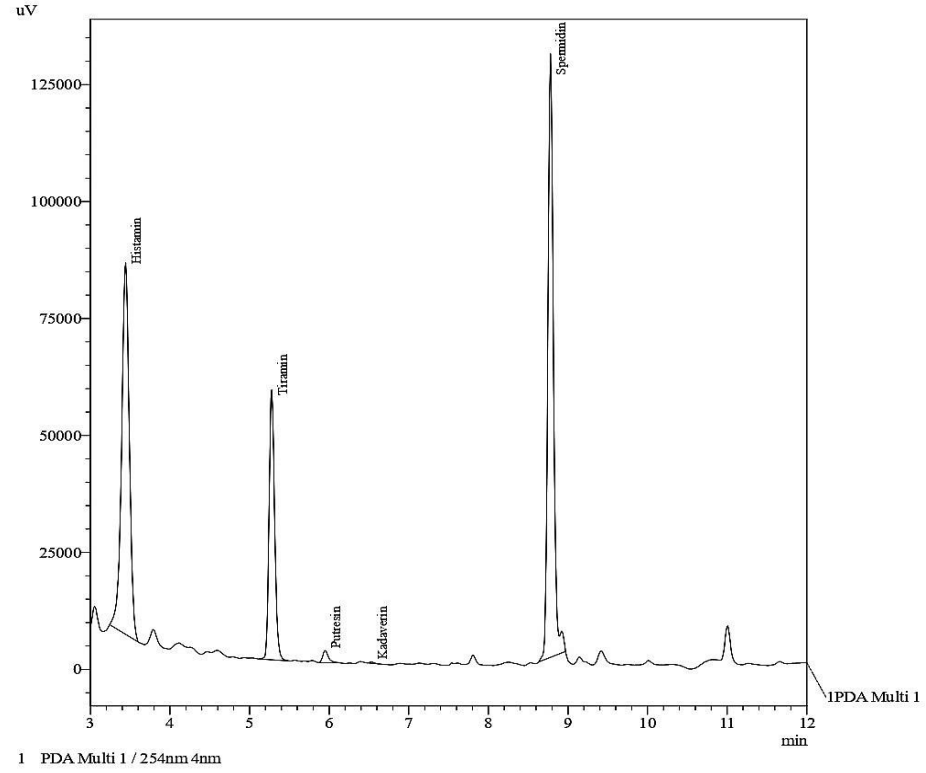
Quantitative Results

Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.448	475651	23.303	mg/L
Tiram	5.292	612812	29.775	mg/L
Putresin	5.813	1066	0.910	mg/L
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L

Şekil 4.15 BA271 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA271 suşuna ait HPLC analizi sonuçları ile Çizelge 4.4'deki aminoasit dekarboksilaz testi sonuçları birbiriyle uyumlu bulunmuştur. BA271 suşu tarafından üretilen en yüksek konsantrasyona sahip biyojen aminin 29,775 mg/L ile tiramin olduğu belirlenmiştir. Çalışmada BA271 suşu tarafından üretilen histamin miktarı ise 23,303 mg/L olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, putresinin düşük miktarda (0,910 mg/L) üretildiği tespit edilmiştir. Bu suşun kadaverin üreticisi olmadığı bulunmuştur.

Sample Name : Sample 16
 Vial# : 13
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 16.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:24:34



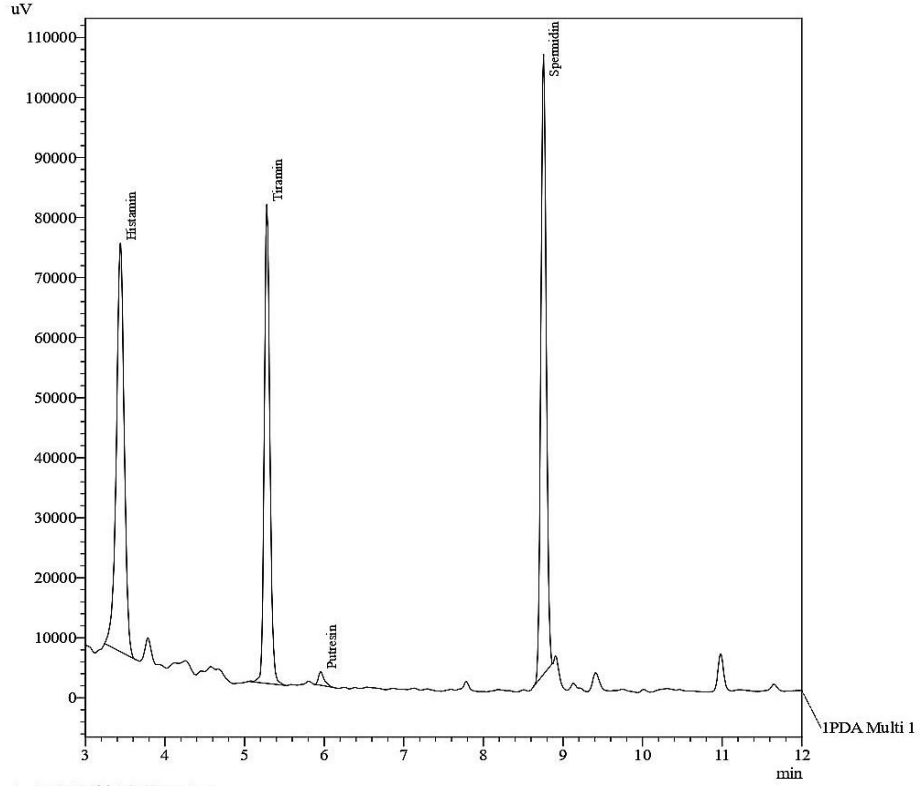
Quantitative Results				
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.437	534555	26.083	mg/L
Tiramın	5.272	278850	14.017	mg/L
Putresin	5.945	12340	1.442	mg/L
Kadaverin	6.525	1051	1.002	mg/L

Şekil 4.16 BA280 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA280 suşu tarafından en fazla miktarda üretilen biyojen aminin 26,083 mg/L ile histamin olduğu tespit edilmiştir. Histamini 14,017 mg/L ile tiramin izlemiştir. 1,442 mg/L ile putresinin ve 1,002 mg/L ile kadaverinin, BA280 kodlu suş tarafından düşük konsantrasyonlarda üretildiği tespit edilmiştir. Aminoasit dekarboksilaz testi sonuçlarına göre BA280 suşu çalışmada araştırılan tüm biyojen aminlerin üreticisi olarak bulunurken; histamin ve tiraminin güçlü üreticisi, kadaverin ve putresinin ise zayıf üreticisi olarak bulunmuştur. Bu bağlamda, HPLC analizi sonuçlarıyla aminoasit dekarboksilaz testi sonuçları benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.4).

Sample Name : Sample 17
 Vial# : 12
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 17.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:24:11

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

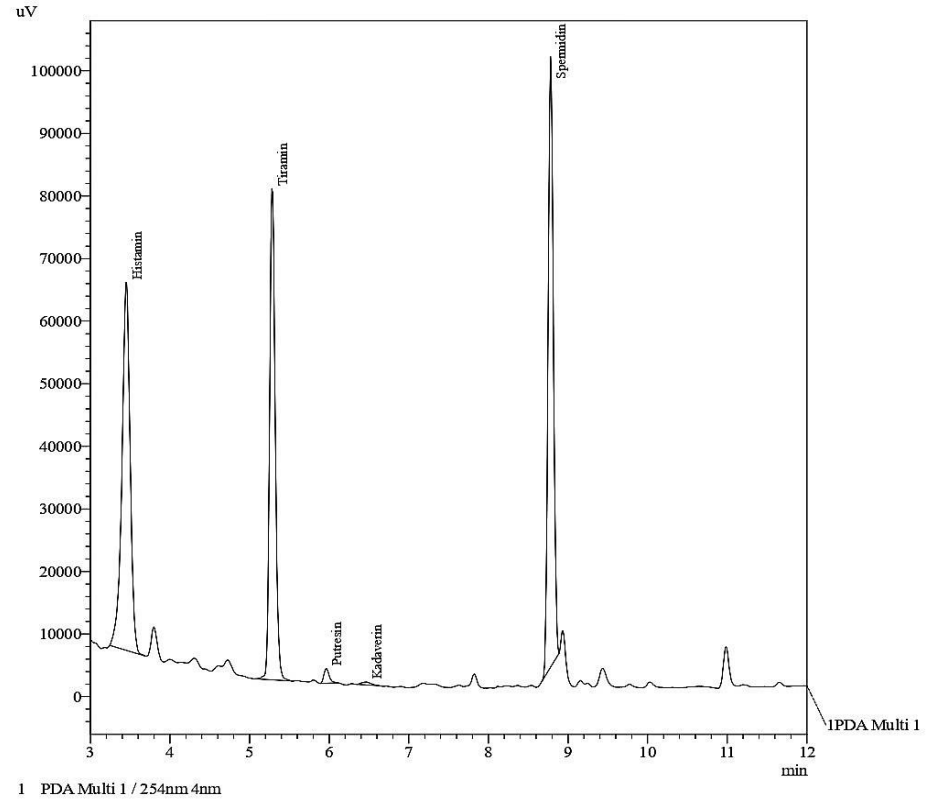
Quantitative Results

Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.435	466242	22.859	mg/L
Tiramin	5.276	387949	19.165	mg/L
Putresin	5.951	11377	1.397	mg/L
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L

Şekil 4.17 BA298 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA298 suşunun histamin, tiramin ve putresin üreticisi olduğu ve bu biyojen aminlerin konsantrasyonlarının sırasıyla 22,859 mg/L, 19,165 mg/L ve 1,397 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın, çalışmada BA298 suşun kadaverin üretmediği belirlenmiştir. BA298 suşunun kadaverin üreticisi olmadığı; histamin ve tiraminin güçlü, putresinin ise zayıf üreticisi olduğu, amino asit dekarboksilaz testi sonucuyla da doğrulanmıştır (Çizelge 4.4).

Sample Name : Sample 18
 Vali# : 11
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 18.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:23:46



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Quantitative Results

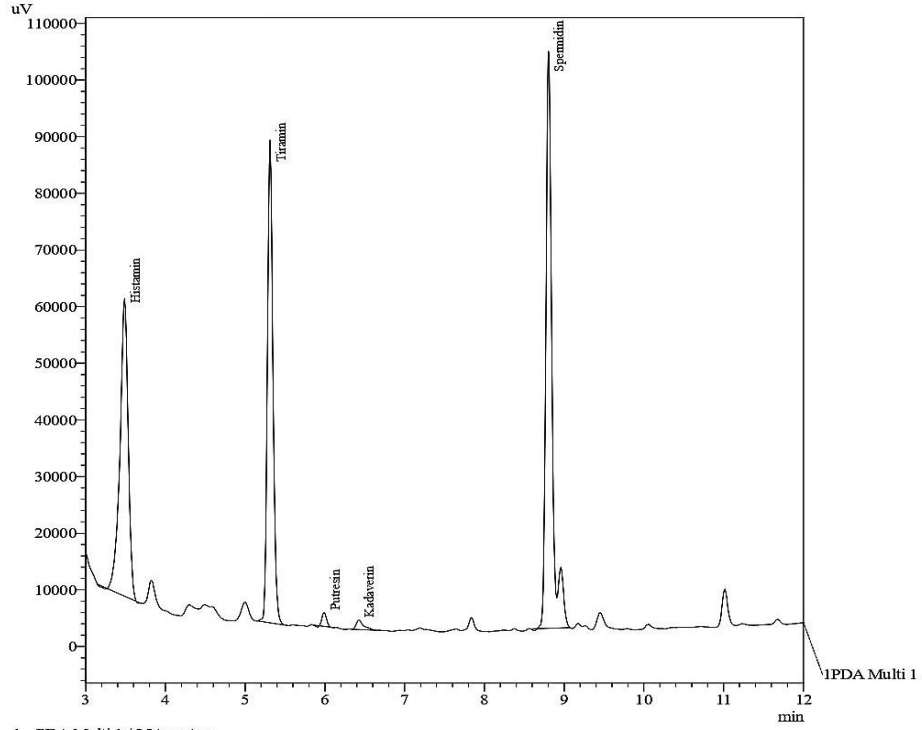
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.445	419945	20.675	mg/L
Tiramın	5.279	384717	19.013	mg/L
Putresin	5.958	10788	1.369	mg/L
Kadaverin	6.457	3776	1.175	mg/L

Şekil 4.18 BA307 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA307 suşunun çalışmada varlığı incelenen tüm biyojen aminleri ürettiği belirlenmiştir. Aminoasit dekarboksilaz testi sonuçlarına göre de BA307 suşunun histamin, kadaverin, putresin ve tiraminin üreticisi olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4). HPLC analizi sonuçlarına göre BA307 kodlu suşun 20,675 mg/L konsantrasyon ile en fazla ürettiği biyojen aminin histamin olduğu tespit edilmiştir. Üretilen histamin miktarını sırasıyla tiramin, putresin ve kadaverin izlemiş olup, konsantrasyonları sırasıyla 19,013 mg/L, 1,369 mg/L ve 1,175 mg/L olarak belirlenmiştir.

Sample Name : Sample 30
 Vial# : 2
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 30.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 30/11/2021 10:07:25

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Quantitative Results

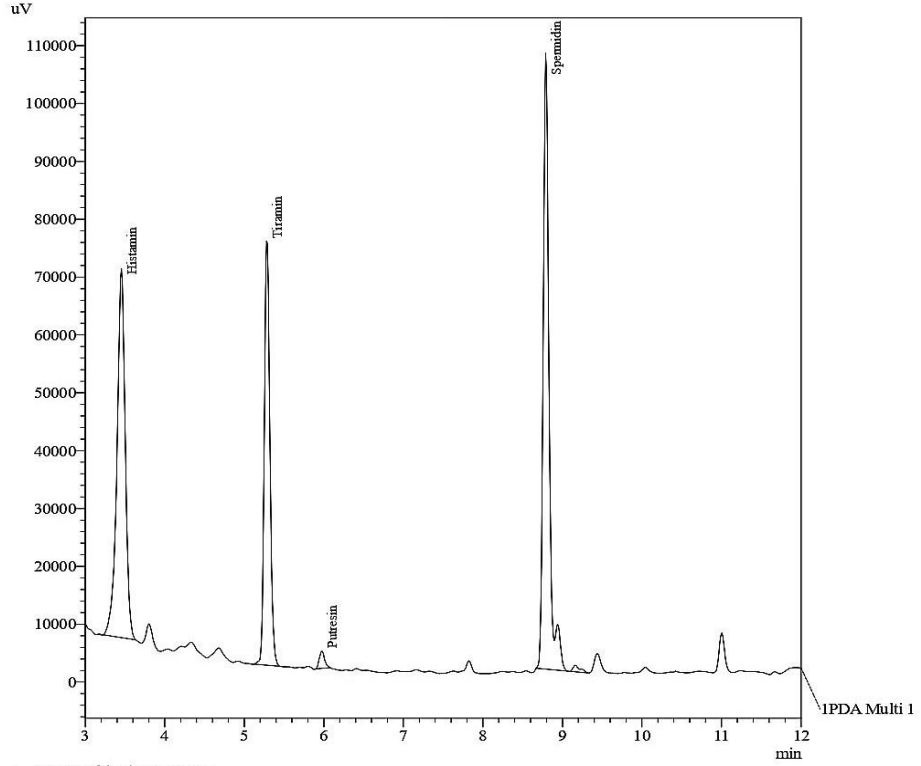
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.481	374884	18.549	mg/L
Tiramini	5.306	408904	20.154	mg/L
Putresin	5.984	8995	1.284	mg/L
Kadaverin	6.420	10709	1.613	mg/L

Şekil 4.19 BA310 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

HPLC analizi sonuçlarına göre BA310 suşu tarafından en fazla miktarda üretilen biyojen aminin 20,154 mg/L ile tiramin olduğu tespit edilmiştir. Tiramini 18,549 mg/L ile histamin izlemiştir. 1,613 mg/L ile kadaverinin ve 1,284 mg/L ile putresinin, BA310 kodlu suş tarafından düşük konsantrasyonlarda üretildiği tespit edilmiştir. Aminoasit dekarboksilaz testi sonuçlarına göre de BA310 suşu çalışmada araştırılan dört biyojen aminin üreticisi olarak saptanmış olup; histamin ve tiramin üretimi bakımından güçlü, kadaverin ve putresin üretimi bakımından ise zayıf üreticisi olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.4).

