

## Biberiye Esansiyel Yağı ve Nanoemülsiyonunun Balık Kaynaklı Patojenik ve Bozulma Etmeni Bakteriler Tarafından Üretilen Biyojenik Aminler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Yılmaz UÇAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ordu Üniversitesi, Fatsa Deniz Bilimleri Fakültesi, Fatsa/ORDU, Türkiye

<sup>1</sup>https://orcid.org/0000-0002-6770-6652

✉: yucar@cu.edu.tr

### ÖZET

Biberiye esansiyel yağı ve bunun nanoemülsiyonunun balıkta bozulma etmeni bakteriler (*Pseudomonas luteola*, *Photobacterium damsela*, *Vibrio vulnificus*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia liquefaciens* ve *Proteus mirabilis*) ve gıda kaynaklı patojenik bakterilerin (*Salmonella* Paratyphi A, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis*) gelişimi ve biyojenik amin üretimleri üzerine etkileri histidin dekarboksilaz sıvısında (HDB) HPLC yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Ekstrakte edilmiş biberiye esansiyel yağının uçucu bileşenleri GC-MS kullanılarak belirlenmiştir ve elde edilen nanoemülsiyonların fiziksel özellikleri (viskozite, termodinamik kararlılık, damlacık boyutu ve yüzey gerilimi) analiz edilmiştir. Gruplar arasında amonyak (AMN) ve biyojenik amin (BA) üretiminde istatistiksel farklılıklar gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). En yüksek histamin (HIS) üretimi, bozucu *E. faecalis* (188.55 mg/L) suşunda ve en düşük *S. Paratyphi A* (0.23 mg/L) suşunda gözlenmiştir. Putresin (PUT), kadaverin (CAD), spermidin (SPD) ve 2-feniletilamin (PHEN) gibi hemen hemen tüm diğer BA'ler patojenler ve bozulma grupları tarafından üretilmiştir. *P. damsela*, HDB'deki en yüksek tiramin (TYR) üreten (22.77-145.58 mg/L) suş olmuştur. *P. luteola* tarafından HIS üretimi, biberiye nanoemülsiyonu varlığında önemli ölçüde baskılanmıştır ( $p < 0.05$ ). Muamele gruplarının (Tween 80, biberiye esansiyel yağı ve nanoemülsiyonu) etkisi bakteri suşuna ve spesifik amine bağlı olarak değişse de, tüm muamele grupları genel olarak bakteriler tarafından AMN ve BA üretimini azaltmıştır. Sonuç olarak, mevcut çalışma test edilen tüm bakterilerin birden fazla amino asidi dekarboksile etme yeteneğine sahip olduğunu, biberiye esansiyel yağının nanoemülsiyona dönüştürülmüş formunun biyojenik amin üretimlerini baskıladığını ve bunun işlenmiş veya paketlenmiş balık veya gıda ürünlerinde alternatif bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

### Su Ürünleri

### Araştırma Makalesi

### Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 03.12.2021

Kabul Tarihi : 18.03.2022

### Anahtar Kelimeler

Nanoemülsiyon  
Biberiye uçucu yağı  
Biyojenik amin  
Gıda kaynaklı patojen  
Bozucu bakteri

## Inhibitory Effect of Rosemary Essential Oil and Its Nanoemulsion on The Formation of Biogenic Amines by Food-Borne Pathogens and Fish Spoilage Bacteria in Histidine Decarboxylase Broth

### ABSTRACT

The effect of nanoemulsions based on essential oil of rosemary and its purified version on the growth of fish spoilage bacteria (*Pseudomonas luteola*, *Photobacterium damsela*, *Vibrio vulnificus*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia liquefaciens*, and *Proteus mirabilis*) and food-borne pathogens (*Salmonella* Paratyphi A, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterococcus faecalis*) and their biogenic amine formation were investigated in histidine decarboxylase broth (HDB) using HPLC method. The flavour compounds of extracted rosemary oil were determined using GC-MS. Physical properties of nanoemulsions (viscosity, thermodynamic stability, droplet size, and surface tension) were analysed. Differences in ammonia (AMN) and biogenic amine (BA) production among groups were statistically significant ( $p < 0.05$ ). The highest HIS production was obtained by spoilage *E. faecalis* (188.55 mg/L) and the lowest by *S. Paratyphi A* (0.23 mg/L). Almost all other BAs

### Fisheries

### Research Article

### Article History

Received : 03.12.2021

Accepted : 18.03.2022

### Keywords

Nanoemulsion  
Rosemary essential oils  
Biogenic amine  
Food-borne pathogen  
Spoilage bacteria

such as PUT, CAD, SPD, and PHEN were formed by pathogens and spoilage groups. *P. damsela* (22.77-145.58 mg/L) was the main high tyramine producer in HDB. Histamine production by *P. luteola* was considerably suppressed in the presence of rosemary-based nanoemulsion ( $p < 0.05$ ). Although the effect of treatment groups (Tween 80, rosemary essential oil, and its nanoemulsion) varied depending on the bacterial strain and specific amine, all groups generally decreased AMN and BA accumulation by bacteria. Consequently, the results of this current study show that all bacteria tested are capable of decarboxylating more than one amino acid and conversion of rosemary oil into a nanoemulsion suppressed biogenic amine production activity and its nano-form can be used as an alternative antimicrobial agent in processed or packaged fish or food products.

- Atıf Şekli:** Uçar, Y., (2023) Biberiye esansiyel yağı ve nanoemülsiyonunun gıda kaynaklı patojenik ve bozulma etmeni bakteriler tarafından üretilen biyojenik aminler üzerine etkilerinin histidin dekarboksilaz sıvısında incelenmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg 26* (2), 409-423. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1032177>.
- To Cite :** Uçar, Y., (2023). Inhibitory effect of rosemary essential oil and its nanoemulsion on the formation of biogenic amines by food-borne pathogens and fish spoilage bacteria in histidine decarboxylase broth. *KSU J. Agric Nat 26*(2), 409-423. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1032177>.

## GİRİŞ

Taze su ürünlerinin kalitesi, gıda endüstrisi ve tüketiciler için büyük bir öneme sahiptir. Su ürünlerinin bozulması, başta kalite kaybına sonrasında da bozulmaya neden olan bakteriyel aktivitenin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Balık ve balık ürünlerinde bozulma ile doğrudan ilişkili olmayan patojen mikroorganizmalar da vardır. Özellikle uygun olmayan üretim ve işleme uygulamaları bu ürünlerde patojenik bakterilerin gelişimini desteklemektedir. Bu nedenle balıklar *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Vibrio*, *Bacillus cereus* ve *Escherichia coli* barındırabilmekte ve bu bakterilerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri ile ilgili vakalara yol açabilmektedir. Bu mikroorganizmalar, balık ve balık ürünlerinde yerel sağlık problemlerine yol açan toksik maddeleri üretmede yetenekli olmaktadır (Kuley ve ark., 2012).

Söz konusu bu mikroorganizmaların ürettikleri istenmeyen bileşiklerinden olan biyojenik aminler, insan ve hayvanlarda hastalığa yol açan toksik maddelerdir. Bu aminler balık, balık ürünleri, et ürünleri, yumurta, peynir, fermente sebzeler, meyveler, soya ürünleri, bira, şarap, fındık ve çikolata gibi geniş gıda ürünlerinde mevcut olmaktadır (Brink ve ark., 1990; Silla-Santos, 1996). Aminler, amino asitlerin dekarboksilasyonu ile canlı organizmaların (bakteriler) faaliyeti sonucu üretildiği zaman biyojenik olarak adlandırılırlar (Shalaby, 1996). Biyojenik aminler düşük molekül ağırlıklı organik bazlardır ve mikrobiyal, bitki ve hayvan metabolizması tarafından sentezlenmektedirler (Brink ve ark., 1990). Biyolojik olarak aktif aminler sinir ve metabolizma gibi biyolojik sistemlerde önemli fonksiyonlara sahip olmalarından dolayı önemlidir. Biyojenik aminler aynı zamanda kanseri tetikleyici etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu aminler aynı zamanda gıda kalitesini belirlemede bir gösterge sağlamaktadır (Anderson, 2008). Ancak

vücudun tolere edebileceği limitlerin üzerinde olması akut toksisite gibi ölüme kadar varabilecek ciddi problemlere de neden olmaktadır.