Sample Name : Sample 20
 Vali# : 10
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 20.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:22:43

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

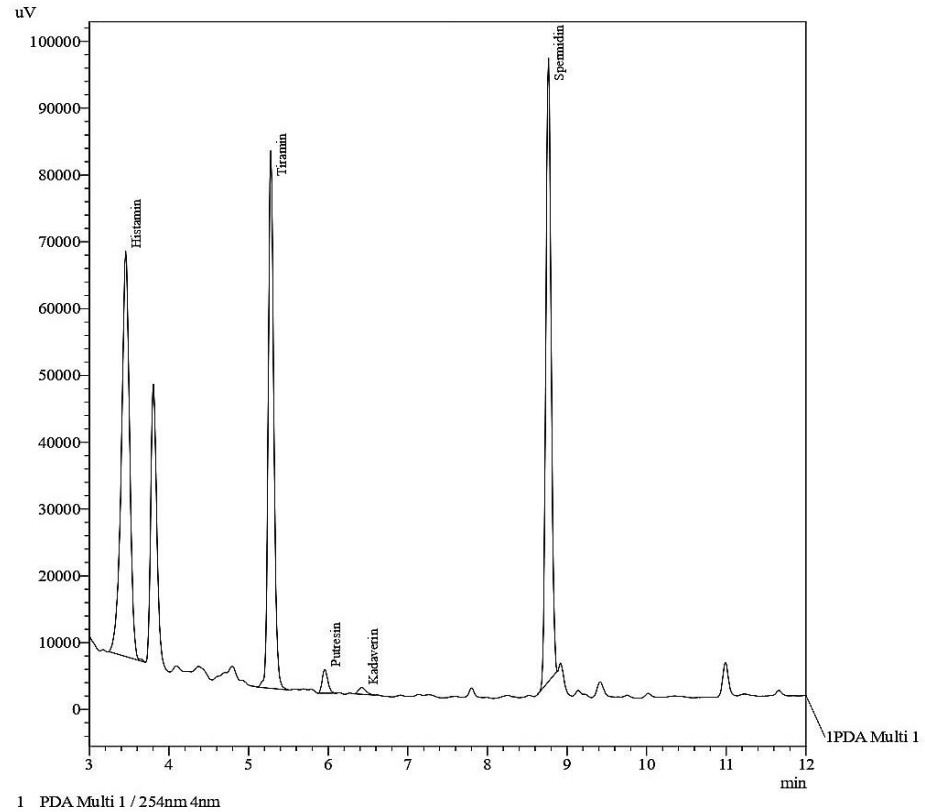
Quantitative Results

PDA					
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units	
Histamin	3.449	459993	22.564	mg/L	
Tiramın	5.279	359239	17.810	mg/L	
Putresin	5.969	13706	1.507	mg/L	
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L	

Şekil 4.20 BA323 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

HPLC analizi ve aminoasit dekarboksilaz testi sonuçlarına göre histamin, tiramin ve putresin üreticisi olduğu belirlenen BA323 suşunun biyojen amin konsantrasyonları sırasıyla 22,564 mg/L, 17,810 mg/L ve 1,507 mg/L olarak bulunmuştur. Amino asit dekarboksilaz testi sonuçları, BA323 suşunun histamin ve tiraminin güçlü üreticisi olduğunu, putresinin ise zayıf üreticisi olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.4). Buna karşın, çalışmada BA323 suşunun kadaverin üretmediği her iki analizde de belirlenmiştir.

Sample Information
Sample Name : Sample 21
Vial# : 9
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Sample 21.lcd
Method Filename : BA.lcm
Data Processed : 25/11/2021 14:22:27



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

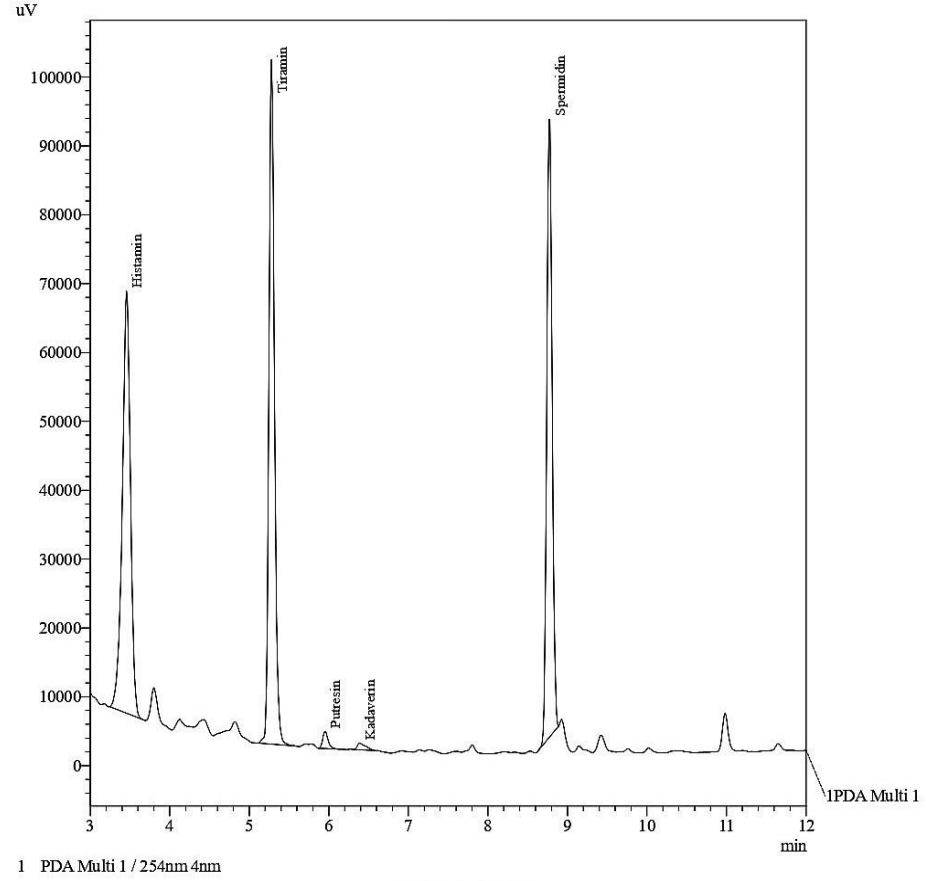
Quantitative Results

Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.452	434689	21.370	mg/L
Tiramin	5.274	390052	19.264	mg/L
Putresin	5.951	17197	1.671	mg/L
Kadaverin	6.420	6730	1.362	mg/L

Şekil 4.21 BA334 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA334 suşunun çalışmadaki tüm biyojen aminleri üretme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre BA334 kodlu suşun 21,370 mg/L konsantrasyon ile en fazla ürettiği biyojen aminin histamin olduğu tespit edilmiştir. Üretilen histamin miktarını sırasıyla tiramin, putresin ve kadaverin izlemiş olup, konsantrasyonları sırasıyla 19,264 mg/L, 1,671 mg/L ve 1,362 mg/L olarak belirlenmiştir. BA334 suşunun araştırılan dört biyojen amini de üretme yeteneği açısından HPLC analizi sonuçlarıyla, aminoasit dekarboksilaz testi sonuçları birbirine uyumluluk göstermektedir (Çizelge 4.4).

Sample Information
Sample Name : Sample 22
Vial# : 8
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Sample 22.lcd
Method Filename : BA.lcm
Data Processed : 25/11/2021 14:22:06



Quantitative Results

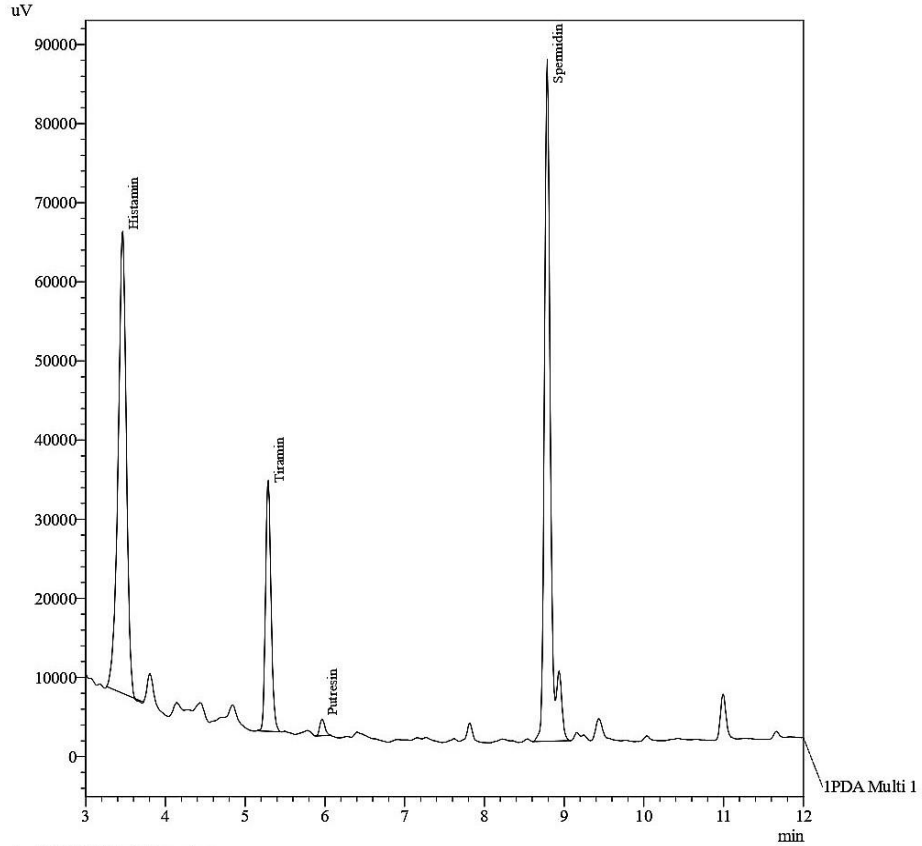
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.453	436102	21.437	mg/L
Tiramün	5.274	481505	23.579	mg/L
Putresin	5.948	11590	1.407	mg/L
Kadaverin	6.385	7006	1.379	mg/L

Şekil 4.22 BA343 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

Aminoasit dekarboksilaz testi sonucuna göre BA343 suşu histamin ve tiraminin güçlü üreticisi, putresin ve kadaverinin ise zayıf üreticisi olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). BA343 suşu tarafından en fazla miktarda üretilen biyojen aminin 23,579 mg/L ile tiramin olduğu HPLC analizi sonucunda tespit edilmiştir. Tiramini 21,437 mg/L ile histamin izlemiştir. 1,407 mg/L ile putresinin ve 1,379 mg/L ile kadaverinin, BA343 kodlu suş tarafından düşük konsantrasyonlarda üretildiği tespit edilmiştir.

Sample Name : Sample 23
 Vial# : 7
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 23.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:15:08

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

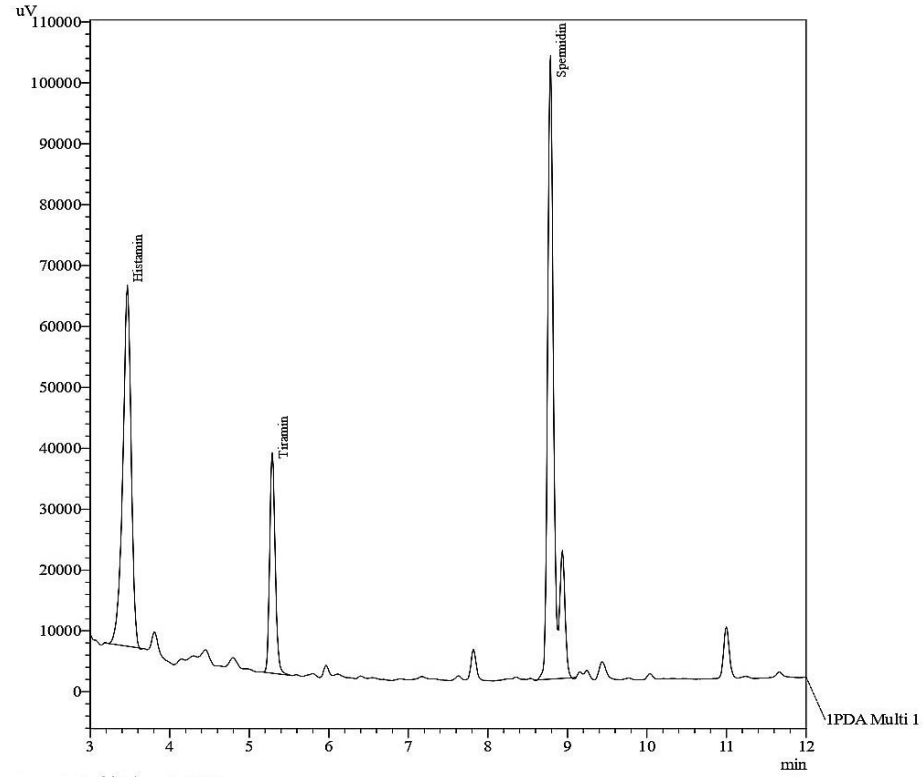
Quantitative Results

Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.457	419117	20.636	mg/L
Tiranin	5.282	153124	8.085	mg/L
Putresin	5.959	9294	1.298	mg/L
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L

Şekil 4.23 BA362 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

20,636 mg/L konsantrasyon ile histamin, çalışmada BA362 suşu tarafından en fazla üretilen biyojen amin olmuştur. Histamini 8,085 mg/L ile tiramin izlemiştir. Bununla birlikte, BA362 suşunun putresini 1,298 mg/L konsantrasyonu ile düşük miktarda ürettiği tespit edilmiştir. HPLC analizi sonuçlarıyla benzer olarak, amino asit dekarboksilaz testi sonuçları BA362 suşunun histamin, tiramin ve putresin üreticisi olduğunu, ancak kadaverin üreticisi olmadığını göstermiştir (Çizelge 4.4).