Günümüzde hızla gelişen gıda teknolojisine paralel şekilde tüketici bilinçlenmesi ve buna bağlı olarak gelişen, üreticilerin ürün kalitesini iyileştirme çabaları da artmakta ve yeni çözüm arayışlarına gidilmektedir. Tüketicilerin yaşamları için temel gereksinimleri olan gıdaların, güncel teknolojik gereklere doğrultusunda üretilmesi, sağlıklı beslenmenin sağlanması yolunda önemli bir hizmettir. Bu hizmeti sunan üretici açısından ise uygulanan yöntemlerin hem en iyi sonuç vermesi hem de ekonomik açıdan uygun olması da kaçınılmaz bir gerçektir. Gelişen gıda endüstrisi ile birlikte gıdaların raf ömürlerini uzatmak için çeşitli gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda insanlarda sağlık riskleri oluşturmasından dolayı kimyasal koruyucuların yerine doğal alternatif katkı maddelerin kullanımına karşı talepler artmaktadır (Uçar, 2020; Agatemor, 2009).

Besinlerin koku ve tat gibi özelliklerini artırmak için katkı olarak kullanılan doğal aromatik bitkiler giderek önem kazanmıştır. Doğal aromatik bitkilerin antioksidan kapasitelerinin, sentetik antioksidanlardan daha fazla olduğu kanıtlanmıştır. Kendilerine özgü lezzet ve aromaları, antimikrobiyel ve antioksidan özellikleriyle, daha geniş bioaktivite profiline sahip olan bitkiler, gıda sektöründe alternatif olarak kullanılabilir doğal antioksidan maddelerdir. Gıdalarda lipid oksidasyonunun bu tür doğal maddelerle önlenmesi üretici ve tüketici açısından oldukça önemlidir. Son yıllarda biberiye (*Rosmarinus officinalis*), kekik (*Thymus vulgaris*), adaçayı (*Salvia officinalis*), defne (*Laurus nobilis*) ve fesleğen (*Ocimum basilicum*) gıdalarda doğal koruyucu olarak kullanılmaktadır. Aromatik bitkiler arasında biberiye (*Rosmarinus officinalis*) gıdalarda

doğal koruyucu olarak oldukça fazla kullanılmaktadır (Dimitrijevic ve ark., 2007). Akgül (1993), Türkiye’de yetişen ve yetiştirilen aromatik bitkilerden biberiyenin (*Rosmarinus officinalis*) en güçlü antioksidan ve antimikrobiyal etkiye sahip bitkiler arasında olduğunu belirtmişlerdir. Bazı araştırmacılar tarafından biberiye uçucu yağ bileşenlerinin de antioksidan ve antimikrobiyal etkisi olduğu ve önemli düzeyde insan sağlığı açısından antioksidan özelliklere sahip fitokimyasalları içerdiği saptanmıştır (Moghtader ve ark., 2013). Ancak bu yağın tek başına kullanımı bazı mikroorganizmalara etkisini sınırlamakta, dolayısıyla daha etkili olmaları için nanoteknolojik uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Gelişen teknoloji ile birlikte genelde gıda sektörü özelde ise su ürünleri dahil olmak üzere pek çok alan etkilenmekte ve nanoteknoloji gıda sanayisinde ve gıda teknolojileri biliminde; gıda ürünlerinin oksidasyondan korunmasında, patojenlerin belirlenmesinde, gıda güvenliği ve kalite analizlerinde, enkapsüle edilmiş besin maddelerinin, vitamin ve lezzet maddelerinin kontrollü salımı ve dağıtılması amaçlarıyla kullanılmaktadır. Ayrıca gelişen son teknolojilerle birlikte gıda ambalajlarının gaz ve nem bariyerleri ile geliştirilmesinde ve mekanik dayanımının artırılmasında, antibakteriyel ve kendi kendini temizleyebilme özelliğine sahip ambalajların üretiminde, akıllı ve aktif paketleme sistemlerinde, nakliye sırasında ürün durumunun izlenmesinde nanoteknoloji etkin bir şekilde rol oynamaktadır. Nanoteknoloji ile birlikte gıda endüstrisinde kullanılan yöntemler arasında emülsiyon hazırlama tekniği oldukça yaygın kullanılmaktadır. Emülsiyonlar, basit bir tanımlama ile birbiri ile karışmayan en az iki sıvının birbirleri içerisinde damlacıklar halinde dağıldığı heterojen sistemler olup hidrofilik ve lipofilik iki fazdan oluşurlar. Bunlar emülsiyonun iç ve dış fazı olarak adlandırılmaktadır. Nanoemülsiyonlarda damlacıklar boyut olarak 20-100 nm arasında bir dağılım göstermektedirler. Nanoemülsiyonlar, FDA tarafından GRAS olarak bilinen insan tüketimi ve yaygın gıda maddeleri için onaylanmış surfaktanlar kullanılarak hazırlanmaktadır (Mao ve ark., 2009). Nano yapılar ultrasonik çalkalama, yüksek basınçlı homojenizasyon ve mikro-akışkan kanallar kullanılarak elde edilirler (Mason ve ark., 2006; Nakajima, 2005). Bunlar içerdikleri nano-damlacıklar vasıtasıyla, fonksiyonel ve biyoaktif ürünlerin enkapsülasyonu ve taşınmasının sağlanması amacıyla geliştirilen en önemli iletim sistemlerinden birisidir.

Mevcut bilgiler doğrultusunda literatür araştırması sonucu gıda endüstrisinde nanoteknolojiye dayalı teknikler kullanılarak nanoparçacıkların özelliklerinden faydalanmak mümkün olup, bu çalışma ile antimikrobiyal özellik içeren biberiye

esansiyel yağlarına dayalı nanoemülsiyonun *in vitro* olarak antimikrobiyal etkileri gıda kaynaklı patojenler (*Salmonella Paratyphi A*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ve *Klebsiella pneumoniae*) ve balıkta bozulma etmeni bakteriler (*Photobacterium damsela*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio vulnificus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia liquefaciens* ve *Pseudomonas luteola*) tarafından üretilen ve toksik olan biyojenik aminler üzerinde araştırılmıştır. Bu çalışma ile ayrıca biberiye esansiyel yağının etken madde analizleri yapılmış ve biberiye esansiyel yağ kullanılarak elde edilen nanoemülsiyonların fiziksel özellikleri (damlacık boyutu, yüzeysel gerilim, yoğunluğu, temodinamik stabilitesi) belirlenmiştir.

## MATERYAL ve METOD

### Bakteriyel suş izolasyonu ve identifikasyonu

Balık bozulma bakterilerinin (*P. damsela*, *E. faecalis*, *V. vulnificus*, *P. mirabilis*, *S. liquefaciens*, *P. luteola*) izolasyonu ve tanımlanması Yazgan ve ark., (2019) tarafından bildirilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Bakteriler, Akdeniz’de yakalanan üç bozulmuş balık türü olan uskumru (*Scomber scombrus*), hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve sardalya (*Sardinella aurita*) ve Adana yakınlarındaki yerel bir çiftlikten elde edilen gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’ndan elde edilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* (ATCC700603), *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) ve *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (Rockville, USA), *Salmonella Paratyphi A* (NCTC13) ise Tıp Kültürleri Ulusal Koleksiyonundan (Londra, Birleşik Krallık) temin edilmiştir.

### Uçucu Yağ Eldesi ve Bileşimi

Biberiye (*Rosmarinus officinalis*) uçucu yağları BIOMESI (Adana, Türkiye) firmasından elde edilmiştir. Esansiyel yağ, yuvarlak tabanlı bir şişe, uçucu yağ tayini için kullanılan bir tüp ve bir geri akış kondansatöründen oluşan Clavenger tipi bir cihaz kullanılarak hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Esansiyel yağ, analiz için kullanılabildiği kadar 4°C’de depolanmıştır.

Esansiyel yağ kompozisyonunun tanımlanması, Yazgan ve ark., (2019) tarafından detaylı olarak tarif edildiği gibi Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS, Perkin Elmer Clarus 500, Waltham, ABD) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Hekzan içinde seyreltilmiş 1 µL uçucu yağ GC aparatına enjekte edilmiştir. Ayrırma, bir Perkin Elmer SGE polar olmayan kaynaşmış silika kapiler kolon (60 mx 0.25 mm) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Fırın sıcaklığı 10 dakika 60°C’ye ayarlanmış, ardından 250°C’ye yükselttilerek 10 dakika bu sıcaklıkta tutulmuştur. Enjektör sıcaklığı 220°C olarak ayarlanmış ve taşıyıcı gaz olarakta 1.5 mL/dk akış hızındaki helyum



kullanılmıştır. İyon kaynağı için elektronik iyonizasyon enerjisi 200°C sıcaklıkla 70eV olarak ayarlanmıştır. Taranan kütle aralığı, 250°C arayüz hattı sıcaklığı ile 35-425 m/z olmuştur. Etken maddeler, NIST-MS ve WILEY-MS kitaplıkları kullanılarak tanımlanmıştır.