Sample Name : Sample 24
 Vali# : 6
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 24.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:14:06



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Quantitative Results

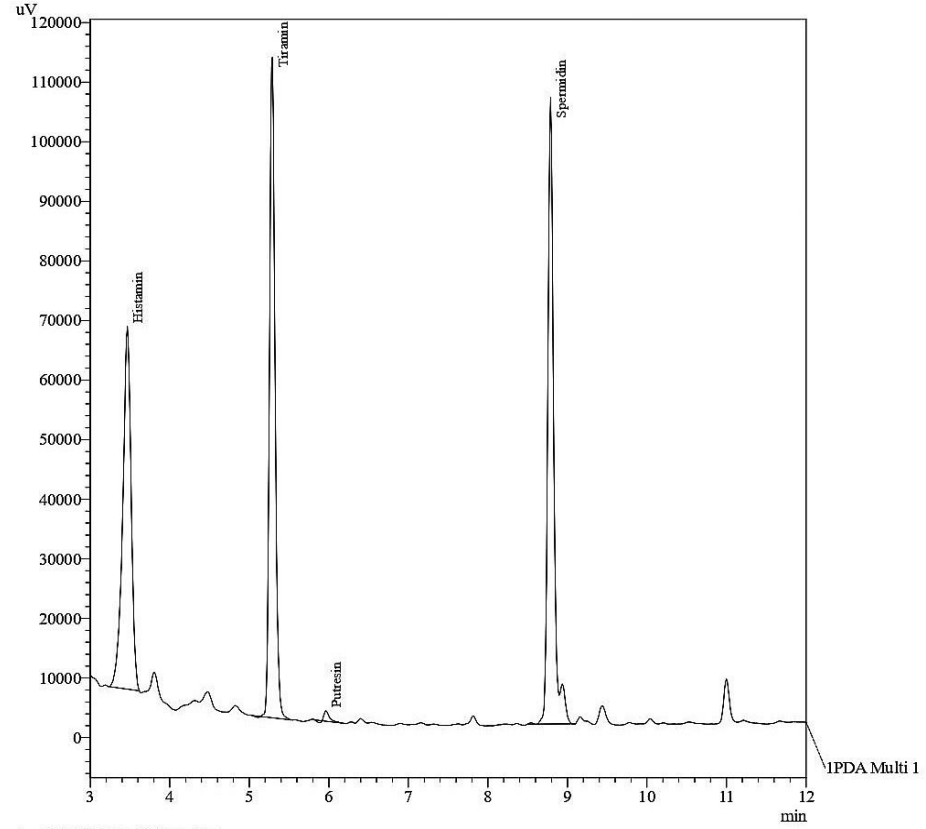
Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.462	431403	21.215	mg/L
Tiram	5.284	174419	9.090	mg/L
Putresin	0.000	0	0.000	mg/L
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L

Şekil 4.24 BA368 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA368 suşunun histamin ve tiramin üreticisi olduğu hem HPLC analizi ile hem de amino asit dekarboksilaz testi ile belirlenmiştir. Bu suş tarafından en yüksek konsantrasyonda üretilen biyojen aminin 21,215 mg/L ile histamin olduğu saptanmıştır. Tiramın konsantrasyonu ise 9,090 mg/L olarak bulunmuştur. HPLC analizi sonuçlarına göre BA368 kodlu suş tarafından putresin ve kadaverin üretiminin gerçekleşmediği belirlenmiştir. Benzer şekilde, amino asit dekarboksilaz testi sonuçları da BA368 suşunun kadaverin ve putresin üreticisi olmadığını göstermiştir (Çizelge 4.4).

Sample Name : Sample 25
 Vial# : 5
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Sample 25.lcd
 Method Filename : BA.lcm
 Data Processed : 25/11/2021 14:11:44

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Quantitative Results

Name	Ret. Time	Area	Conc.	Units
Histamin	3.461	445285	21.870	mg/L
Tiramini	5.281	536167	26.159	mg/L
Putresin	5.959	6958	1.188	mg/L
Kadaverin	0.000	0	0.000	mg/L

Şekil 4.25 BA388 suşuna ait kromatografi grafiği ve biyojen amin miktarları

BA388 suşu tarafından en fazla miktarda üretilen biyojen aminin 26,159 mg/L ile tiramin olduğu tespit edilmiştir. Tiramini 21,870 mg/L ile histamin ve 1,188 mg/L ile putresin izlemiştir. Bununla birlikte, BA388 kodlu suşun kadaverin üreticisi olmadığı belirlenmiştir. BA388 suşuna ait aminoasit dekarboksilaz testi sonucunda elde olunan veriler, HPLC’de elde olunan verileri destekler niteliktedir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.5'te enterokok izolatları tarafından üretilen histamin, kadaverin, tiramin ve putresin miktarları yer almaktadır.

Çizelge 4.5 HPLC analizi ile tespit edilen biyojen aminlerin konsantrasyonları

Suş Kodu	Biyojen Amin Konsantrasyonları (mg/L)			
	Histamin	Tiramin	Putresin	Kadaverin
BA17	14,874	0,000	96,169	52,433
BA33	19,269	6,333	96,977	19,290
BA46	22,487	2,901	0,000	2,653
BA60	20,754	12,524	0,000	1,470
BA71	20,282	10,172	0,000	0,000
BA92	19,700	12,858	1,466	0,000
BA125	22,270	15,453	1,303	1,535
BA147	24,947	25,170	1,156	0,000
BA184	23,152	8,969	1,324	1,339
BA188	18,971	13,397	97,359	57,836
BA206	23,727	33,472	1,287	0,000
BA236	23,015	13,294	1,442	0,000
BA251	24,256	25,544	1,296	1,456
BA262	26,239	25,983	1,381	0,000
BA271	23,303	29,775	0,910	0,000
BA280	26,083	14,017	1,442	1,002
BA298	22,859	19,165	1,397	0,000
BA307	20,675	19,013	1,369	1,175
BA310	18,549	20,154	1,284	1,613
BA323	22,564	17,810	1,507	0,000
BA334	21,370	19,264	1,671	1,362
BA343	21,437	23,579	1,407	1,379
BA362	20,636	8,085	1,298	0,000
BA368	21,215	9,090	0,000	0,000
BA388	21,870	26,159	1,188	0,000

Tez çalışmasında enterokok suşları tarafından üretilen histamin konsantrasyonunun 14,874-26,239 mg/L, tiramin konsantrasyonunun 2,901-33,472 mg/L, putresin konsantrasyonunun 0,910-97,359 mg/L ve kadaverin konsantrasyonunun ise 1,002-57,836 mg/L düzeylerinde olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.5). BA188 suşu tez çalışmasında en yüksek biyojen amin üreticisi suş olarak tanımlanmıştır. Bu suşun 97,359 mg/L konsantrasyonda putresin ürettiği belirlenmiştir. BA206 suşu en yüksek tiramin üreticisi olarak tanımlanmış ve 33,472 mg/L konsantrasyonunda tiramin ürettiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, çalışmadaki en yüksek histamin konsantrasyonunun

26,239 mg/L ile BA262 kodlu suşa ait olduğu bulunmuştur. Tespit edilen en yüksek kadaverin konsantrasyonu ise 57,836 mg/L ile BA188 kodlu suşa aittir. Tespit edilen en yüksek kadaverin konsantrasyonu ise 57,836 mg/L ile BA188 kodlu suşa aittir.

HPLC analizine tabi tutulan enterokok suşlarının 16'sı α -hemolitik (BA33, BA60, BA92, BA125, BA147, BA206, BA271, BA280, BA298, BA307, BA310, BA323, BA334, BA343, BA362, BA368), 5'i β -hemolitik (BA17, BA46, BA236, BA251, BA388) ve 4'ü ise γ -hemolitik (BA71, BA184, BA188, BA262) yapı göstermektedir. Hemolisin üretimi enterokoklarda patojenitenin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Toru vd. 2018, Tsanasidou vd. 2021). Bu kapsamda en yüksek tiramin üreticisi olarak tanımlanan BA206 suşu, α -hemolitik yapı göstermesi bakımından büyük bir önem taşımaktadır. Bu suşun daha ileri moleküler analizlere tabi tutularak patojenitesinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Sagun vd. (2005) tarafından otlu peynir üzerinde yapılan bir çalışmada, olgunlaşma süresinin artmasıyla örnekteki histamin seviyesinin de arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada olgunlaşmanın ilk gününde otlu peynir örneğindeki histamin konsantrasyonu 21,90 mg/kg iken, 90 günlük olgunlaşma sonunda bu konsantrasyon 46,20 mg/kg seviyesine ulaşmıştır. Peng vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada gıdalardaki histamin seviyeleri belirlenmiş ve peynirdeki histamin konsantrasyonunun $5,31 \pm 0,33$ mg/kg olduğu tespit edilmiştir. Budak vd. (2008), 90 gün süreyle 10°C'de olgunlaştırılan Türkiye'deki beyaz peynir örneklerindeki histamin konsantrasyonlarının 265,50 mg/kg seviyesine kadar tespit edildiğini bildirmektedir. Aynı çalışmada tespit edilen biyojen aminler arasında en yüksek konsantrasyonun histamine ait olduğu belirlenmiştir. Andiç vd. (2010) ise histamin konsantrasyonlarının 0-681,50 mg/kg arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Botello-Morte vd. (2022), sert peynirlerden biri olan Parmigiano Reggiano (İtalya) peynirinde, ≥ 540 günlük olgunlaştırmadan sonra tespit edilen histamin konsantrasyonunun 285 mg/kg olduğunu bildirmiştir. Buna karşın aynı çalışmada, yumuşak peynirlerden biri olan Camembert (Fransa) peynirinde, ≥ 21 günlük olgunlaştırmadan sonra elde edilen histamin konsantrasyonu < 5 mg/kg seviyesinde bulunmuştur. Tez çalışmamızda elde edilen veriler, literatürdeki verilerini

destekler niteliktedir. Ancak tez kapsamında elde olunan histamin konsantrasyonu nispeten daha düşük oranlardadır.

Dünyada gıdalarda tolere edilebilir histamin konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik yasal bir düzenleme bulunmamaktadır. Ancak vücuda alınan 70-1000 mg seviyelerindeki histaminin ciddi bazı semptomlara neden olabildiği bildirilmektedir. Bununla birlikte, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA: Food and Drug Administration) ton balıklarındaki kritik histamin seviyesinin 50 mg/100 g olduğunu belirlemiştir (Ekici vd. 2019). ten Brink vd. (1990) ise gıdalardaki histaminin 100 mg/L'lik konsantrasyonunu toksik eşik olarak belirlemiştir. Bu doğrultuda, tez çalışmamızda saptanan en yüksek histamin konsantrasyonunun (26,239 mg/L) literatürde belirtilen değerden daha düşük olduğu bulunmuştur. Ancak tez çalışmamızda histamin üreticisi enterokok suş izolasyon oranı yüksektir.

Tez çalışmamızda enterokok suşları tarafından üretilen en yüksek tiramin konsantrasyonu 33,472 mg/L değerinde saptanmıştır. Andiç vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada otlu peynirlerdeki tiramin konsantrasyonlarının 18,00-1125,50 mg/kg olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise Harzer peynirindeki tiramin konsantrasyonlarının 51,60 mg/100 g olduğu tespit edilmiştir (Fiechter vd. 2013). Ekici vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada otlu peynirlerdeki tiramin miktarları HPLC analizi ile tespit edilmiş, <0,039-725,21 mg/kg olduğu rapor edilmiştir. Tez çalışmamızda elde olunan tiramin konsantrasyonu ile literatür verileri benzerlik göstermektedir.

Tez çalışmasında enterokok suşları tarafından üretilen en yüksek putresin konsantrasyonu 97,359 mg/L ve kadaverin konsantrasyonu ise 57,836 mg/L değerinde saptanmıştır. Standardova vd. (2010) tarafından “Olomouc Curd” peynirlerindeki en yüksek kadaverin seviyesinin 2413,00 mg/kg olduğunu tespit etmiştir. Ladero vd. (2012) çiğ inek sütünden yapılan yumuşak peynirdeki putresin konsantrasyonunun 38,75 mg/kg seviyesinde olduğunu belirlemiştir. Aynı çalışmada, pastörize inek sütünden yapılan ve tutsülen yarı sert peynirdeki putresin konsantrasyonunun 97,68

mg/kg seviyesinde olduğu saptanmıştır. Reblochon peynirindeki biyojen amin konsantrasyonlarının putresin için 28,2 mg/kg ve kadaverin için 22,3 mg/kg seviyelerinde olduğunu tespit edilmiştir (O’Sullivan vd. 2015). Bonczar vd. (2018) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise Harzer peynirinde tespit edilen en yüksek kadaverin konsantrasyonlarının 377,50 mg/kg, putresin seviyesinin ise $281,33 \pm 114,90$ mg/kg olduğu rapor edilmiştir. Ekici vd. (2019) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise otlu peynirlerdeki putresin konsantrasyonlarının 0,03-426,35 mg/kg ve kadaverin konsantrasyonlarının $<0,039-1438,22$ mg/kg olduğu rapor edilmiştir. Putresin ve kadaverin konsantrasyonları açısından literatürdeki verilerle çalışmamızdaki veriler karşılaştırıldığında zaman, tez çalışmamızdaki verilerin genellikle daha düşük seviyelerde olduğu gözlenmektedir.

Gıdalarda bulunan kadaverin ve putresin genellikle kontaminasyonun bir göstergesi olup, hijyen belirteci olarak kullanılabilir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) taze peynirlerdeki kadaverin seviyelerinin 10,70-45,00 mg/kg, sert peynirlerdeki kadaverin seviyelerinin ise 47,80-83,50 mg/kg arasında değiştiğini bildirmektedir (EFSA 2011). Çalışmamızda elde edilen kadaverin konsantrasyonlarının EFSA’nın belirlediği değerlerin üzerinde olduğu belirlenmiştir.

İnek ve koyun sütünden elde edilen peynirlerde en fazla bulunan biyojen aminlerin tiramin ve histamin olduğu belirlenmiştir (O’Sullivan vd. 2015). Çalışmamızda da peynirlerden izole edilen *Enterococcus* spp. tarafından en fazla üretilen biyojen aminlerin histamin ve tiramin olduğu tespit edilmiştir. Putresin ve kadaverin ise peynirlerde saptanan diğer önemli biyojen aminlerdir (Rohani vd. 2013). Çalışmamızda *Enterococcus* spp. tarafından üretilen putresin ve kadaverin konsantrasyonlarının ortalama olarak tiramin ve histamin konsantrasyonlarından daha düşük bir değere sahip olduğu belirlenmiştir.