### Nanoemülsiyon Hazırlanması

Biberiye esansiyel yağı (su içinde yağ) bazı nanoemülsiyon, ultrasonik emülsifikasyon temelli yüksek enerjili bir işlemle Özoğul ve ark. (2017) tarafından bildirilen yöntemle göre küçük modifikasyonlar yapılarak hazırlanmıştır. Suda yağ nanoemülsiyonu, toplam nanoemülsiyonun %11'ini oluşturan bir yağ fazı ve toplam nanoemülsiyonun %89'unu oluşturan su fazı kullanılarak hazırlanmıştır. Nanoemülsiyon, biberiye esansiyel yağının Tween 80 (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya) ve su ile 10:1:89 w/w oranında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra emülsiyonlar ultrasonik homojenizatör (Optic Ivymen System CY-500, Barselona, İspanya) kullanılarak 72 amplitüdde (titreşim genliği) 15 dakika homojenize edilmiştir. Ultrasonik homojenleştiricinin gücü 500 W ve yayılan ultrasonun frekansı 20 KHz olmuştur. Enerji girişi, 1/4 inç titanyum alaşımli prob (5.6 mm çap (Ø) ve 60 mm yükseklik) içeren bir piezoelektrik dönüştürücü içeren bir sonotrot kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında, emülsiyonun ürettiği ısı, beher etrafında buz kullanılarak kontrol edilmiştir. Ultrasonikasyon yöntemiyle biberiye esansiyel yağı nanoemülsiyonunun üretimi için şematik diyagram Şekil 1'de gösterilmektedir.

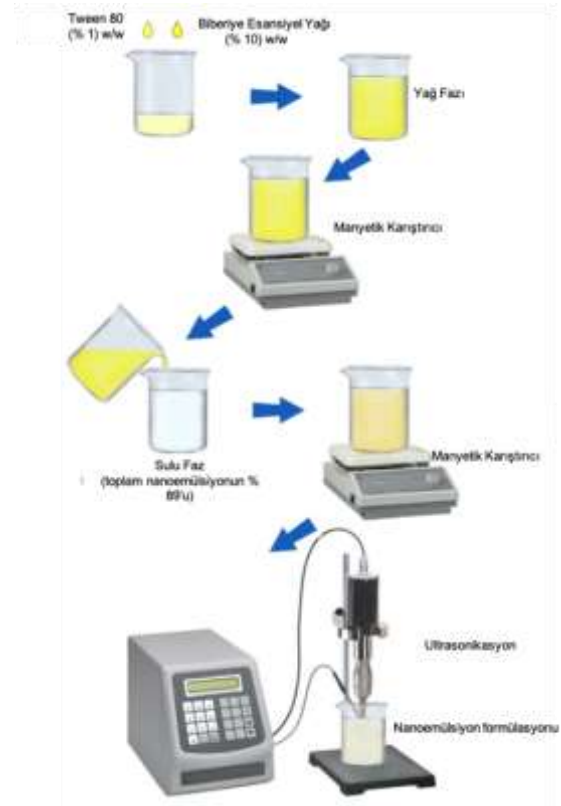
### Nanoemülsiyonların Fiziksel Özellikleri

Biberiye esansiyel yağı nanoemülsiyonlarının (Şekil 2) fiziksel özelliklerinin tüm ölçümleri 25 °C'de Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez laboratuvarlarından hizmet alımı yapılarak analiz edilmiştir. Nanoemülsiyonun ortalama damlacık boyutu ve polidispersite indeksi, Malvern Panalytical Mastersizer 2000 (Malvern, İngiltere) kullanılarak analiz edilmiştir. Termodinamik stabilite, Shafiq ve ark., (2007) tarafından önerilen yöntem kullanılarak 14 gün boyunca analiz edilmiştir. Nanoemülsiyonun viskozitesi, ARES reometre (TA Instruments, New Castle, ABD) ile ölçülmüştür. Nanoemülsiyonun yüzey gerilimi Attension Theta gonyometer (Biolin Scientific, Espoo, Finlandiya) ile ölçülmüştür.

### Histidin Dekarboksilasyon Sıvısının Hazırlanması ve Bakterilerin Aşılması

Bu çalışmada kullanılan tüm gıda kaynaklı patojenik suşlar ile bozucu bakterilerin biyojenik amin üretimleri, histidin dekarboksilaz sıvısı (HDB) kullanılarak incelenmiştir. Histidin dekarboksilaz sıvısı, 1 g pepton, 0.5 g Lab-Lemco tozu (Oxoid

CM0017, Hampshire, İngiltere), 2.5 g NaCl (Merck 1.06404.1000, Darmstadt, Almanya), 4.01 g L-histidin (Sigma, Steinheim, Almanya) ve 500 mL distile su içerisinde 2.5 mg piridoksal HCl (Sigma P9130,



Şekil 1. Ultrasonikasyon yöntemiyle biberiye esansiyel yağı nanoemülsiyonunun üretimi için şematik diyagram

Figure1.Schematic diagram an overview for manufacturing of rosemary essential oil nanoemulsion by ultrasonication method



Şekil 2. Biberiye esansiyel yağı kullanılarak oluşturulan nanoemülsiyon

Figure 2. Rosemary essential oil based nanoemulsion

Steinheim, Almanya) pH (5.5 - 6.8), 1M KOH (Riedel-deHaen 06005, Seelze, Almanya) veya % 6 TCA (Riedel-deHaen 27242, Seelze, Almanya) ile optimum büyüme pH'larına göre ayarlanmıştır. Bu aşamadan sonra HDB, 10 ml'lik şişelere konularak kullanılmadan önce 15 dakika içinde 121°C'de otoklavlanmıştır. Daha sonra stok kültürlerden 0.5 mL alınarak, biyojenik amin üretmesi için HDB'ye inoküle edilmiştir. Bu şekilde kullanılan her bir bakteri türünün özellikle, histamin (HIS), kadaverin (CAD), tiramin (TYR), triptamin (TRPT), 2-feniletilamin (PHEN), agmatin (AGM), putresin (PUT), spermin (SPN), spermidin (SPD), dopamin (DOP) ve serotonin (SER) üretim kapasitesi belirlenmiştir. Kontrol grubunda HDB içerisine herhangi bir emülsiyon katkısı olmamıştır.

### Histidin Dekarboksilasyon Sıvısında Toplam Bakteriyel Gelişimin Belirlenmesi

Histidin dekarboksilaz sıvısı toplamda 4 gruptan oluşmaktadır. Bunlar, kontrol grubu (herhangi bir katkı olmayan), Tween 80 (%1) grubu, BEO (%1 biberiye esansiyel yağı) grubu ve BNE (% 1 biberiye esansiyel yağı kullanılarak hazırlanmış nanoemülsiyon) grubudur. Histidin dekarboksilaz sıvısında gelişen her bir bakteriyel kültürden 0.1 ml alınarak uygun seyreltikler hazırlanmış, (10<sup>-10</sup>'a kadar), sonrasında Plate Count Agar üzerine aşılama yapılmıştır. Petri kutuları 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir.

### Biyojenik Amin Analizleri

Biberiye esansiyel yağı ve bu yağ kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonların bozucu ve patojen bakterilerin amino asit dekarboksilasyon aktivitesi üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla biyojen amin analizi (Özoğul, 2004) gerçekleştirilmiştir. Biyojen aminlerin türevlendirilme işlemi için Redmond & Tseng (1979) metodu kullanılmıştır. Biyojen amin üreten bakterilerin gelişimi Niven besiyeri (Niven ve ark., 1981) kullanılarak belirlenmiştir.

### Kültür Ortamının Hazırlanması ve Bakteriyel Ekstraksiyon

Çalışmada kullanılan tüm gıda kaynaklı patojenler tarafından üretilen amonyak (AMN), trimetil amin (TMA) ve biyojen aminler Kuley & Özogul (2011) tarafından kullanılan metoda göre HDB'de incelenmiştir. Bakterilerin üremesi için besi ortamı olarak nutrient broth kullanılmıştır ve üreme sıcaklığı 37°C olarak belirlenmiştir. 2-3 gün süre bu sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra her bir bakteriyel suş kültüründen 0.5 ml alınarak HDB'ye eklenmiştir ve 24 saat dekarboksilasyon reaksiyonuna bırakılmıştır. Ardından %1 (1ml/100ml) konsantrasyonlarda Tween 80, biberiye esansiyel yağı

ve biberiye esansiyel yağı kullanılarak oluşturulan nanoemülsiyonu HDB içerisine eklenmiştir. Gıda kaynaklı patojenlerin ekstraksiyonu için patojen içeren 5 ml HDB ayrı bir tüpe alınarak üzerine 2 ml % 6'lık triklorasetik asit (TCA) eklenmiştir. Ardından 3000xg'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve filtre kâğıtlarından (Milipore) süzme işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra her bir patojen suşlarından alınan 4 ml bakteriyel süpernatant HPLC'de biyojen analizi yapmak için türevlendirme işlemine tabi tutulmuştur.