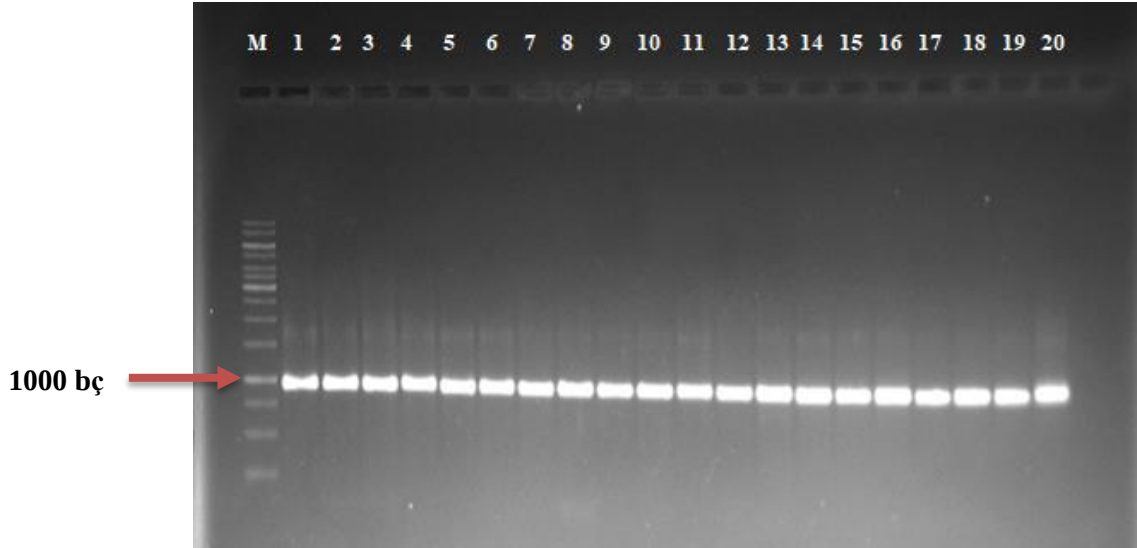
Peynirlerde tespit edilen biyojen amin içerikleri ve konsantrasyonları oldukça değişkenlik gösterebilmektedir. Peynirin türü, ortamdaki mikroorganizmalar, üretim prosesi ve olgunlaşma süresi gibi faktörlere göre biyojen amin içeriği farklılık

gösterebilir (Ekici vd. 2019). Ayrıca su aktivitesi, pH, sıcaklık, tuz oranı, serbest amino asit varlığı ve nem gibi fizikokimyasal özelliklerin ve mikroorganizma varlığının, peynirlerdeki biyojen amin oluşumunu ve birikimini etkileyen faktörler olduğu bilinmektedir (Rohani vd. 2013).

Biojen amin zehirlenmeleri iyi üretim ve hijyen uygulamaları ile kontrol altına alınabilmektedir. Biojen aminlerin günlük alınabilecek miktarlarıyla (ADI (mg/kg), Acceptable Daily Intake) ilgili uluslararası otoritelerce belirlenen yasal bir düzenleme bulunmamaktadır. Bu nedenle halk sağlığına yönelik ortak riskler bu doğrultuda değerlendirilememektedir (Buňka vd. 2012, Ekici vd. 2019).

4.5 Enterokok Suşlarının 16S rDNA Dizi Analizi ile Moleküler Düzeyde Tanımlanması

Tez kapsamında HPLC analizine tabi tutulan 25 enterokok suşunun (BA17, BA33, BA46, BA60, BA71, BA92, BA125, BA147, BA184, BA188, BA206, BA236, BA251, BA262, BA271, BA280, BA298, BA307, BA310, BA323, BA334, BA343, BA362, BA368 ve BA388) 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanımlaması yapılmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 *Enterococcus* suşlarının PZR ile çoğaltılan 16S rDNA fragmentleri

M: M O'Gene Ruler	10000,	8000,	6000,	5000,	4000,	3500,
DNA marker (bç)	3000,	2500,	2000,	1500,	1000,	750,
	500,	250				
1 – 20	BA17,	BA33,	BA46,	BA60,	BA71,	BA92,
	BA125,	BA147,	BA184,	BA188,	BA206,	BA236,
	BA251,	BA262,	BA271,	BA280,	BA298,	BA307,
	BA310,	BA323				

PZR ile çoğaltılan 16S rDNA gen bölgesinin çift yönlü DNA dizi analizi sonuçları BLAST programı kullanılarak NCBI veri tabanında bulunan 16S rDNA dizileriyle benzerliği karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 *Enterococcus* suşlarının 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre gerçekleştirilen tanısı

BAKTERİ KOD NO	İleri (F)	Benzerlik Oranı %	Geri (R)	Benzerlik Oranı %	16S rDNA Dizisine Göre Yapılan Tanı
BA17	<i>Enterococcus faecium</i>	97	<i>Enterococcus faecium</i>	99	<i>Enterococcus faecium</i>
BA33	<i>Enterococcus faecalis</i>	98	<i>Enterococcus faecalis</i>	96	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA46	<i>Enterococcus faecium</i>	98	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>
BA60	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	96	<i>Enterococcus faecium</i>
BA71	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>
BA92	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>
BA125	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>
BA147	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>
BA184	<i>Enterococcus faecium</i>	99	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>
BA188	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	99	<i>Enterococcus faecium</i>
BA206	<i>Enterococcus faecium</i>	99	<i>Enterococcus faecium</i>	98	<i>Enterococcus faecium</i>
BA236	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	94	<i>Enterococcus faecium</i>
BA251	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	99	<i>Enterococcus faecium</i>
BA262	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	96	<i>Enterococcus faecium</i>
BA271	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	99	<i>Enterococcus faecium</i>
BA280	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	87	<i>Enterococcus faecium</i>
BA298	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA307	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA310	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA323	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA334	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
BA343	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>
BA362	<i>Enterococcus faecium</i>	98	<i>Enterococcus faecium</i>	96	<i>Enterococcus faecium</i>
BA368	<i>Enterococcus faecium</i>	100	<i>Enterococcus faecium</i>	97	<i>Enterococcus faecium</i>
BA388	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>

16S rRNA dizi analizi sonuçları değerlendirildiği zaman (Çizelge 4.6); 25 *Enterococcus* suşunun 18'i (%72) *E. faecium*, 7'si (%28) ise *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. *Enterococcus* spp. suşlarının tür düzeyinde dağılımı Çizelge 4.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.7 16S rDNA dizi analizleri sonucuna göre *Enterococcus* suşlarının tür düzeyinde dağılımı

<i>Enterococcus</i> Türleri	Kod No	İzolat Sayısı	
		Sayı	%
<i>Enterococcus faecalis</i>	BA33, BA298, BA307, BA310, BA323, BA334, BA388	7	28
<i>Enterococcus faecium</i>	BA17, BA46, BA60, BA71, BA92, BA125, BA147, BA184, BA188, BA206, BA236, BA251, BA262, BA271, BA280, BA343, BA362, BA368	18	72
Toplam		25	100

E. faecium ve *E. faecalis* türlerinin yaygın biyojen amin üreticileri olduğu bilinmektedir (Burdychova ve Komprda 2007, Ladero vd. 2012, Tabanelli vd. 2014, O'Sullivan vd. 2015, Combarros-Fuertes vd. 2016, Espinosa-Pesqueira vd. 2018, Botello-Morte vd. 2022). Bu kapsamda tez çalışmamızda biyojen amin üreticisi olarak belirlenen enterokok izolatlarının *E. faecium* ve *E. faecalis* olarak tanımlanması da literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur.

Çiğ sütte bulunan ve baskın enterokok türlerinden biri olan *E. faecalis*, peynirdeki yüksek tiramin ve putresin birikiminden sorumlu olan başlıca mikroorganizmalardır (Ladero vd. 2012, Rohani vd. 2013, Tabanelli vd. 2014, del Rio vd. 2019). Tez çalışmamızda yüksek biyojen amin üreticileri olarak tanımlanan BA188, BA206 ve BA262 suşlarında *E. faecium* olarak tanımlanması, literatür verilerini destekler nitelikte bulunmamıştır.

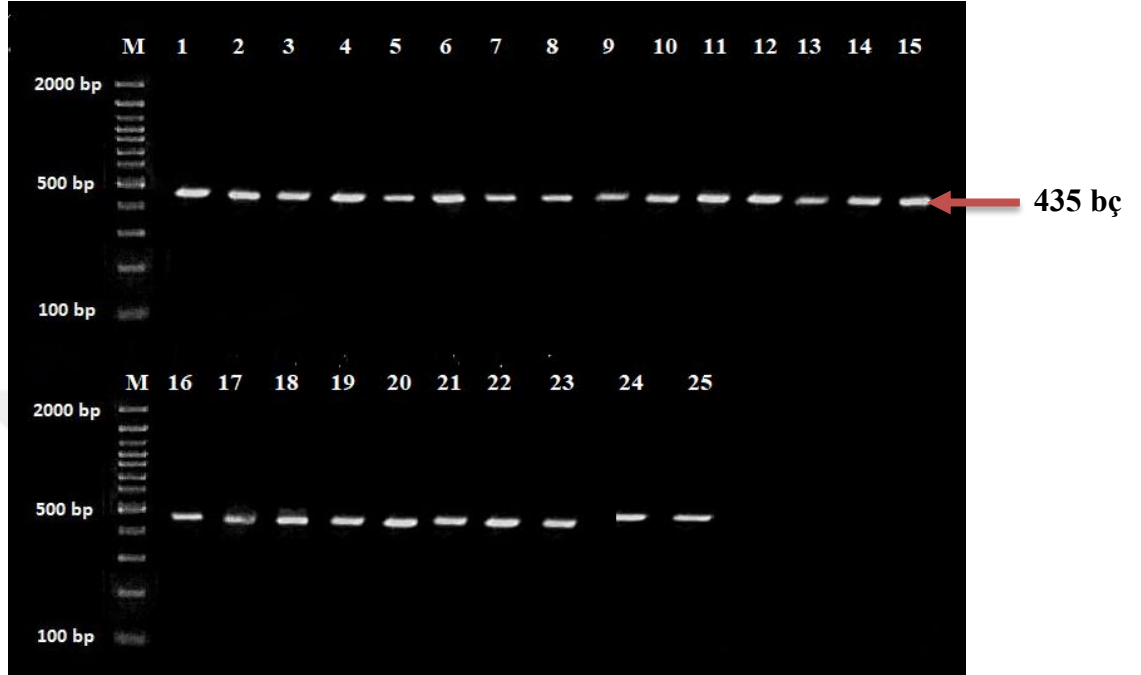
4.6 Enterokok Suşlarında Biyojen Amin Üretiminin Moleküler Doğası

Putresin, kadaverin, histamin ve tiramin üretimi bakımından üretici olarak tanımlanan ve 16S rDNA analizleri ile moleküler tanımlaması yapılmış olan enterokok suşlarında biyojen amin üretme özelliğinin moleküler doğası da araştırılmıştır. Çizelge 4.5'teki biyojen amin konsantrasyonları dikkate alınarak 25 suшта histamin (BA17, BA33, BA46, BA60, BA71, BA92, BA125, BA147, BA184, BA188, BA206, BA236, BA251, BA262, BA271, BA280, BA298, BA307, BA310, BA323, BA334, BA343, BA362, BA368, BA388), 24 suшта tiramin (BA33, BA46, BA60, BA71, BA92, BA125, BA147, BA184, BA188, BA206, BA236, BA251, BA262, BA271, BA280, BA298, BA307, BA310, BA323, BA334, BA343, BA362, BA388), 21 suшта putresin (BA17, BA33, BA92, BA125, BA147, BA184, BA188, BA206, BA236, BA251, BA262, BA271, BA280, BA298, BA307, BA310, BA323, BA334, BA343, BA362, BA368, BA388), 13 suшта kadaverin (BA17, BA33, BA46, BA60, BA125, BA184, BA188, BA251, BA280, BA307, BA310, BA334, BA343) üretiminden sorumlu gen bölgelerinin varlığı araştırılmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 Biyojen amin üretiminden sorumlu gen bölgeleri araştırılan enterokok suşları

Biyojen amin	Gen	Enterokok Suşları
Putresin	<i>odc</i>	BA17, BA33, BA92, BA125, BA147, BA184, BA188, BA206, BA236, BA251, BA262, BA271, BA280, BA298, BA307, BA310, BA323, BA334, BA343, BA362, BA388
Kadaverin	<i>ldc</i>	BA17, BA33, BA46, BA60, BA125, BA184, BA188, BA251, BA280, BA307, BA310, BA334, BA343
Histamin	<i>hdc</i>	BA17, BA33, BA46, BA60, BA71, BA92, BA125, BA147, BA184, BA188, BA206, BA236, BA251, BA262, BA271, BA280, BA298, BA307, BA310, BA323, BA334, BA343, BA362, BA368, BA388
Tiramin	<i>tdc</i>	BA33, BA46, BA60, BA71, BA92, BA125, BA147, BA184, BA188, BA206, BA236, BA251, BA262, BA271, BA280, BA298, BA307, BA310, BA323, BA334, BA343, BA362, BA368, BA388

Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'da biyojen amin gen bölgelerine ait agaroz jel elektroforez görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 4.27 Enterokok suşlarında histamin gen bölgesi

M: O'Gene Ruler DNA marker (bp)

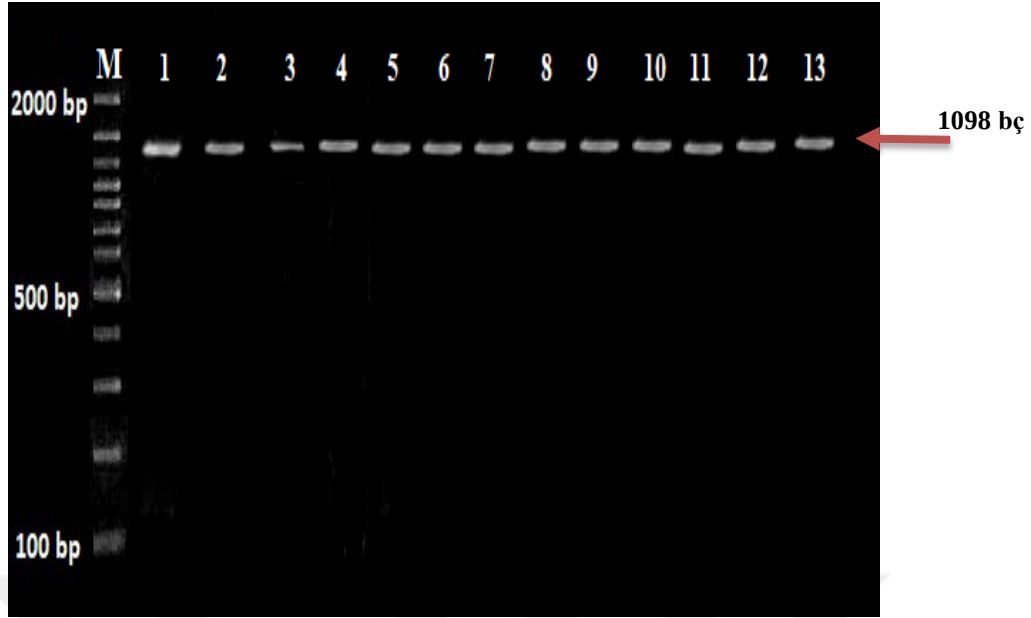
1: BA17	8: BA147	15: BA271	22: BA343
2: BA33	9: BA184	16: BA280	23: BA362
3: BA46	10: BA188	17: BA298	24: BA368
4: BA60	11: BA206	18: BA307	25: BA388
5: BA71	12: BA236	19: BA310	
6: BA92	13: BA251	20: BA323	
7: BA125	14: BA262	21: BA334	