### Biyojenik amin Analizi için Kullanılan Kimyasallar

Tüm biyojen amin standartları Sigma-Aldrich (Munich, Germany) firmasından temin edilmiştir. Amin analiz için kullanılan mobil faz asetonitril ve HPLC saflıkta su kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### Standart Amin Solüsyonlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bütün biyojenik amin standartları Sigma-Aldrich'den (Munich, Germany) sağlanmıştır. Triptamin hidroklorid (122.8 mg), putresin dihidroklorid (182.9 mg), 2-feniletilamin hidroklorid (130.1 mg), kadaverin dihidroklorid (171.4 mg), spermidin trihidroklorid (175.3 mg), spermin tetrahidroklorid (172.0 mg), histamin dihidroklorid (165.7 mg), tiramin hidroklorid (126.7 mg), 5-hidroksitriptamin (serotonin) (133.9 mg), 3-hidroksitiramin hidroklorid (dopamin) (123.8 mg), agmatin sülfat (175.4 mg), ammonia chloride (296.9 mg) ve trimetilamin hidroklorid (161.7 mg) 10 mL ultra saf suda çözdürülmüştür. Her bir amin için serbest bazın son konsantrasyonu 10 mg/mL<sup>-1</sup> olmuştur.

### AMN, TMA ve Biyojenik Amin Analizi için Türevlendirme İşlemi

Bakterilerin türevlendirilme prosedürü Özoğul ve ark. (2002) yöntemine göre yapılmıştır. Ekstrakte edilen bakteri solüsyonunda 4 ml alınarak üzerine 1 mL 2 M sodyum hidroksit ve 40 µl benzoil chloride eklendikten sonra 30 saniye vortekste karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı 20 dk, oda sıcaklığında (24°C) bırakılmıştır. Benzolasyon işlemi 2 mL doymuş sodyum hidroksit eki ile durdurularak, solüsyon iki kez 2mL dietil eter ile ekstrakte edilmiştir. Karıştırma işleminden sonra üst organik faz temiz tüp içerisine alınarak azotta uçurulmuştur. Tüp içerisinde bulunan kalıntılar 1 mL asetonitrilde çözdürülerek, HPLC tüplerine aktarılmıştır ve 10 µL örnek HPLC cihazına enjekte edilmiştir.

### Kromatografik Koşullar

Biyojen amin analizleri Özoğul (2004) metodu kullanılarak her bir litre sıvı besi ortamında mg amin cinsinden (mg/L) ölçülmüştür. Biyojen amin analizinde

gradient elüsyon programı ve ters faz kolunu ile birlikte hızlı bir HPLC metodu kullanılmıştır. Aynı analitik koşullar AMN ve TMA analizlerinde de kullanılmıştır.

### Ekipman ve Kolon

Biyojenik amin analizi için bir SPD-M20A diode array dedektör, iki kanallı gradient pompa (Shimadzu LC-10AT), autosampler (SIL 20AC), kolon fırını (CTO-20AC), FCV-11AL dalga birimli communication bus module (CBM-20A) sahip Shimadzu Prominence HPLC cihazı (Shimadzu, Kyoto, Japan) kullanılmıştır (Şekil 3). Biyojen amin analizi için ters-fazlı ODS Hypersil, 5µl, 250X4.6 mm kolon (Phenomenex, Macclesfield, Cheshire, UK) kullanılmıştır.



Şekil 3. Biyojen amin analizi için kullanılan HPLC cihazı

Figure 3. HPLC device used for biogenic amine analysis

### İstatistik Analizler

İstatistik analizler SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak yapılmıştır.  $p < 0.05$  olarak tanımlanan önemli farklılıkları belirlemek için ANOVA kullanılmıştır. Her muamele grupları için üç tekrarlı olarak istatistik karşılaştırma yapılmıştır.

### BULGULAR ve TARTIŞMA

#### Biberiye Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi

Biberiye esansiyel yağı uçucu bileşenlerinin GC-MS analizi, 11 bileşik olarak tanımlamıştır (Çizelge 1). 1.8-Cineole, diğer yazarlar tarafından bildirilene benzer bir düzey olan toplam tanımlanmış bileşiklerin % 53.08'ini oluşturan mevcut ana bileşiktir (Özogul ve ark., 2017). Biberiye esansiyel yağında 1, 8-cineole (% 27.6) önemli oranda içerdiği bildirilmiştir (Nowak ve ark., 2012). 1.8-cineole (okaliptol), doğada bol miktarda bulunan bir monoterpen siklik eterdir. *Okaliptüs globulus* yapraklarından (%80'e kadar) izole edilen bir uçucu yağın ana bileşenidir, ancak biberiye (*Rosmarinus officinalis*), adaçayı (*Salvia officinalis*) ve nane (*Mentha spp.*) gibi diğer türlerde de bulunabilir. 1.8-cineole (okaliptol)'ün farmakolojik etkileri iyi belgelenmiştir; güçlü antimikrobiyal, mukolitik, bronkolitik ve antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı

solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılır (Aprotosoae ve ark., 2019). 1.8-cineole'nin antijenotoksik potansiyeli de birkaç ajan tarafından indüklenen DNA hasarına karşı çoğunlukla hücre bazlı deneylerde araştırılmıştır. Örneğin, Mitić-Culafić ve ark., (2009) hepatoma HepG2 ve lenfoma NC-NC hücre hatları ön işleme tabi tutulduğunda ve tert-bütildihidroperoksit ile birlikte muamele edildiğinde 1.8-Cineole'nin DNA hasarı yüzdesini azaltabildiğini bildirmişlerdir. % 1'den daha yüksek miktarlarda bulunan diğer bileşikler arasında  $\alpha$ -pinene (% 11.57), camphor (% 8.96), caryophyllene (% 4.54), b-myrcene (% 3.96), borneol (% 3.46) ve camphene (% 3.01) bulunmaktadır. Bu maddelerin de oldukça güçlü antimikrobiyal, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bununla beraber literatürde farklı biberiye esansiyel yağı içeriklerinin olduğu da belirtilmektedir. Bitkilerin uçucu yağ bileşiminin genetik, çevresel faktörler, gelişim aşaması ve ekstraksiyon yöntemlerine bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Özogul ve ark., 2017).

Çizelge 1. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) uçucu yağının kimyasal bileşimi

Table 1. Chemical composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil

Bileşik adı Compound name	(%)
$\alpha$ -Pinene	11.57
1.8-Cineole	53.08
Camphor	8.96
$\beta$ -Pinene	1.25
b-Myrcene	3.96
Caryophyllene	4.54
Camphene	3.01
$\alpha$ -Terpineol	1.96
Borneol	3.46
Terpinene-4-Ol	1.05
Bornyl Acetate	1.78

#### Biberiye Uçucu Yağı Nanoemülsiyonunun Fiziksel Özellikleri

Biberiye esansiyel yağı bazlı nanoemülsiyonun fiziksel özellikleri Çizelge 2'de verilmiştir. Tween 80 (%1 w/w) ile hazırlanan nanoemülsiyonların damlacık boyutu (Z-ortalamarı) ortalama 447.6 nm bulunmuştur. Bununla birlikte, önceki araştırma çalışması (Özogul ve ark., 2017), biberiye esansiyel yağı bazlı nanoemülsiyon için 63.02 nm aralığında bir damlacık boyutu bildirmiştir. Genel olarak, nanoemülsiyon damlacık boyutunun dış maruziyeti ile dolaylı olarak ilişkili olan yüzey aktif madde konsantrasyonuna bağlı olabilmekte ve ayrıca yağ/su ara yüzey gerilimine de bağlı değişebilmektedir (Sundararajan ve ark., 2018). Aynı zamanda ultrasonik homojenizatör tarafından üretilen kesme kuvvetlerine ve türbülansa da bağlı



olabileceği bildirilmiştir (Mehmood ve ark., 2017). Bulguların diğer araştırma çalışmalarıyla karşılaştırılmasıyla, bu çalışmada test edilen biberiye esansiyel yağı bazlı nanoemülsiyonun damlacık boyutunda (447.6 nm) Özogul ve ark., (2017) tarafından yapılan çalışmada bildirilen sonuçlara göre (63.02 nm) bir artış olduğu gözlenmekte ve bunun nedeninin ise emülsifiye edici madde olarak kullanılan Tween 80'nin konsantrasyonlarının %3'ten %1'e (w/w) düşürülmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, su içinde yağ emülsiyonlarının hazırlanmasında iyonik olmayan yüzey aktif maddeler olarak kullanılan Tween 80 uygulaması, emülsiyonun hidrofilitik-lipofilitik dengesi açısından dengede olmuştur (Chu ve ark., 2020). Ayrıca, polimer bazlı yüzey aktif maddelerle karşılaştırıldığında, küçük molekülü bir yüzey aktif madde olarak Tween 80, damlacık yüzeyinde adsorbe etmede daha etkili olmuştur (Chu ve ark., 2020).

Öte yandan viskozite, nanoemülsiyonun fizikokimyasal karakterizasyonunda kullanılan çok önemli bir parametredir. Bu parametre, emülsiyonun partikül stabilitesini ve uzun vadeli stabilitesini etkileyebilmektedir (Richa & Choudhury, 2020). Ayrıca viskozite, yüzey aktif maddelerin, yağ bileşenlerinin ve emülsiyonun suyunun bileşimlerine ve bunların konsantrasyonlarına aşırı derecede bağlıdır (Che Marzuki ve ark., 2019). Viskozitenin belirlenmesi, sistemin O/W (oil-in-water; yağ içinde su) veya W/O (water-in-oil; su içinde yağ) emülsiyonu olup olmadığını doğrular. Sistemlerin düşük viskozitesi, O/W tipi olduğunu ortaya koymaktadır. Aksine yüksek viskozite, yağ tipi sistemde su olduğunu gösterir (Yazgan ve ark., 2019). Araştırmada viskozite 0.88 N s/m<sup>2</sup> olarak bulunmuştur. Nanoemülsiyonların fiziksel stabilitesi üzerinde viskozitenin büyük bir etkisi vardır. Bu nedenle, bu çalışmada incelenen biberiye esansiyel yağı nanoemülsiyonunun viskozitesi, emülsiyon stabilitesini arttırmaktadır. Biberiye esansiyel yağı bazlı nanoemülsiyonun yüzey gerilimi ise 33.93 N/m olarak bulunmuştur. Önceki araştırmalar, biberiye esansiyel yağ bazlı nanoemülsiyonunun yüzey gerilimi (32.55 N/m) hakkında benzer bir veriye sahip olduğunu bildirmiştir (Özogul ve ark., 2017). Ayrıca, biberiye esansiyel yağı nanoemülsiyonu, oda sıcaklığında 15 günlük depolama sırasında iyi termodinamik stabilite sergilemiştir.

Biberiye esansiyel yağı nanoemülsiyonunun PDI'si Şekil 4'te verilmiştir. PDI değeri, damlacıkların partikül boyutu dağılımı olarak tanımlanabilir. Sıklıkla, PDI değerleri 0.0'dan (tek tip damlacık) 1.0'a (çeşitli damlacık boyutu popülasyonlarına sahip numune) uzanır. Küçük bir PDI değeri, dar bir parçacık boyutu dağılımını temsil eder. Bu çalışmada biberiye uçucu yağı için PDI değeri 0.164 olarak bulunmuştur. Ayrıca sonuçlar göstermiştir ki, elde edilen PDI değeri, yüzey

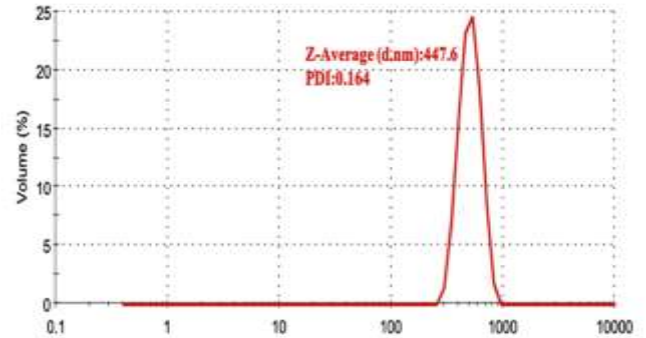
aktif madde konsantrasyonlarına ve nanoemülsiyonun geliştirilmesi için kullanılan sulu faz miktarına ve ayrıca ultrasonik emülsifikasyonun etkisine bağlı olmuştur (Chu ve ark., 2020).

Çizelge 2. Biberiye esansiyel yağı kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonunun fizikokimyasal özellikleri

Table 2. Physico-chemical properties of rosemary based nanoemulsion

Sıcaklık (°C)	25
Temperature (°C)	25
Viskozite (N s/m <sup>2</sup> )	0.88
Viscosity (N s/m <sup>2</sup> )	0.88
Yüzey gerilimi	33.93
Surface tension	33.93
Termodinamik stabilite	++
Thermodynamic stability	++
Damlacık boyutu (nm)	447.6
Droplet size (nm)	447.6

++ 2 haftaya kadar olan süre içerisinde faz ayrımı açısından emülsiyonun iyi bir termodinamik kararlılığı olduğunu gösterir.



Şekil 4. Biberiye esansiyel yağı nanoemülsiyonun parçacık boyutu dağılımı ve PDI değeri

Figure 4. The particle size distribution and PDI value of the rosemary essential oil nanoemulsion

### Histidin Dekarboksilaz Sıvısında Bakteriyel Gelişim

Çizelge 3, histidin dekarboksilaz sıvısında bakteriyel gelişimi göstermektedir. Çalışmada kontrol grubu genellikle muamele gruplarından daha yüksek düzeyde bakteri yükü içermiştir. Test edilen gruplar arasında genellikle en düşük bakteriyel yük, BEO grubunda gözlenmiştir.

Muamele grupları arasında Tween 80, bakteriyel gelişimi engellemede genellikle en düşük aktiviteye sahip grup olmuştur. Kontrol gruplarında en yüksek bakteriyel gelişim *K. pneumoniae* ve *S. liquefaciens* (8.87 log kob/ml) suşlarında ve en düşük gelişim ise balık bozucu *E. faecalis*'te (7.41 log kob/g) gözlenmiştir.

Çizelge 3. Histidin dekarboksilaz sıvısında (HDB) bakteriyel gelişim (log kob/ml)  
Table 3. Bacterial growth in histidine decarboxylase broth (HDB) (log cfu/ml)

	Bakteri Bacteria	Gruplar Groups			
		Kontrol Control	Tween 80	BEO	BNE
Gıda kaynaklı patojenler Food source pathogens	<i>S. aureus</i>	8.53±0.1 <sup>xc</sup>	8.26±0.1 <sup>b</sup>	7.09±0.4 <sup>a</sup>	8.57±0.1 <sup>c</sup>
	<i>K. pneumoniae</i>	8.87±0.2 <sup>c</sup>	8.70±0.1 <sup>b</sup>	8.13±0.1 <sup>a</sup>	8.78±0.2 <sup>bc</sup>
	<i>S. Paratyphi A</i>	8.52±0.2 <sup>c</sup>	8.56±0.0 <sup>c</sup>	6.97±0.2 <sup>a</sup>	7.25±0.2 <sup>b</sup>
	<i>E. faecalis</i>	8.53±0.1 <sup>c</sup>	8.49±0.2 <sup>bc</sup>	8.43±0.1 <sup>a</sup>	8.47±0.2 <sup>b</sup>
Balık bozucu bakteriler Fish spoilage bacteria	<i>P. damsela</i>	8.56±0.3 <sup>c</sup>	8.73±0.3 <sup>d</sup>	7.69±0.0 <sup>a</sup>	8.39±0.4 <sup>b</sup>
	<i>E. faecalis</i>	7.41±0.3 <sup>a</sup>	7.43±0.5 <sup>a</sup>	8.16±0.3 <sup>b</sup>	8.44±0.1 <sup>c</sup>
	<i>V. vulnificus</i>	8.51±0.0 <sup>b</sup>	8.51±0.2 <sup>b</sup>	7.97±0.2 <sup>a</sup>	8.73±0.4 <sup>c</sup>
	<i>P. mirabilis</i>	8.42±0.4 <sup>c</sup>	8.81±0.0 <sup>d</sup>	8.04±0.2 <sup>a</sup>	8.33±0.3 <sup>b</sup>
	<i>S. liquefaciens</i>	8.87±0.1 <sup>d</sup>	7.83±0.1 <sup>a</sup>	8.13±0.1 <sup>b</sup>	8.22±0.2 <sup>c</sup>
	<i>P. luteola</i>	8.07±0.3 <sup>b</sup>	8.37±0.2 <sup>c</sup>	7.13±0.2 <sup>a</sup>	8.30±0.1 <sup>c</sup>

BEO: Biberiye esansiyel yağı, BNE: Biberiye esansiyel yağı bazlı nanoemülsiyon

\*Ortalama değer, ± standart sapma, n=3. Aynı satır üzerindeki farklı harfler (a-d) istatistiki farkı göstermektedir.