Şekil 4.28 Enterokok suşlarında tiramin gen bölgesi

M: O'Gene Ruler DNA marker (bç)

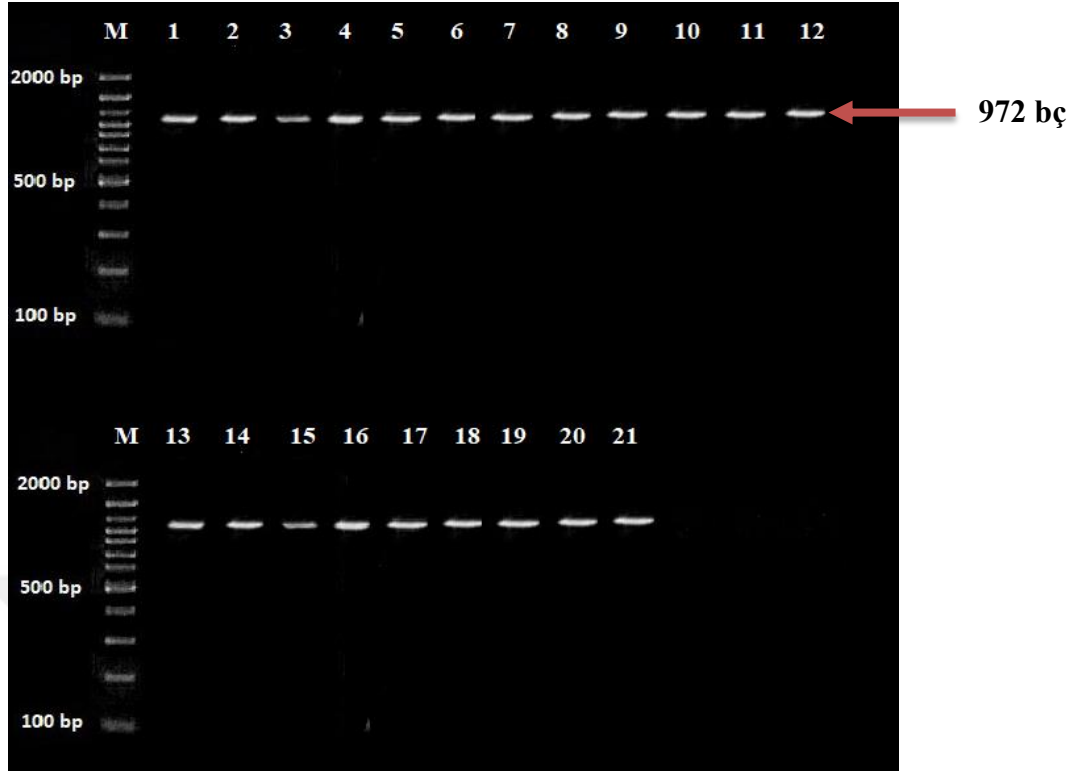
1: BA33	8: BA184	15: BA280	22: BA362
2: BA46	9: BA188	16: BA298	23: BA368
3: BA60	10: BA206	17: BA307	24: BA388
4: BA71	11: BA236	18: BA310	
5: BA92	12: BA251	19: BA323	
6: BA125	13: BA262	20: BA334	
7: BA147	14: BA271	21: BA343	



Şekil 4.29 Enterokok suşlarında kadaverin gen bölgesi

M: O'Gene Ruler DNA marker (bç)

- | | |
|----------|-----------|
| 1: BA17 | 8: BA251 |
| 2: BA33 | 9: BA280 |
| 3: BA46 | 10: BA307 |
| 4: BA60 | 11: BA310 |
| 5: BA125 | 12: BA334 |
| 6: BA184 | 13: BA343 |
| 7: BA188 | |



Şekil 4.30 Enterokok suşlarında putresin gen bölgesi

M: O'Gene Ruler DNA marker (bç)

1: BA17	8: BA206	15: BA307
2: BA33	9: BA236	16: BA310
3: BA92	10: BA251	17: BA323
4: BA125	11: BA262	18: BA334
5: BA147	12: BA271	19: BA343
6: BA184	13: BA280	20: BA362
7: BA188	14: BA298	21: BA388

E. faecium ve *E. faecalis* suşlarında histamin, tiramin, putresin ve kadaverin üretiminden sorumlu aminoasit dekarboksilaz enzim gen bölgesi varlığı incelenmiştir (Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30). Çalışmamız sonucunda 25 suшта histamin, 24 suшта tiramin, 21 suшта putresin ve 13 suшта kadaverin üretiminden sorumlu aminoasit dekarboksilaz gen bölgelerinin varlığı tespit edilmiştir. Ladero vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, süt ürünlerinden izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının *tdc* gen bölgesine sahip olduğu tespit edilmiştir. O'Sullivan vd. (2015) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise Pecorino Sardo peynirinde tespit edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının *tdc* ve *hdc* gen bölgelerine sahip olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde, Elsanhoty ve Ramadan (2016)'ın yaptığı bir çalışmada *hdc*, *tdc* ve *odc* gen bölgelerine sahip *E. faecium* suşlarının varlığı tespit edilmiştir. Avcı ve Tuncer (2017) tarafından yapılan çalışmada ise geleneksel peynirlerden (Türkiye) izole edilen *E. faecalis* suşlarında *tdc* gen bölgesinin varlığına ulaşılmıştır. Tez kapsamında elde edilen veriler ile literatür verileri karşılaştırıldığında uyumlu olarak bulunmuştur (Marcobal vd. 2004, de las Rivas vd. 2006, Burdychova ve Komprda 2007, Coton vd. 2010, Capozzi vd. 2011, Muñoz-Atienza vd. 2011, Hu vd. 2021, Kim vd. 2021). Bununla birlikte, tez kapsamında *hdc*, *tdc*, *odc* ve *ldc* gen bölgelerine sahip olduğu tespit edilen suşlar, HPLC analizi sonucunda biyojen amin üreticisi olarak bulunan suşlarla paralellik göstermiştir.

5. SONUÇ

- Ankara ve çevre illerdeki çeşitli market ve pazarlardan toplam 452 peynir örneği temin edilmiştir. Peynir örneklerinin özellikle starter kültür kullanılmadan geleneksel olarak üretilmiş olmasına dikkat edilmiştir.
- Peynir örneklerinin 391’inde şüpheli *Enterococcus* spp. koloni morfolojisi tespit edilmiştir. İzolatların tamamı Gr (+) ve katalaz (-) özellik ve tipik enterokok morfolojisi göstermiştir. Tez çalışması kapsamında izole edilen muhtemel enterokok izolatlarına BA kodu verilmiştir.
- 391 izolatın tamamının öncelikli olarak biyojen amin üreticisi olup olmadığı tespit edilmiştir. Enterokok suşları tarafından peynirde en fazla üretilen biyojen aminler, tez çalışması kapsamında hedef biyojen aminler olarak seçilmiştir. Kadaverin, histamin, tiramin ve putresin olmak üzere dört farklı biyojen aminin enterokok suşları tarafından üretilme durumları öncül aminoasitlerini içeren dekarboksilaz broth ortamlarında ayrı ayrı test edilmiştir.
- İzolatların 276’sının histamin, 179’unun tiramin, 21’inin putresin ve 13’ünün kadaverin üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Biyojen amin üreticisi izolatların 25’inin güçlü histamin, 172’sinin güçlü tiramin, 3’ünün güçlü kadaverin ve 3’ünün güçlü putresin üreticileri oldukları saptanmıştır. Enterokok izolatları arasında sadece BA33 ve BA188 izolatları, dört biyojen aminin de güçlü üreticileri olarak tespit edilmiştir.
- En az bir biyojen amin üretebilme yeteneğine sahip olan toplam 276 izolat biyokimyasal tanımlama testlerine tabi tutulmuştur. Enterokok izolatlarına eskulin hidrolizi, %6,5 NaCl’de gelişim, 10-45°C’de gelişim, pH 9,6’da gelişme ve hemoliz testleri uygulanmıştır. İzolatların tamamı eskulin hidrolizi pozitif olan suşlar olup; % 6,5 NaCl’de, 10-45°C’de ve pH 9,6’da gelişim gösterebilmiştir. 276

izolatın hemoliz test sonuçlarına göre ise; 173'ü α -hemolitik, 17'si β -hemolitik ve 86'sı ise γ -hemolitik yapı göstermiştir.

- Tez çalışmasının bundan sonraki aşamasına güçlü histamin üreticisi olarak tanımlanan suşlar seçilerek toplam 25 enterokok izolatı ile devam edilmiştir. Seçilen bu izolatların aynı zamanda tiramin, kadaverin ve putresin üreticisi olmasına dikkat edilmiştir.
- Tez çalışması kapsamında histamin, tiramin, kadaverin ve putresin üretme yetenekleri açısından toplam 25 enterokok izolatının ürettiği biyogen amin miktarları HPLC analizi ile belirlenmiştir. Tez çalışmasında enterokok suşları tarafından üretilen histamin konsantrasyonunun 14,874-26,239 mg/L, tiramin konsantrasyonunun 2,901-33,472 mg/L, putresin konsantrasyonunun 0,910-97,359 mg/L ve kadaverin konsantrasyonunun ise 1,002-57,836 mg/L düzeylerinde olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, HPLC analizi sonuçlarının çalışmadaki amino asit dekarboksilaz testi sonuçlarıyla uyumlu olduğu tespit edilmiştir.
- Çalışmada araştırılan biyogen amin miktarları HPLC analizi sonuçlarına göre kıyaslandığında; çalışmadaki en yüksek konsantrasyona sahip suşun 97,359 mg/L putresin seviyesi ile BA188 suşu olduğu bulunmuştur. BA206 suşu en yüksek tiramin üreticisi olarak tanımlanmış ve 33,472 mg/L konsantrasyonunda tiramin ürettiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, çalışmadaki en yüksek histamin konsantrasyonunun 26,239 mg/L ile BA262 kodlu suşa ait olduğu bulunmuştur. Tespit edilen en yüksek kadaverin konsantrasyonu ise 57,836 mg/L ile BA188 kodlu suşa aittir. Tespit edilen en yüksek kadaverin konsantrasyonu ise 57,836 mg/L ile BA188 kodlu suşa aittir.
- En yüksek tiramin üreticisi olarak tanımlanan BA206 suşu, α -hemolitik yapı göstermesi bakımından büyük bir önem taşımaktadır. Bu suşun daha ileri moleküler analizlere tabi tutularak patojenitesinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

- Tez kapsamında HPLC analizine tabi tutulan 25 enterokok suşunun 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanımlaması yapılmıştır. 25 *Enterococcus* suşunun 18'i (%72) *E. faecium*, 7'si (%28) ise *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır.
- Putresin, kadaverin, histamin ve tiramin üretimi bakımından üretici olarak tanımlanan ve 16S rDNA analizleri ile moleküler tanımlaması yapılmış olan enterokok suşlarında biyogen amin üretme özelliğinin moleküler doğası da araştırılmıştır. 25 suшта histamin, 24 suшта tiramin, 21 suшта putresin ve 13 suшта kadaverin üretiminden sorumlu aminoasit dekarboksilaz gen bölgesinin varlığı araştırılmış ve agaroz jellerde bant varlıkları gözlemlenmiştir.

SONUÇTA;

Gıdalarda saptanan biyogen aminler iki nedenden dolayı önem taşımaktadır. Birincisi, biyogen amin miktarının kalite indikatörü olarak kabul edilir olması ve diğeri ise sağlığa etkili toksik etkilerinin bulunmasından ileri gelmektedir. Dünyadaki peynir çeşitliliği insanların tercihleri ve yaşadıkları yöre kültürlerine göre devamlı artış göstermiştir. Tüm dünyada üretilen peynir çeşidinin yaklaşık 1000 civarında olduğu zannedilmektedir. Ülkemizde ise 130 civarında peynir çeşidi üretilmektedir. Başta beyaz peynir ve kaşar peyniri gibi teknolojik olarak yaygın ve bol miktarda üretilen peynirlerin yanı sıra; tulum peyniri, otlu peynir, lor peyniri, çömlek peyniri ve küp peyniri gibi çok farklı geleneksel peynirlerde küçük aile işletmelerinde üretilmektedir. Ancak son yıllarda tüketicilerin beğenisi ve taleplerindeki artışa bağlı olarak modern işletmelerde de önemli miktarlarda üretim yapılmaya başlanmıştır. Bazı geleneksel peynirlerimizin yapımında çiğ süt kullanılması halk sağlığı açısından büyük risk taşımaktadır. Ayrıca ülkemizde pazar alışkanlıklarından birisi de peynirlerin açıkta satışa sunulmasıdır. Tüm bu noktalar peyniri mikrobiyel kontaminasyona açık hale getirmektedir. Özellikle aminoasit dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip mikroorganizmalarca kontamine olması, bu ürünlerde biyogen amin oluşumunu indükleyici bir etmen olarak görülmektedir.

Tez çalışmamız kapsamında pazar ve marketlerden temin edilen peynir örneklerinde yüksek prevalansta biyojen amin oluşumuna neden olan *Enterococcus* spp. suşlarının tespit edilmiş olması, bu noktada hijyen koşullarına daha dikkat edilmesi zorunluluğunu bir kez daha ortaya koymuştur.



KAYNAKLAR

- Abauelnaga, M., Lamas, A., Quintela-Baluja, M., Osman, M., Miranda, J.M., Cepeda, A. and Franco, C.M. 2016. Evaluation of the extent of virulence factors and antibiotic resistance in Enterococci isolated from fermented and unfermented foods. *Annals of Microbiology*, 66, 577-585.
- Abriouel, H., Omar, N.B., Molinos, A.C., López, R.L., Grande, M.J., Martínez-Viedma, P., Ortega, E., Cañamero, M.M. and Galvez, A. 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 38-49.
- Aflaki, F., Ghoulipour, V., Saemian, N. and Salahinejad, M.A. 2014. Simple method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, 6(5), 1482-1487.
- Ahmed, O.M. 2019. Histamine and other biogenic amines formation in canned tuna fish inoculated with *Morganella morganii* or *proteus mirabilis* in determining food safety during temperature abuse. *Nutrition and Food Toxicology*, 3(4), 690-700.
- Akgül, Ö. 2014. Tavuk ve Martı Kaynaklı Enterokok Türlerinin Antibiyotik Dirençliliğinin Fenotipik ve Genotipik Analizi. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Aktop, S. and Şanlıbaba, P. 2018. Occurred Biogenamins Resulting from Microbial Activities. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(8), 1035-1042.
- Akyol, V., Kundakçı, A. ve Ergönül, B. 2015. Gıdalarda Biyojen Aminler-Biogenic Amines in Foods. *Celal Bayar University Journal of Science*, 11(2), 294-305.
- Alfaia, C.M., Gouveia, I.M., Fernandes, M.H., Fernandes, M.J., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto, A.S. and Fraqueza, M.J. 2018. Assessment of coagulase-negative staphylococci and lactic acid bacteria isolated from Portuguese dry fermented sausages as potential starters based on their biogenic amine profile. *Journal of Food Science*, 83(10), 2544-2549.
- Alvarez, M.A. and Moreno-Arribas, M.V. 2014. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science and Technology*, 39(2), 146-155.

- Alves, S.P., Alfaia, C.M., Škrbić, B.D., Živančev, J.R., Fernandes, M.J., Bessa, R.J. and Fraqueza, M.J. 2017. Screening chemical hazards of dry fermented sausages from distinct origins: Biogenic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy elements. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 124-131.
- Andic, S., Genccelep, H. and Kose, S. 2010. Determination of biogenic amines in herby cheese. *International Journal of Food Properties*, 13(6), 1300-1314.
- Andiç, S., Gençcelep, H., Tunçtürk, Y. and Köse, Ş. 2010. The effect of storage temperatures and packaging methods on properties of Motal cheese. *Journal of Dairy Science*, 93(3), 849-859.
- Anonim 2011. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Web sitesi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm> Erişim Tarihi: 21.06.2022.
- Anonymous. 2022. Web sitesi: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=enterococcus> Erişim Tarihi: 30.03.2022.
- Avcı, M. 2015. Farklı Peynir Çeşitlerinden Bakteriyosin (Enterosin) Üreticisi Enterokok Suşlarının İzolasyonu ve Üretilen Bakteriyosinlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Tanısı. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta.
- Avci, M. and Tuncer, B.Ö. 2017. Safety evaluation of enterocin producer *Enterococcus* sp. strains isolated from traditional Turkish cheeses. *Polish Journal of Microbiology*, 66(2).
- Bach, B., Le-Quere, S., Vuchot, P., Grinbaum, M. and Barnavon, L. 2012. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: histamine instability during wine sample storage. *Analytica Chimica Acta*, 732, 114-119.
- Bağcıgil, A.F., İkiz, S., Ak, A. and Özgür, N.Y. 2015. Isolation of Vancomycin Resistant Enterococci from Animal Faeces, detection of Antimicrobial Resistance Profiles and Vancomycin Resistant Genes. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(1), 87-94.
- Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F. and Tabanelli, G. 2019. Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. *Foods*, 8(1), 17.
- Beganovic, M., Luther, M.K., Rice, L.B., Arias, C.A., Rybak, M.J. and LaPlante, K.L. 2018. A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream infections and infective endocarditis. *Clinical Infectious Diseases*, 67(2), 303-309.

- Behera, S.S., Panda, S.K. and Ray, R.C. 2021. Biogenic amines in fermented vegetables: food safety issues. *Microbial Biotechnology in Food and Health*, 165-195.
- Beis, K. and Rebuffat, S. 2019. Multifaceted ABC transporters associated to microcin and bacteriocin export. *Research in Microbiology*, 170(8), 399-406.
- Ben Braiek, O. and Smaoui, S. 2019. Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed Research International*, 2019, 13 pages.
- Benkerroum, N. 2016. Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 801-826.
- Bera, S., Mehta, S., Dwivedi, M.B., Singh, V.A., Paul, R. and Nongrum, S. 2019. Study on vancomycin-resistant enterococci in faecal samples from non-hospitalized individuals at MMIMSR, Haryana, India. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 18(2), 334-339.
- Bhardwaj, S.B. 2019. Enterococci: an important nosocomial pathogen, In: *Pathogenic Bacteria*. Kırmusaoğlu, S. and Bhardwaj, S.B. (eds), IntechOpen, London.
- BIOHAZ (EFSA Panel on Biological Hazards). 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9, 2393-2486.
- Biggel, M., Nüesch-Inderbinen, M., Raschle, S., Stevens, M.J. and Stephan, R. 2021. Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST133 in the aquatic environment in Switzerland. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 31-36.
- Biji, K.B., Ravishankar, C.N., Venkateswarlu, R., Mohan, C.O. and Gopal, T.S. 2016. Biogenic amines in seafood: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(5), 2210-2218.
- Bilgin, B. and Genççelep, H. 2015. Determination of biogenic amines in fish products. *Food Science and Biotechnology*, 24(5), 1907-1913.
- Biswas, P.P., Dey, S., Adhikari, L. and Sen, A. 2014. Virulence markers of vancomycin resistant enterococci isolated from infected and colonized patients. *Journal of Global Infectious Diseases*, 6(4), 157.
- Boehm, A.B. and Sassoubre, L.M. 2014. Enterococci as indicators of environmental fecal contamination, In: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y and Shankar, N. (eds), Massachusetts Eye and Ear Infirmary, PMID: 24649503, Boston.

- Bonczar, G., Filipczak-Fiutak, M., Pluta-Kubica, A., Duda, I., Walczycka, M. and Staruch, L. 2018. The range of protein hydrolysis and biogenic amines content in selected acid-and rennet-curd cheeses. *Chemical Papers*, 72(10), 2599-2606.
- Botello-Morte, L., Moniente, M., Gil-Ramírez, Y., Virto, R., García-Gonzalo, D. and Pagán, R. 2022. Identification by means of molecular tools of the microbiota responsible for the formation of histamine accumulated in commercial cheeses in Spain. *Food Control*, 133, 108595.
- Bover-Cid, S. and Holzappel, W.H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 33–41.
- Brtkova, A., Filipova, M., Drahovska, H. and Bujdakova, H. 2010. Characterization of enterococci of animal and environmental origin using phenotyping methods and comparison with PCR based methods, *Veterinarni Medicina*, 55(3), 97-105.
- Budak, H.N.F., Karahan, A.G. and Çakmakçı, M.L. 2008. Factors affecting histamine and tyramine formation in Turkish White Cheese. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 36(3), 197-206.
- Buňka, F., Budinský, P., Čechová, M., Drienovský, V., Pachlová, V., Matoulková, D., Kubáň, V. and Buňková, L. 2012. Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(2), 213-216.
- Burdychova, R. and Komprda, T. 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 276(2), 149-155.
- Calatrava, E. 2022. Other *Streptococcus* Species and *Enterococcus*. In: *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Rezaei, N. (ed), Elsevier, 529-541.
- Camargo, C.H., Bruder-Nascimento, A., Lee, S.H.I., Junior, A.F., Kaneno, R. and Rall, V.L.M. 2014. Prevalence and Phenotypic characterization of *Enterococcus* ssp. isolated from Food in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 111-115.
- Capozzi, V., Ladero, V., Beneduce, L., Fernández, M., Alvarez, M.A., Benoit, B., Laurent, B., Grieco, F. and Spano, G. 2011. Isolation and characterization of tyramine-producing *Enterococcus faecium* strains from red wine. *Food Microbiology*, 28(3), 434-439.
- Chahales, P. and Thanassi, D.G. 2020. Structure, function, and assembly of adhesive organelles by uropathogenic bacteria, In: *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*. Mulvey, M.A., Klumpp, D.J. and Stapleton, A.E. (eds), 3(5), 277-329.

- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. and Łaniewska-Trokenheim, Ł. 2016. Virulence factors, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from retail shrimps. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 117-122.
- Chong, C.Y., Abu Bakar, F., Russly, A.R., Jamilah, B. and Mahyudin, N.A. 2011. The effects of food processing on biogenic amines formation. *International Food Research Journal*, 18(3), 867-876.
- Codex. 2012. Discussion paper histamine. In Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Fish and Fishery Products. Thirty-Second Session (CX/FFP 12/32/14), 1–5 October, Bali, Indonesia.
- Combarros-Fuertes, P., Fernández, D., Arenas, R., Diezhandino, I., Tornadijo, M.E. and Fresno, J.M. 2016. Biogenic amines in Zamorano cheese: factors involved in their accumulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 295-305.
- Costa, M.P., Balthazar, C.F., Rodrigues, B.L., Lazaro, C.A., Silva, A.C., Cruz, A.G. and Conte Junior, C.A. 2015. Determination of biogenic amines by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) in probiotic cow's and goat's fermented milks and acceptance. *Food Science and Nutrition*, 3(3), 172-178.
- Costantini, A., Vaudano, E., Pulcini, L., Carafa, T. and Garcia-Moruno, E. 2019. An overview on biogenic amines in wine. *Beverages*, 5(1), 19.
- Coton, M., Lebreton, M., Salas, M. L., Garnier, L., Navarri, M., Pawtowski, A., Blay, G.L., Valence, F., Coton, E. and Mounier, J. 2018. Biogenic amine and antibiotic resistance profiles determined for lactic acid bacteria and a propionibacterium prior to use as antifungal bioprotective cultures. *International Dairy Journal*, 85, 21-26.
- Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P. and Coton, E. 2010. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, 27(8), 1078-1085.
- Cunha, S.C., Lopes, R. and Fernandes, J.O. 2017. Biogenic amines in liqueurs: Influence of processing and composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, 147-155.
- Custodio-Mendoza, J.A., Caamaño-Fernandez, C., Lage, M.A., Almeida, P.J., Lorenzo, R.A. and Carro, A.M. 2022. GC–MS determination of malondialdehyde, acrolein, and 4-hydroxy-2-nonenal by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction in beverages. *Food Chemistry*, 384, 132530.
- Čuboň, J., Haščík, P., Hleba, L., Cviková, P., Tkáčová, J., Lopašovský, Ľ. and Pavelková, A. 2019. Biogenic Amines as Risk Factors of Food Chain. *Archives of Ecotoxicology*, 1(1), 7-10.

- de las Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A.V. and Munoz, R. 2006. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *Journal of Food Protection*, 69(10), 2509-2514.
- de la Torre, C.A.L. and Conte-Junior, C.A. 2018. Detection of biogenic amines: Quality and toxicity indicators in food of animal origin, In: *Food Control and Biosecurity*. Academic Press, 225-257.
- del Rio, B., Sanchez-Llana, E., Redruello, B., Magadan, A.H., Fernandez, M., Martin, M.C., Ladero, V. and Alvarez, M.A. 2019. *Enterococcus faecalis* bacteriophage 156 is an effective biotechnological tool for reducing the presence of tyramine and putrescine in an experimental cheese model. *Frontiers in Microbiology*, 10, 566.
- Directive, E. 1991. Council Directive 91/493/EEC of 22 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of fishery products. *Off JL*, 268(24/09), 0015-0034.
- Dişcioğlu, G. 2014. Bazı *Enterococcus* Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Doeun, D., Davaatseren, M. and Chung, M.S. 2017. Biogenic amines in foods. *Food Science and Biotechnology*, 26(6), 1463-1474.
- Dong, H. and Xiao, K. 2017. Modified QuEChERS combined with ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine seven biogenic amines in Chinese traditional condiment soy sauce. *Food Chemistry*, 229, 502-508.
- Durak-Dados, A., Michalski, M. and Osek, J. 2020. Histamine and other biogenic amines in food. *Journal of Veterinary Research*, 64(2), 281-288.
- EC (European Commission). 2005. Commission Regulation No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, 50, 1-26.
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E. and Hirvi, T. 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC international*, 76(3), 575-577.
- Ekici, K., Okut, H., Isleyici, O., Sancak, Y.C. and Tuncay, R.M. 2019. The determination of some microbiological and chemical features in herby cheese. *Foods*, 8(1), 23.
- Elsanhoty, R.M. and Ramadan, M.F. 2016. Genetic screening of biogenic amines production capacity from some lactic acid bacteria strains. *Food Control*, 68, 220-228.

- Erkmen, O. 2022. Isolation and counting of *Enterococcus*, In: Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments. Erkmen, O. (ed), Academic Press, 141-149.
- Espinosa-Pesqueira, D., Roig-Sagués, A.X. and Hernández-Herrero, M.M. 2018. Screening method to evaluate amino acid-decarboxylase activity of bacteria present in spanish artisanal ripened cheeses. *Foods*, 7(11), 182.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*, 9(10), 2393.
- Facklam, R.R., Sahm, D.S. and Teixeira, L.M. 2002. Standart Laboratory Methods For Identifying and Growing Enterococci. *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2013. Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risk of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. FAO/WHO, Rome, Italy.
- FDA (Food and Drug Administration). 2011. Fish and fishery products hazards and controls guidance. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Fernández-García, E., Carbonell, M., Gaya, P. and Nuñez, M. 2004. Evolution of the volatile components of ewes raw milk Zamorano cheese. Seasonal variation. *International Dairy Journal*, 14(8), 701-711.
- Fernández, M., Linares, D.M., Del Río, B., Ladero, V. and Alvarez, M.A. 2007. HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research*, 74(3), 276-282.
- Fernández, M., Linares, D.M., Rodríguez, A. and Alvarez, M.A. 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(6), 1400-1406.
- Fiechter, G., Sivec, G. and Mayer, H.K. 2013. Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses. *Journal of Chromatography B*, 927, 191-200.
- Fisher, K. and Phillips, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757.
- Frazzon, A.P.G., Gama, B.A., Hermes, V., Bierhals, C.G., Pereira, R.I., Guedes, A.G., d'Azevedo, P.A. and Frazzon, J. 2010 Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tetM and tetL

- genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 365–370.
- FSANZ (Food Standards Australia New Zealand). 2016. Imported Food Risk Statement Fish and Fish Products from the Families Specifies and Histamine. FSANZ, Canberra, Australia.
- Gama, M. R. and Rocha, F.R. 2020. Solventless separation of underivatized biogenic amines by sequential injection chromatography. *Microchemical Journal*, 156, 104839.
- Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G. and Özogul, F. 2016. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1218.
- Garrido, A.M., Galvez, A. and Pulido, R.P. 2014. Antimicrobial Resistance in Enterococci. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*, 2(4), 1000150.
- Gezginc, Y., Akyol, I., Kuley, E. and Özogul, F. 2013. Biogenic amines formation in *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made natural yogurt. *Food Chemistry*, 138(1), 655-662.
- Giraffa, G. 2022. Lactic Acid Bacteria: *Enterococcus* in Milk and Dairy Products, In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. McSweeney, P.L.H. and McNamara, J.P. (eds), Academic Press, 151-159.
- Gloria, M.B.A. and Engeseth, N.J. 2019. Bioactive amines, In: *Coffee: Production, Quality and Chemistry*. Farah, A. (ed), 641-661.
- Goh, H.F. and Philip, K. 2015 Isolation and mode of action of bacteriocin BacC1 produced by nonpathogenic *Enterococcus faecium* C1. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5080-5090.
- Guillén-Casla, V., Rosales-Conrado, N., León-González, M.E., Pérez-Arribas, L.V. and Polo-Díez, L.M. 2012. Determination of serotonin and its precursors in chocolate samples by capillary liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1232, 158-165.
- Guo, Y.Y., Yang, Y.P., Peng, Q. and Han, Y. 2015. Biogenic amines in wine: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(7), 1523-1532.
- Han, B., Han, X., Deng, H., Wu, T., Li, C., Zhan, J., Huang, W. and You, Y. 2022. Profiling the occurrence of biogenic amines in wine from Chinese market and during fermentation using an improved chromatography method. *Food Control*, 136, 108859.