HDB'de *S. aureus* gelişimi 7.09 log kob/ml (BEO) ile 8.57 (BNE) log kob/ml arasında değişkenlik göstermiştir. *S. aureus* için bakteriyel gelişimde en fazla azalış gösteren grup BEO olmuştur. Gruplar arasında en yüksek inhibisyon etki 1.55 log kob/ml azalış ile BEO grubunda *S. Paratyphi A* bakterisine karşı gözlenmiştir. Tween 80 grubunda bakteriyel gelişimi artan suşlar arasında *E. faecalis*'in hem bozucu hem de patojen suşu ile *S. Paratyphi A*, *P. damsela*, *P. mirabilis* ve *P. luteola* bulunurken BEO grubunda sadece *E. faecalis* bozucu suşu (0.75 log kob/ml artış) bulunmuştur. BNE grubunda ise bakteriyel gelişimi artış gösteren suşlar olarak *S. aureus*, *E. faecalis* bozucu suşu, *V. vulnificus* ve *P. luteola* gözlenmiştir. Tüm bu artış gösteren suşlar arasında en yüksek ve en düşük bakteriyel gelişim, bozucu *E. faecalis*'te sırasıyla BNE (1.03 log kob/ml artış) ve tween 80 (0.02 log kob/ml artış) gruplarında gözlenmiştir. Bakteriyel gelişimi azalış gösteren suşlar arasında ise en fazla azalış *S. Paratyphi A*'da BNE grubunda (1.27) ve gelişimi en az olan suş ise 0.06 log kob/ml azalış ile patojen suş olan *E. faecalis*'te gözlenmiştir.

Literatüre bakıldığında biberiye esansiyel yağı ve nanoemülsiyon formlarının gıdalara uygulanması ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır. Fakat benzer çalışmalara rastlamak mümkündür. Bunlarda daha çok antimikrobiyal analiz çalışmaları olup biyojen amin üretimi üzerine odaklanılmamıştır. Abdollahzadeh ve ark., (2014) kekik, biberiye ve tarçından elde ettikleri esansiyel yağların *L. monocytogenes* PTCC 1163 suşuna karşı antibakteriyel aktivitelerini ölçmüşler ve oldukça etkili olduklarını bildirmişlerdir. Yine Özogul ve ark., (2020) kekik esansiyel yağı temelli nanoemülsiyonların ve saf yağın balıklarda bozucu bakteriler (*P. luteola*, *P. damsela*, *V. vulnificus*, *E. faecalis*, *S. liquefaciens*, ve *P. mirabilis*) ve gıda

kaynaklı patojenler (*S. Paratyphi A*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, ve *E. faecalis*) üzerindeki antibakteriyel aktivitelerini disk difüzyon, minimum inhibisyon (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBC) kullanılarak değerlendirmişler ve kekik yağının nanoemülsiyona dönüştürülmesinin antibakteriyel aktiviteyi arttırdığını rapor etmişlerdir. Özogul ve ark., (2022), defne (*Laurus nobilis*) uçucu yağının ultrasonik emülsifikasyon yöntemiyle nanoformülasyonu ve esansiyel yağının antimikrobiyal aktivitesini gıda kaynaklı patojenler ve balık bozulma bakterisinden oluşan bir gruba karşı da araştırmışlardır. Çalışma sonucunda defne esansiyel yağı nanoemülsiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin sürfaktanda, esansiyel yağ konsantrasyonundan ve bileşiminden ve nanoemülsiyon hazırlama için ultrasonik emülsifikasyondan etkilendiğini ve bunun daha sonra antimikrobiyal etki üzerinde önemli sonuçları olduğunu göstermiştir. Yazgan ve ark., (2019), limon esansiyel yağı ve bu esansiyel yağ bazlı nanoemülsiyonun gıda patojenleri (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* ve *S. Paratyphi A*) ve balık bozucu bakteriler (*P. damsela*, *E. faecalis*, *V. vulnificus*, *P. mirabilis*, *S. liquefaciens* ve *P. luteola*) üzerindeki antimikrobiyal etkilerini disk difüzyonu, MIC ve MBC açısından karşılaştırdıkları çalışmada uçucu yağın nanoemülsiyona dönüştürülmesinin antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığını göstermişlerdir. Yazgan (2020), adaçayı esansiyel yağı ve nanoemülsiyonunun patojen ve bozucu organizmalar üzerindeki antimikrobiyal özelliklerinin ve antimikrobiyal ajan olarak kullanımlarını araştırdığı çalışmada disk difüzyon yönteminde adaçayı esansiyel yağının test edilen mikroorganizmalar üzerinde nanoemülsiyon formundan biraz daha etkili olduğunu bildirmiştir. Özogul ve ark., (2021) nanoemülsifikasyon işlemi sonrasında greylift kabuğu uçucu yağının antibakteriyel özelliklerindeki



artışı araştırdıkları çalışmalarında ana bileşik olarak tanımladıkları D-Limonene (% 82.86) ihtiva eden esansiyel yağın test edilen bakteri suşlarının çoğuna karşı bakteriyostatik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Uçucu yağın nanoemülsiyon sistemine dahil edilmesinin nanoemülsiyondaki yağ konsantrasyonu dikkate alındığında artan bakteriyostatik etki ile sonuçlanmıştır, ancak muhtemelen nanoemülsiyon sistemindeki çok düşük uçucu yağ konsantrasyonundan dolayı bakterisidal etki gözlemlenmemiştir.

Yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere aromatik bitki yağları ve ekstraktlarının içeriği ve kalitesi ekolojik koşullar, yağın ekstrakte edilmiş şekli ve diğer faktörlerine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Bu bileşiklerin herbiri organik maddelerin kompleks heterojen gruplarıdır. Ayrıca esansiyel yağ ve türevlerinin antimikrobiyal etkisi bakteri türlerine bağlıdır. Bununla birlikte, mikro seyreltme yönteminde hem nanoemülsiyon formu hem de uçucu yağ, test edilen patojen ve bozulma bakterilerinin bakteri üremesi üzerinde benzer bir etkiye sahip olmuştur. Bu fark, kültür ortamında daha az bulunan polar bileşiklerin daha yavaş yayılmasından kaynaklanıyor olabilir. Mevcut çalışma, biberiye esansiyel yağının ve nanoemülsiyonunun gıda endüstrisinde doğal bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

### Histidin Dekarboksilaz Sıvısında AMN, TMA ve Biyojen Amin Üretimi

Biberiye esansiyel yağı kullanılarak oluşturulan su içerisinde yağ nanoemülsiyonu ile biberiye esansiyel yağının HDB'de gıda kaynaklı patojen ve balık bozucu bakterilerin ürettiği AMN, TMA ve biyojen aminler üzerindeki etkisi Çizelge 4'te verilmiştir. Esansiyel yağların bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisi esansiyel yağın içerdiği kimyasal bileşiklere göre farklılıklar gösterebilmektedir. *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus spp.*, *K. pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* ve *E. faecalis* gibi gıda kaynaklı patojenlerin amonyak ve biyojen amin üretme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Ordóñez ve ark., 1999; Özogul, 2011; Kuley ve ark., 2011; 2012, Gokdogan ve ark., 2012). Çalışmada HDB içerisinde patojen ve bozucu bakteriyel üyeler arasında AMN, TMA ve diğer biyojenik aminler üretimi bakımından farklılıklar bulunmuştur.

HDB içerisinde kullanılan tüm muamele grupları genel olarak test edilen tüm bozucu ve gıda kaynaklı patojenik organizmaların biyojen amin üretimlerini inhibe etmiştir. AMN üretimine bakıldığında kullanılan tüm gıda kaynaklı patojenik organizmaların arasında en yüksek üretim kontrol grubu *P. luteola* (1866.96 mg/L) suşunda gözlenmiş olup kullanılan muamele grubuna bağlı olarak AMN

üretimi önemli oranda düşmüştür. Bozucu bakteriler arasında muamele gruplarının da AMN üretimini en çok inhibe ettiği suş yine *P. luteola* olmuştur. Gıda kaynaklı patojen bakteriler arasında Tween 80 dahil olmak üzere biberiye esansiyel yağı ve nanoemülsiyonu muamele gruplarının tamamında AMN üretimi inhibe edilirken muamele grupları arasında bu durum farklılıklar göstermiştir. Özogul (2011) HDB içerisinde gıda kaynaklı patojenlerin 1130 ve 3089.6 mg/L arasında amonyak ürettiğini rapor etmiştir. Gokdogan ve ark. (2012) HDB'de AMN üretiminin en düşük *L. monocytogenes* (68 mg/L) ve en yüksek *E. coli* (210 mg/L) tarafından gerçekleştiğini bulmuşlardır. Lizin dekarboksilaz sıvısında gıda kaynaklı patojenler 965 mg/L'den daha düşük amonyak üretmiştir.

Genel olarak BEO ve BNE grupları, kontrol ve Tween 80'den daha fazla AMN üretimini inhibe ederken *K. pneumoniae* ve *E. faecalis*'te Tween 80 daha suprese etki göstererek AMN üretimini baskılamıştır. Polioksietilen Sorbitan Monooleat 80 veya Polisorbitat 80 olarak bilinen Tween 80, genellikle gıdalarda ve kozmetik ürünlerinde kullanılan noniyonik bir yüzey aktif maddedir ve emülgatördür. Bu sentetik bileşik, viskoz, suda çözünür sarı bir sıvıdır. Tween 80 bir yüzey aktif madde olduğundan, hidrofobik maddeleri içine alan miseller ve emülsiyonlar oluşturabilir. Bu nedenle Tween 80'in hidrofobik antimikrobiallerin antibakteriyel etkilerini etkileyebilmektedir. Nielsen ve ark. (2016) bozulma ve gıda kaynaklı hastalıkların yaygın nedenleri olan *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Pseudomonas fluorescens*'in büyümesini ve antimikrobiyal duyarlılığını Tween 80'in nasıl etkilediğini araştırdıkları çalışmalarında bu emülgatörün *S. aureus*'un hem bireysel hem de biyofilm büyümesini desteklediğini, *L. monocytogenes* ve *P. fluorescens*'i inhibe ettiğini ve bu durumda kullanılan suşa bağlı olduğunu göstermiştir. Mevcut çalışmada da olduğu gibi Tween 80' nin bazı suşların AMN üretimini artırdığı, bazılarını ise inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu değişimin suşa bağlı olmasının yanı sıra besi ortamı içerisine eklenen aktif maddelerin antagonistik veya sinerjik etki yaratmasından da kaynaklı olabileceği ihtimaller arasındadır. Bulgular, emülsiyonlaştırma yoluyla çözelti içinde dağılan hidrofobik antimikrobiallerin etkinliğini incelerken veya emülgatörleri içeren gıda matrislerine antimikrobialler uygulandığında emülgatörlerin dolaylı etkilerinin belgelenmesinin önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, mikrobiyal büyüme üzerindeki türe özgü etkiler, kozmetik ve gıda ürünlerindeki Tween 80'in cilt ve bağırsak mikrobiyotasının bileşimini etkileyebileceğini ve bu nedenle potansiyel sağlık etkilerini ortaya çıkarmak için emülgatörlerin insan mikrobiyomu üzerindeki etkisinin araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.



Bozucu bakteri suşları arasında AMN üretimi muamele gruplarının tamamında inhibe edilirken bu durum sadece BEO ve BNE arasında farklılıklar ve dalgalanmalar göstermiştir. Patojen suşların aksine bozucuların tamamında BEO ve BNE grupları, kontrol ve Tween 80'den daha fazla AMN üretimini inhibe etmişlerdir. Sadece *S. liquefaciens* suşunda BEO, BNE'ye göre daha fazla AMN üretimini baskımlarken bu durum istatistiksel açıdan önemli olarak gözlenmiştir ( $p<0.05$ ).

Gıda kaynaklı patojenler ile balıkta bozulma etmeni bakteriler başta TMA, putresin (PUT), kadaverin (CAD), spermidin (SPD), triptamin (TRPT), tiramin (TYR) ve agmatin (AGM) olmak üzere spermin (SPN) dışında test edilen bütün biyojen aminleri üretmişlerdir. Biberiyenin genel olarak biyojen amin üretimini azaltmasına karşın, biberiye esansiyel yağ veya nanoemülsiyon formunun biyojen amin üretimindeki etkisi muamele tipine, bakteri türüne ve spesifik biyojen amine göre değişkenlik göstermiştir.

Putresin (PUT) üretimine bakıldığında gıda kaynaklı patojenik bakterilerden *S. Paratyphi A* ve *E. faecalis* dışındaki suşlarda önemli miktarda üretim gözlenirken özellikle *S. aureus*'ta muamele gruplarının baskılayıcı etkisinin daha fazla olduğu gözlenmektedir (yaklaşık 6-22 kat). Bozucu bakteriler arasında en yüksek üretim *E. faecalis* suşunda (201.66 mg/L) gözlenmesine karşın muamele grupları arasında bu üretim düşüş göstermiştir (45.95-61.18 mg/L). Tween 80 muamele grubu bu suşta BEO'dan daha fazla ancak BNE'den daha az olmak üzere PUT üretimini inhibe etmiştir. Ancak bu farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz olarak tespit edilmiştir. Durlu-Ozkaya ve ark. (2001) Enterobacteriaceae üyelerinin %1 aminoasit içeren beyin kalp infüzyon sıvısında başlıca putresin, kadaverin, tiramin ve histamin üretimini belirtmişlerdir. Gıda kaynaklı patojen bakteriler histidin dekarboksilaz sıvısında 9.8 ve 19.2 mg/L arasında putresin üretmiştir (Özogul, 2011). Tavuk derisinden izole edilen 7 farklı *Aeromonas* üyesinin putresin (<3.7 mg/L) ve 5 üyesinin kadaverin ürettiği (73.8 mg/L) gözlenmiştir (Bunkova ve ark. 2010). *Staphylococcus* üyelerinin yüksek miktarda putresin ve feniletilamin (>100 mg/L) oluşturduğu gözlenmiştir (Seitter ve ark., 2011). Mevcut çalışmada, bakteriler tarafından PUT üretimi 0.00 mg/L (*S. Paratyphi A*) ve 293.19 mg/L (*S. aureus*) aralığında ve CAD üretimi ise 10.00 mg/L (*S. aureus*) ve 327.61 mg/L (*S. aureus*) aralığında olmuştur.

Kadaverin (CAD) üretimine bakıldığında kullanılan tüm muamele grupları gıda kaynaklı patojen bakterilerin üretimini genellikle inhibe ederken *S. aureus*'un kontrol grubuna göre CAD üretimini (327.61 mg/L) önemli ölçüde inhibe etmişlerdir (12-33 kat). *Enterococcus faecalis* ise Tween 80 ve BNE gruplarının CAD üretimi kontrol grubundan daha fazla olmuş, bu gruplar istatistiksel açıdan her ne

kadar önemsiz olsa da CAD üretimini stimüle etmişlerdir. Balık bozucu bakteriler arasında CAD üretimi en yüksek 38.24 mg/L ile *P. mirabilis* kontrol grubunda, en düşük ise 11.53 mg/L ile *P. damsela* BNE grubunda gözlenmiştir. De las Rivas ve ark. (2006) *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *L. monocytogenes*'in CAD üretiminden sorumlu lizin dekarboksilaz aktiviteye sahip olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada da CAD en yüksek *S. aureus* tarafından üretilmiştir (327.61 mg/L). Histidin dekarboksilaz sıvısında *Klebsiella* üyelerinin 16 ve 32 mg/L düzeyinde kadaverin ürettiği bulunmuştur (Özogul & Özogul, 2007; Özogul, 2011). Bu çalışmada *K. pneumoniae* 18.86-68.16 mg/L kadaverin üretmiştir.