- Han, D., Unno, T., Jang, J., Lim, K., Lee, S.N., Ko, G., Sadowsky, M.J. and Hur, H.G. 2011. The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 387-392.
- Hao, Y. and Sun, B. 2020. Analysis of bacterial diversity and biogenic amines content during fermentation of farmhouse sauce from Northeast China. *Food Control*, 108, 106861.
- Harmelin, Y., Hubiche, T., Pharaon, M. and Del Giudice, P. 2017. Three cases of scombroid poisoning. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 145(1), 29-32.
- Harwood, V.J., Delahoya¹, N.C., Ulrich¹, R.M., Kramer, M.F., Whitlock, J.E., Garey J.R. and Lim, D.V. 2004. Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources, *Letters in Applied Microbiology*, 38, 476–482.
- Hasanpour, F., Neyestani, Z., Arzanlou, M., Moradi-Asl, E., Sahebkar, A. and Khademi, F. 2021. Vancomycin-resistant enterococci in Iran: A systematic review and meta-analysis of non-clinical studies. *Gene Reports*, 24, 101265.
- Heilbronner, S., Krismer, B., Brötz-Oesterhelt, H. and Peschel, A. 2021. The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), 726-739.
- Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martín, M.C., Ladero, V. and Alvarez, M.A. 2012. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 297-304.
- Huang, L., Wang, Y., Li, R., Wang, Q., Dong, J., Wang, J. and Lu, S. 2021. Thyme essential oil and sausage diameter effects on biogenic amine formation and microbiological load in smoked horse meat sausage. *Food Bioscience*, 40, 100885.
- Hu, M., Dong, J., Tan, G., Li, X., Zheng, Z. and Li, M. 2021. Metagenomic insights into the bacteria responsible for producing biogenic amines in sufu. *Food Microbiology*, 98, 103762.
- Igbinosa, E.O. and Beshiru, A. 2019. Antimicrobial resistance, virulence determinants, and biofilm formation of *Enterococcus* species from ready-to-eat seafood. *Frontiers in Microbiology*, 10, 728.
- Iseppi, R., Messi, P., Anacarso, I., Bondi, M., Sabia, C., Condò, C. and de Niederhausern, S. 2015. Antimicrobial resistance and virulence traits in *Enterococcus* strains isolated from dogs and cats. *New Microbiologica*, 38, 369-378.

- Ishimaru, M., Muto, Y., Nakayama, A., Hatate, H. and Tanaka, R. 2019. Determination of biogenic amines in fish meat and fermented foods using column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Analytical Methods*, 12(1), 166-175.
- Jain, A. and Verma, K.K. 2018. Strategies in liquid chromatographic methods for the analysis of biogenic amines without and with derivatization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 109, 62-82.
- Jastrzębska, A., Piasta, A. and Szłyk, E. 2015. Application of ion chromatography for the determination of biogenic amines in food samples. *Journal of Analytical Chemistry*, 70(9), 1131-1138.
- Karabıyık, Z. 2011. Fermente Et Örneklerinden İzole Edilen *Enterococcus* Türlerinin Bazı Teknolojik Özellikleri ve Çoklu Antibiyotik Dirençliliği. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Khalkhali, S. and Mojgani, N. 2017. Bacteriocinogenic potential and virulence traits of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* isolated from human milk. *Iranian Journal of Microbiology*, 9(4), 224.
- Kim, K.H., Chun, B.H., Kim, J. and Jeon, C.O. 2021. Identification of biogenic amine-producing microbes during fermentation of ganjang, a Korean traditional soy sauce, through metagenomic and metatranscriptomic analyses. *Food Control*, 121, 107681.
- Kim, M.K., Mah, J.H. and Hwang, H.J. 2009. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chemistry*, 116(1), 87-95.
- Klibi, N., Aouini, R., Borgo, F., Ben Said, L., Ferrario, C., Dziri, R., Boudabous, A., Torres, C. and Ben Slama, K. 2015. Antibiotic resistance and virulence of faecal enterococci isolated from food-producing animals in Tunisia. *Annals of Microbiology*, 65(2), 695-702.
- Kumari, A., Angmo, K. and Bhalla, T.C. 2016. Probiotic attributes of indigenous *Lactobacillus* spp. isolated from traditional fermented foods and beverages of north-western Himalayas using in vitro screening and principal component analysis. *Journal of Food Science and Technology*, 53(5), 2463-2475.
- Ladero, V., Cañedo, E., Pérez, M., Martín, M.C., Fernández, M. and Alvarez, M.A. 2012. Multiplex qPCR for the detection and quantification of putrescine-producing lactic acid bacteria in dairy products. *Food Control*, 27(2), 307-313.
- Ladero, V., Coton, M., Fernández, M., Buron, N., Martín, M.C., Guichard, H., Coton, E. and Alvarez, M.A. 2011. Biogenic amines content in Spanish and French natural ciders: application of qPCR for quantitative detection of biogenic amine-producers. *Food Microbiology*, 28(3), 554-561.

- Ladero, V., Martínez, N., Martín, M.C., Fernández, M. and Alvarez, M.A. 2010. qPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products. *Food Research International*, 43(1), 289-295.
- Landete, J.M., de Las Rivas, B., Marcobal, A. and Muñoz, R. 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3), 258-269.
- Lee, T., Pang, S., Abraham, S. and Coombs, G.W. 2019. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 36-47.
- Liu, Y., Han, F., Liu, Y. and Wang, W. 2020. Determination of biogenic amines in wine using modified liquid-liquid extraction with high performance liquid chromatography-fluorescence detector. *Food Analytical Methods*, 13(4), 911-922.
- Linares, D.M., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M.C. and Álvarez, M.A. 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 3, 180.
- Loizzo, M.R., Menichini, F., Picci, N., Puoci, F., Spizzirri, U.G. and Restuccia, D. 2013. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science and Technology*, 30(1), 38-55.
- Lorencová, E., Salek, R.N., Černíková, M., Buňková, L., Hýlková, A. and Buňka, F. 2020. Biogenic amines occurrence in beers produced in Czech microbreweries. *Food Control*, 117, 107335.
- Lucas, P.M., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A. 2008. High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 811-817.
- Luengo, J.M. and Olivera, E.R. 2020. Catabolism of biogenic amines in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1174-1192.
- Mahalleh, A.A. 2017. Hindi Kuşbaşı Örneklerinde Vankomisin Dirençli Enterokokların Varlığı ve Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 152, Ankara.
- Mah, J.H., Park, Y.K., Jin, Y.H., Lee, J.H. and Hwang, H.J. 2019. Bacterial production and control of biogenic amines in Asian fermented soybean foods. *Foods*, 8(2), 85.
- Manero, A. and Blanch, A.R. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4425-4430.

- Marcobal, Á., de las Rivas, B., García-Moruno, E. and Muñoz, R. 2004. The tyrosine decarboxylation test does not differentiate *Enterococcus faecalis* from *Enterococcus faecium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(4), 423-426.
- Martuscelli, M., Arfelli, G., Manetta, A.C. and Suzzi, G. 2013. Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo (Italy). *Food Chemistry*, 140(3), 590-597.
- Masson, F., Talon, R. and Montel, M.C. 1996. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 32(1-2), 199-207.
- Mayer, H.K. and Fiechter, G. 2018. UHPLC analysis of biogenic amines in different cheese varieties. *Food Control*, 93, 9-16.
- Mayr, C.M. and Schieberle, P. 2012. Development of stable isotope dilution assays for the simultaneous quantitation of biogenic amines and polyamines in foods by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3026-3032.
- McAuley, C.M., Britz, M.L., Gobius, K.S. and Craven, H.M. 2015. Prevalence, seasonality, and growth of enterococci in raw and pasteurized milk in Victoria, Australia. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8348-8358.
- Meier, F., Lacroix, C., Meile, L. and Jans, C. 2018. Enterococci and pseudomonads as quality indicators in industrial production and storage of mozzarella cheese from raw cow milk. *International Dairy Journal*, 82, 28-34.
- Meng, G., Zhang, C., Du, P., Sun, S., Zhang, X., Wang, B. and Lu, X. 2022. A Dual-Channel Luminescent Signal Readout Nanoprobe for Rapid Monitoring of Biogenic Amines in Milk and Yogurt. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 131435.
- Merabti, R., Madec, M.N., Chuat, V., Becila, F.Z., Boussekine, R., Bekhouche, F. and Valence, F. 2019. First insight into the technological features of lactic acid bacteria isolated from Algerian fermented wheat Lemzeiet. *Current Microbiology*, 76(10), 1095-1104.
- Michalski, R., Pecyna-Utylska, P. and Kernert, J. 2021. Determination of ammonium and biogenic amines by ion chromatography. A review. *Journal of Chromatography A*, 1651, 462319.
- Miclote, L. 2016. Biogenic amines in food products on the Belgian market. Master Thesis. Universiteit Gent, Faculty of Bioscience engineering, Food Science and Nutrition, 126 pages.
- Mohedano, M.L., López, P., Spano, G. and Russo, P. 2015. Controlling the formation of biogenic amines in fermented foods, In: *Advances in fermented foods and beverages*. Woodhead Publishing, 273-310.

- Mokoena, M.P. 2017. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Moniente, M., García-Gonzalo, D., Ontañón, I., Pagán, R. and Botello-Morte, L. 2021. Histamine accumulation in dairy products: Microbial causes, techniques for the detection of histamine-producing microbiota, and potential solutions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1481-1523.
- Moosavian, M., Ghadri, H. and Samli, Z. 2018. Molecular detection of vanA and vanB genes among vancomycin-resistant enterococci in ICU-hospitalized patients in Ahvaz in southwest of Iran. *Infection and Drug Resistance*, 11, 2269.
- Moreno-Arribas, M.V., Smit, A.Y. and du Toit, M. 2022. Biogenic amines and the winemaking process, In: *Managing Wine Quality*. Reynolds, A.G. (ed), Woodhead Publishing, 595-627.
- Moreno, M.F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 1-24.
- Munir, M.A. and Badri, K.H. 2020. The importance of derivatizing reagent in chromatography applications for biogenic amine detection in food and beverages. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2020, 14 pages.
- Munir, M.A., Badri, K.H. and Heng, L.Y. 2020. Biogenic Amines Detection by Chromatography and Sensor Methods: A Comparative Review. *Science and Technology Indonesia*, 5(4), 90-110.
- Muñoz-Atienza, E., Landeta, G., de las Rivas, B., Gómez-Sala, B., Muñoz, R., Hernández, P.E., Cintas, L.M. and Herranz, C. 2011. Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 212-216.
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P. and Meerdink, G. 2010. Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*, 75(7), R139-R150.
- Nalazek-Rudnicka, K. and Wasik, A. 2017. Development and validation of an LC–MS/MS method for the determination of biogenic amines in wines and beers. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 148(9), 1685-1696.
- Naruka, H.S., Chand, A.E. and Meena, H. 2019. Prevalence of various *Enterococcus* species and their antibiotic resistance pattern among urinary isolates in tertiary care center in South Eastern Rajasthan. *International Journal of Medical Microbiology and Tropical Diseases*, 5, 18-22.

- Navidghasemizad, S., Hesari, J., Saris, P.E.J. and Nazhaei, M.R. 2009. Isolation of lactic acid bacteria from Lighvan cheese, a semihard cheese made from raw sheep milk in Iran. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 260-264.
- Nuñez, M., del Olmo, A. and Calzada, J. 2016. Biogenic Amines, In: *Encyclopedia of Food and Health*. Caballero, B., Finglas, P. M. and Toldrá, F. (eds), Academic Press, 416-423.
- Oladipo, I.C., Sanni, A.I. and Swarnakar, S. 2014. Virulence potential of *Enterococcus gallinarum* strains isolated from selected Nigerian traditional fermented foods. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 3(2), 97-104.
- Oracz, J. and Nebesny, E. 2014. Influence of roasting conditions on the biogenic amine content in cocoa beans of different *Theobroma cacao* cultivars. *Food Research International*, 55, 1-10.
- Ordóñez, J.L., Callejón, R.M., Troncoso, A.M. and García-Parrilla, M.C. 2017. Evaluation of biogenic amines profile in opened wine bottles: Effect of storage conditions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 139-147.
- O'Sullivan, D.J., Fallico, V., O'Sullivan, O., McSweeney, P.L., Sheehan, J.J., Cotter, P.D. and Giblin, L. 2015. High-throughput DNA sequencing to survey bacterial histidine and tyrosine decarboxylases in raw milk cheeses. *BMC Microbiology*, 15(1), 1-12.
- Özdestan, Ö. and Üren, A. 2010. Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product. *European Food Research and Technology*, 231(1), 101-107.
- Özdestan, Ö. 2014. Evaluation of bioactive amine and mineral levels in Turkish coffee. *Food Research International*, 61, 167-175.
- Özogul, F. and Hamed, I. 2018. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 58(10), 1660-1670.
- Özogul, Y. and Özogul, F. 2019. Biogenic Amines Formation, Toxicity, Regulations in Food, In: *Biogenic Amines in Food: Analysis, Occurrence and Toxicity*. Saad, B. and Tofalo, R. (eds), 1-17.
- Palermo, C., Muscarella, M., Nardiello, D., Iammarino, M. and Centonze, D. 2013. A multiresidual method based on ion-exchange chromatography with conductivity detection for the determination of biogenic amines in food and beverages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(2-3), 1015-1023.
- Papageorgiou, M., Lambropoulou, D., Morrison, C., Kłodzińska, E., Namieśnik, J. and Płotka-Wasyłka, J. 2018. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 98, 128-142.

- Papageorgiou, M., Lambropoulou, D., Morrison, C., Namieśnik, J. and Płotka-Wasyłka, J. 2018. Direct solid phase microextraction combined with gas chromatography–Mass spectrometry for the determination of biogenic amines in wine. *Talanta*, 183, 276-282.
- Papavergou, E.J., Savvaidis, I.N. and Ambrosiadis, I.A. 2012. Levels of biogenic amines in retail market fermented meat products. *Food Chemistry*, 135(4), 2750-2755.
- Peng, J.F., Fang, K.T., Xie, D.H., Ding, B., Yin, J.Y., Cui, X.M., Zhang, Y. and Liu, J.F. 2008. Development of an automated on-line pre-column derivatization procedure for sensitive determination of histamine in food with high-performance liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1209(1-2), 70-75.
- Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J. and Ferreira, V. 2012. High-performance liquid chromatography analysis of amines in must and wine: a review. *Food Reviews International*, 28(1), 71-96.
- Perin, L.M. and Nero, L.A. 2017. The relevance of biogenic amines in dairy products, In: *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan*. Watson, R.R., Collier, R.J. and Preedy, V.R. (eds), Academic Press, 169-182.
- Pernica, M., Poloucká, P., Seifertová, M. and Šimek, Z. 2015. Determination of alkylphenols in water samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry after pre-column derivatization with dansyl chloride. *Journal of Chromatography A*, 1417, 49-56.
- Pleva, P., Buňková, L., Lauková, A., Lorencová, E., Kubáň, V. and Buňka, F. 2012. Decarboxylation activity of enterococci isolated from rabbit meat and staphylococci isolated from trout intestines. *Veterinary Microbiology*, 159(3-4), 438-442.
- Popović, N., Djokić, J., Brdarić, E., Dinić, M., Terzić-Vidojević, A., Golić, N. and Veljović, K. 2019. The influence of heat-killed *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 on the tight junction protein expression and immune function in differentiated Caco-2 cells infected with *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. *Frontiers in Microbiology*, 10, 412.
- Pradenas, J., Galarce-Bustos, O., Henríquez-Aedo, K., Mundaca-Urbe, R. and Aranda, M. 2016. Occurrence of biogenic amines in beers from Chilean market. *Food Control*, 70, 138-144.
- Prpich, N.Z.P., Castro, M.P., Cayré, M.E., Garro, O.A. and Vignolo, G.M. 2015. Autochthonous starter culture selection to keep traditions in the manufacture of dry sausages alive. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1709-1719.

- Radovanovic, M., Jevtic, D., Barsoum, M.K., Patel, J. and Dumic, I. 2022. *Enterococcus durans* Cardiac Implantable Electronic Device Lead Infection and Review of *Enterococcus durans* Endocarditis Cases. *Medicina*, 58(2), 307.
- Rafehi, M., Faltraco, F., Matthaei, J., Prukop, T., Jensen, O., Grytzmann, A., Blome, F.G., Berger, R.G., Krings, U., Vormfelde, S.V., Tzvetkov, M.V. and Brockmöller, J. 2019. Highly variable pharmacokinetics of tyramine in humans and polymorphisms in OCT1, CYP2D6, and MAO-A. *Frontiers in Pharmacology*, 1297.
- Ramos, R.M., Brandão, P.F. and Rodrigues, J.A. 2020. Development of a SALLE-HPLC-FLD analytical method for the simultaneous determination of ten biogenic amines in cheese. *Food Analytical Methods*, 13(5), 1088-1098.
- Ramos, R.M., Valente, I.M. and Rodrigues, J.A. 2014. Analysis of biogenic amines in wines by salting-out assisted liquid–liquid extraction and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Talanta*, 124, 146-151.
- Reinseth, I.S., Ovchinnikov, K.V., Tønnesen, H.H., Carlsen, H. and Diep, D.B. 2020. The increasing issue of vancomycin-resistant enterococci and the bacteriocin solution. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 1203-1217.
- Restuccia, D., Loizzo, M.R. and Spizzirri, U.G. 2018. Accumulation of biogenic amines in wine: role of alcoholic and malolactic fermentation. *Fermentation*, 4(1), 6.
- Restuccia, D., Spizzirri, U.G., Parisi, O.I., Cirillo, G. and Picci, N. 2015. Brewing effect on levels of biogenic amines in different coffee samples as determined by LC-UV. *Food Chemistry*, 175, 143-150.
- Restuccia, D., Spizzirri, U.G., Puoci, F., Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O.I., Lemma, F. and Picci, N. 2011. A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector. *Talanta*, 85(1), 363-369.
- Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J. and Rodríguez, J.M. 2005. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*, 21(2), 131-137.
- Rohani, S.M.R., Aliakbarlu, J., Ehsani, A. and Hassanzadazar, H. 2013. Biogenic amines determination in some traditional cheeses in West Azerbaijan province of Iran. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, 4(2), 115-118.
- Ruiz-Capillas, C. and Herrero, A.M. 2019. Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods*, 8(2), 62.

- Ruiz-Ripa, L., Feßler, A.T., Hanke, D., Eichhorn, I., Azcona-Gutiérrez, J.M., Pérez-Moreno, M.O., Seral, C., Aspiroz, C., Alonso, C.A., Torres, L., Alós, J.I., Schwarz, S. and Torres, C. 2020. Mechanisms of linezolid resistance among enterococci of clinical origin in Spain-detection of *optrA*-and *cfr* (D)-carrying *E. faecalis*. *Microorganisms*, 8(8), 1155.
- Russo, P., Capozzi, V., Spano, G., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. and Bevilacqua, A. 2016. Metabolites of microbial origin with an impact on health: ochratoxin A and biogenic amines. *Frontiers in Microbiology*, 7, 482.
- Russo, P., Spano, G., Arena, M.P., Capozzi, V., Grieco, F. and Beneduce, L. 2010. Are consumers aware of the risks related to biogenic amines in food. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1087-1095.
- Saaïd, M., Saad, B., Ab Rahman, I., Ali, A.S.M. and Saleh, M.I. 2010. Extraction of biogenic amines using sorbent materials containing immobilized crown ethers. *Talanta*, 80(3), 1183-1190.
- Sagun, E., Ekici, K. and Durmaz, H. 2005. The formation of histamine in Herby cheese during ripening. *Journal of Food Quality*, 28(2), 171-178.
- Sallem, R.B., Klibi, N., Klibi, A., Said, B.L., Dziri, R., Boudabous, A., Torres, C. and Slama, K.B. 2016. Antibiotic resistance and virulence of enterococci isolates from healthy humans in Tunisia. *Annals of Microbiology*, 66, 717-725.
- Sanlibaba, P., Tezel, B.U. and Senturk, E. 2018. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from chicken in Turkey. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(2), 391.
- Sanlier, N. and Bektesoglu, M. 2021. Migraine and Biogenic Amines. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 11(4), 1362-1371.
- Santos, M.H.S. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3), 213-231.
- Schirone, M., Esposito, L., D'Onofrio, F., Visciano, P., Martuscelli, M., Mastrocola, D. and Paparella, A. 2022. Biogenic Amines in Meat and Meat Products: A Review of the Science and Future Perspectives. *Foods*, 11(6), 788.
- Schirone, M., Tofalo, R., Fasoli, G., Perpetuini, G., Corsetti, A., Manetta, A.C., Ciarrocchi, A. and Suzzi, G. 2013. High content of biogenic amines in Pecorino cheeses. *Food Microbiology*, 34(1), 137-144.
- Schirone, M., Visciano, P., Tofalo, R. and Suzzi, G. 2017. Histamine food poisoning, In: Histamine and histamine receptors in health and disease. Hattori, Y. and Seifert R. (eds), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 241, 217-235.

- Sciancalepore, A.G., Mele, E., Arcadio, V., Reddavid, F., Grieco, F., Spano, G., Lucas, P., Mita, G. and Pisignano, D. 2013. Microdroplet-based multiplex PCR on chip to detect foodborne bacteria producing biogenic amines. *Food Microbiology*, 35(1), 10-14.
- Setia, N. and Setia, R.C. 2018. Polyamines: an overview and prospects in crop improvement. *Crop Improv Strateg App*, 376-393.
- Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M.F., Figueiredo Marques, J.J., Tenreiro, R. and Barreto Crespo, M.T. 2003. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2569-2576.
- Shalaby, A.R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7), 675-690.
- Shikongo-Nambabi, M.N.N.N., Shoolongela, A. and Schneider, M.B. 2012. Control of bacterial contamination during marine fish processing. *Journal of Biology and Life Science*, 3(1), 1-17.
- Shukla, S., Park, H.K., Kim, J.K. and Kim, M. 2010. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food and Chemical Toxicology*, 48(5), 1191-1195.
- Silva, L.F., Casella, T., Gomes, E.S., Nogueira, M.C.L., De Dea Lindner, J. and Penna, A.L.B. 2015. Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, 80(2), M411-M417.
- Singh, K.V., Nallapareddy, S.R. and Murray, B.E. 2007. Importance of the *ebp* (endocarditis and biofilm-associated pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(11), 1671-1677.
- Slyvka, I., Tsisaryk, O., Musii, L., Kushnir, I., Kozirowski, M. and Kozirowska, A. 2022. Identification and investigation of properties of strains *Enterococcus* spp. isolated from artisanal Carpathian cheese. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39, 102259.
- Stahl, S.M. and Felker, A. 2008. Monoamine oxidase inhibitors: a modern guide to an unrequited class of antidepressants. *CNS Spectrums*, 13(10), 855-871.
- Standarová, E., Vorlová, L., Kordiovská, P., Janštová, B., Dracková, M. and Borkovcová, I. 2010. Biogenic Amine Production in Olomouc Curd Cheese (Olomoucké tvarůžky) at Various Storage Conditions. *Acta Veterinaria Brno*, 79(1).

- Stojanović, Z. and Kos, J. 2020. Detection of metabolites of microbial origin in beverages with harmful effect on human health-Biogenic amines and mycotoxins, In: Safety Issues in Beverage Production. Grumezescu, A.M. and Holban, A.M. (eds), Academic Press, 39-77.
- Sun, X., Zhou, K., Gong, Y., Zhang, N., Yang, M., Qing, D., Li, Y., Lu, J., Li, J., Feng, C., Li, C. and Yang, Y. 2016. Determination of biogenic amines in Sichuan-style spontaneously fermented sausages. Food Analytical Methods, 9(8), 2299-2307.
- Suzzi, G., Perpetuini, G. and Tofalo, R. 2022. Biogenic Amines, In: Encyclopedia of Dairy Sciences. McSweeney, P.L.H. and McNamara, J.P. (eds), Academic Press, 95-102.
- Şanlı, T. and Şenel, E. 2015. Formation of biogenic amines in cheese, In: Processing and Impact on Active Components in Food. Academic Press, 223-230.
- Şentürk, E. 2017. Antimikrobiyel Aktiviteye Sahip Enterokok Suşlarının Moleküler Düzeyde Tanımlanması ve Antibiyotik Dirençlilik Düzeylerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 124, Ankara.
- Taban, B.M., Doğan Halkman, H.B. ve Halkman, A.K. 2014. Biology of the *Enterococcus* spp., In: Microflora of the Intestine. Batt, C.A. and Tortorello, M.L. (eds), Encyclopedia of Food Microbiology, Academic Press, 652-657.
- Tabanelli, G., Montanari, C., Bargossi, E., Lanciotti, R., Gatto, V., Felis, G., Torriani, S. and Gardini, F. 2014. Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. International Journal of Food Microbiology, 190, 14-23.
- Tatlı, D. 2009. Geleneksel Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J. and In't Veld, J.H. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. International Journal of Food Microbiology, 11(1), 73-84.
- Toğay, S.Ö. 2010. Doğal Fermente Gıdalar ve Anne Sütünden Enterokokların İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Bunların Probiyotik Kültür Olarak Kullanılabilme Potansiyelinin Araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Toğay, S.Ö., Temiz, A., Çelebi, A., Açıık, L. and Yalçın, S.S. 2014. Investigation of potential virulence genes and resistance characteristic of *Enterococcus faecalis* isolates form human milk and colostrum samples. Turkish Journal of Biology, 38, 357-364.

- Toğay, S.Ö. ve Temiz, A. 2011. Gıda kaynaklı enterokokların gıda ve insan sağlığı yönünden önemi. *Gıda*, 36(5), 303-310.
- Toro-Funes, N., Bosch-Fuste, J., Latorre-Moratalla, M.L., VecianaNogués, M.T. and Vidal-Carou, M.C. 2015. Biologically active amines in fermented and non-fermented commercial soybean products from the Spanish market. *Food Chem.*, 173, 1119-1124.
- Toru, M., Beyene, G., Kassa, T., Gizachew, Z., Howe, R. and Yeshitila, B. 2018. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* species isolated from clinical samples of pediatric patients in Jimma University Specialized Hospital, south west Ethiopia. *BMC Research Notes*, 11(1), 1-6.
- Triki, M., Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F. and Ruiz-Capillas, C. 2018. Quality assessment of fresh meat from several species based on free amino acid and biogenic amine contents during chilled storage. *Foods*, 7(9), 132.
- Tsai, Y.H., Kung, H.F., Chang, S.C., Lee, T.M. and Wei, C.I. 2007. Histamine formation by histamine-forming bacteria in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product. *Food Chemistry*, 103(4), 1305-1311.
- Tsanasidou, C., Asimakoula, S., Sameli, N., Fanitsios, C., Vandera, E., Bosnea, L., Koukkou A.I. and Samelis, J. 2021. Safety evaluation, biogenic amine formation, and enzymatic activity profiles of autochthonous enterocin-producing Greek cheese isolates of the *Enterococcus faecium/durans* group. *Microorganisms*, 9(4), 777.
- Uludağ, H. 2015. Klinik ve Gıda Kaynaklı Enterokoklar Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Bazı Patojen Bakteriler Üzerine Antimikrobiyel Etkilerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.
- Valenzuela, A.S., Omar, N.B., Abriouel, H., Lopez, R.L., Veljovic, K., Canamero, M.M., Topisirovic, M.K.L. and Galvez, A. 2009. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control* 20,381–385.
- van Schaik, W. and Willems, R.J. 2010. Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(6), 527-532.
- Vieira, C.P., da Costa, M.P., Silva, V.L., da Silva Frasao, B., de Aquino, L.F.C., de Oliveira Nunes, Y.E. and Conte-Junior, C.A. 2020. Development and validation of RP-HPLC-DAD method for biogenic amines determination in probiotic yogurts. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1582-1597.

- Vinci, G., Maddaloni, L., Prencipe, S.A. and Ruggieri, R. 2021. Natural Contaminants in Wines: Determination of Biogenic Amines by Chromatographic Techniques. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(19), 10159.
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R. and Suzzi, G. 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood. *Frontiers in Microbiology*, 3(188), 1-10.
- Wang, J., Zhang, X., Li, X., Yu, Z., Hu, J. and Zhu, Y. 2021. Effects of plant extracts on biogenic amine accumulation, bacterial abundance and diversity in fermented sausage. *CyTA-Journal of Food*, 19(1), 771-781.
- Wang, X., Zhang, Y., Li, C., Li, G., Wu, D., Li, T., Qu, Y., Deng, W., He, Y., Penttinen, P., Zhang, H., Huang, Y., Zhao, K. and Zou, L. 2022. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus* spp. isolated from the feces of giant panda. *BMC Microbiology*, 22(1), 1-11.
- Worsztynowicz, P., Schmidt, A.O., Białas, W. and Grajek, W. 2019. Identification and partial characterization of proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* relevant to their application in dairy industry. *Acta Biochimica Polonica*, 66(1), 61-69.
- Wójcik, W., Łukasiewicz, M. and Puppel, K. 2021. Biogenic amines: formation, action and toxicity—a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2634-2640.
- Wu, H., Li, G., Liu, S., Ji, Z., Zhang, Q., Hu, N. and You, J. 2015. Simultaneous determination of seven biogenic amines in foodstuff samples using one-step fluorescence labeling and dispersive liquid–liquid microextraction followed by hplcfd and method optimization using response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 8(3), 685-695.
- Yeğin, S. ve Üren, A. 2008. Gıdalarda biyojen amin oluşumunu etkileyen faktörler, Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, 977-980, Erzurum.
- Yerlikaya, O. and Akbulut, N. 2020. In vitro characterisation of probiotic properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1), 98-107.
- Yılmaz, E.Ş., Aslantaş, Ö., Önen, S.P., Türkyılmaz, S. and Kürekci, C. 2016. Prevalence, antimicrobial resistance and virulence traits in enterococci from food of animal origin in Turkey. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 20-26.
- Yoğurtçu, N. 2011. Tulum Peynirinden Enterokok Suşlarının İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta.

- Yüksel, F.N., Akçelik, N. and Akçelik, M. 2015. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains, isolated from traditional cheeses in Turkey. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 30(4), 206-215.
- Zhang, Y.J., Zhang, Y., Zhou, Y., Li, G.H., Yang, W.Z. and Feng, X.S. 2019. A review of pretreatment and analytical methods of biogenic amines in food and biological samples since 2010. *Journal of Chromatography A*, 1605, 360361.
- Zhao, Y., Zhang, X., Jin, H., Chen, L., Ji, J. and Zhang, Z. 2022. Histamine Intolerance- A Kind of Pseudoallergic Reaction. *Biomolecules*, 12(3), 454.