Spermidin ve spermin bütün organizmalarda dekarboksile S-adenosilmetiyoninden 1 veya 2 amino grubun ayrılması ile putresinden oluşur (Smith, 1981). Spermidin (SPD) üretiminde de benzer şekilde patojen bakterilerin besi ortamında kullanılan tüm grupların amin üretimini inhibe ettiği gözlenmiştir. Sadece *E. faecalis*'te Tween 80 grubu istatistiksel fark gözetilmeksizin SPD üretimini artırmıştır. Kontrol grupları arasında en yüksek SPD üretimi *K. pneumoniae* suşunda (68.16 mg/L) gözlenirken en düşük üretim *E. faecalis* suşunda (2.65 mg/L) gözlenmiştir. Muamele grupları arasında ise en yüksek SPD üretimi yine *K. pneumoniae* suşunda (42.38 mg/L) Tween 80 grubunda gözlenirken en düşük üretim ise yine *E. faecalis* suşunda (1.02 mg/L) BNE grubunda gözlenmiştir. Gıda kaynaklı patojen suşlar arasında SPD üretimi bozucu gruptan daha az olmakla birlikte genel olarak muamele gruplarının inhibe edici etkisi söz konusu olmuştur. En düşük SPD üretimi gözlenen grup *V. vulnificus* olmuştur. Balık bozucu grupta da muamele grupları arasında SPD üretimi açısından farklılıklar gözlenmiştir. Spermin (SPN) üretiminde patojen *E. faecalis* suşunda hiçbir grupta üretim gözlenmezken diğer suşlarda oldukça az miktarda üretim gözlenmiştir. En yüksek üretimler kontrol gruplarında gözlenirken BEO gruplarında hiçbir suşta üretim gözlenmemiştir. Bozucu bakteri gruplarında ise patojen suşlara nispeten daha fazla SPN üretimi söz konusu olmuştur. Genel olarak BNE, patojen suşlarda en düşük SPN üretimlerine neden olmuştur.

Triptamin (TRPT) üretiminde biberiyenin nanoemülsiyon formu (BNE) *S. Paratyphi A* suşunda kontrol grubundan sonra en yüksek TRPT üretimi (9.67 mg/L) ile sonuçlanması haricinde genel olarak tüm muamele grupları patojen suşların TRPT üretimi üzerinde inhibe edici etkide olmuşlardır. En yüksek inhibisyon oranı yaklaşık 1/4 oranı ile *S. aureus* suşunda BNE grubunda gözlenmiştir. *K. pneumoniae* ve *E. faecalis* suşunda ise BEO grubu BNE'ye göre daha inhibe edici etkili olmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak önemli olmuştur ( $p<0.05$ ). Patojen bakteriler arasında *P. damsela* suşunun TRPT



üretimi alışılmışın dışında farklılıklar göstermiştir. Bu suşta Tween 80 grubu en yüksek üretime neden olurken bu farklılık istatistiksel açıdan önemsiz olmuştur. BNE grubunun TRP üretimi (10.02 mg/L) ise BEO'dan daha fazla (8.86 mg/L) olmuştur. Grubun en yüksek TRPT üretimi bozucu suş olan *E. faecalis*'te (32.91 mg/L) gözlenmesine karşın en düşük üretim *P. luteola*'da (1.04 mg/L) gözlenmiştir. *S. aureus* ve *E. faecalis* patojen suşlarında 2-feniletilamin (PHEN) üretimi gözlenmemiştir. *S. Paratyphi A*'da ise dengesiz bir üretim söz konusu olmuştur ve en yüksek PHEN üretimleri sırasıyla BEO, kontrol ve BNE gruplarında gözlenirken Tween 80 grubunda üretim gözlenmemiştir (0 mg/L). *K. pneumoniae*'de ise muamele grupları PHEN üretimini baskılamış ve en düşük üretim BEO grubunda (14.71 mg/L) gözlenmiştir. Bozucu bakteriler grubunda ise biberiye esansiyel yağı ve bunun nanoemülsifiye formu *E. faecalis* ve *S. liquefaciens* suşlarının PHEN üretimlerini yaklaşık 13 kat inhibe edebilmişlerdir. Oransal olarak daha sonraları gelen en fazla inhibisyonlar sırasıyla *P. luteola*, *V. vulnificus*, *P. damsela* ve *P. mirabilis* suşlarında gözlenmiştir.

Gıdalarda oldukça önemli olan biyojen aminlerden biri histamindir (HIS). Özellikle yağlı balıklarda depolama ile birlikte yüksek konsantrasyonu toksik etki yaratmaktadır. Kontrol gruplarında histamin üretimi 0.97 mg/L (*S. Paratyphi A*) ve 106.89 mg/L (*K. pneumoniae*) arasında değişkenlik göstermiştir. Biberiye'nin tüm formları ve Tween 80, tüm kullanılan gıda kaynaklı patojenlerin ve bozucu bakterilerin HIS üretimini baskılamıştır. Bu da biberiye'nin özellikle kolay bozulabilen balık gibi et ürünlerinde enfeksiyona yol açabilecek potansiyeli olan patojenlerin metabolit üretimini baskıladığı görülmektedir. Patojen grup arasında HDB içerisinde en yüksek HIS üretimi *K. pneumoniae*'de (106.89 mg/L) gözlenmiştir. Bozucu bakteriler arasında ise genel olarak yüksek üretim gözlenmesine karşın HIS üretimi 2.22 mg/L (*P. luteola*) ile 188.55 mg/L (bozucu *E. faecalis*) arasında değişmektedir. Lopez-Sabater ve ark. (1996) kültür ortamında *K. pneumoniae*'nin 216 ppm histamin ürettiğini belirtmiştir. Chang ve ark. (2008) *S. aureus* izolatlarının kültür ortamında 12.7 ve 33.0 mg/kg arasında HIS ürettiğini rapor etmiştir. Özogul (2011) HDB'de histaminin gıda kaynaklı patojenler arasında sadece *E. faecalis*, *K. pneumoniae* ve *L. monocytogenes* tarafından üretildiği (<0.58 mg/L) bildirmiştir. *K. pneumoniae*'nin histidinden yüksek oranda histamin ürettiği (>3400 mg/L), *E. faecalis*'in ise zayıf histamin üreticisi (<10 mg/L) olduğu bulunmuştur (Özogul & Özogul, 2007). Bu çalışmada *K. pneumoniae* ve patojen *E. faecalis* sırasıyla 17.62-106.89 mg/L ve 1.34-9.28 mg/L histamin üretmiştir. Gıdalarda histamin birikimi ve histidin dekarboksilaz aktivitesi mikroorganizma türü, ortamdaki histidine ve karbonhidrat konsantrasyonu (Arnold & Brown, 1978;

Edmunds ve Eitenmiller, 1975), oksijen düzeyi, vitaminler ve koenzimler, sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonu (Chen ve ark., 1989), ve kofaktör olarak pyridoksal hidrokloridinden (Taylor, 1986) etkilenmektedir.

BNE başta olmak üzere BEO grubu da zaman zaman kendi aralarında bozucu *E. faecalis*, *P. damsela* ve *V. vulnificus* tarafından üretilen HIS üretimini istatistikî olarak önemli düzeyde arttırmıştır. Genel olarak bakıldığında kullanılan besi ortamının histidin dekarboksilaz sıvısı olduğu düşünüldüğünde histamin üretimine oldukça müsait koşullar olması BEO ve BNE'nin bu organizmalar üzerinde oldukça etkili olduğunu göstermektedir.

Bakteriler tarafından serotonin (SER) ve dopamin (DOP) üretimi sırasıyla 2.42 ve 1.14 mg/L'nin üzerinde olup, *S. aureus* (514.54 mg/L) ve *K. pneumoniae* (104.16 mg/L) en yüksek SER ve DOP üreten bakteriler olmuştur. Muamele grupları test edilen bakteriler tarafından SER ve DOP üretimini engelleyici etkiye sahip olmuştur. En yüksek inhibitör etki ise her iki amin açısından *S. aureus* suşunda gözlenmiştir.

HDB içinde bozulma etmeni bakteriler arasında tiramin (TYR) üretim miktarında kayda değer miktarlarda üretim gözlenmemiştir. HDB içerisinde tiramin (TYR) üretimine bakıldığında muamele grupları tüm patojen organizmaların TYR üretimini azaltmasına rağmen en yüksek inhibisyon yine *S. aureus*'te (2-21 kat) gözlenmiştir ve patojen bakteriler arasında *S. aureus* tarafından üretilen TYR miktarını kullanılan BEO ve BNE grupları önemli ölçüde engellemiştir. *S. Paratyphi A* ve *E. faecalis* suşları kayda değer miktarda TYR üretmemesine rağmen en fazla üretim *K. pneumoniae*'de (24.28-69.78 mg/L) gözlenmiştir. HDB içinde bozulma etmeni bakteriler arasında tiramin (TYR) üretim miktarında kayda değer miktarlarda üretim *P. damsela* (22.77-145.58 mg/L) ve *P. mirabilis* (2.25-41.98 mg/L) suşlarında gözlenmiştir. Fakat patojen bakteriler arasında *S. aureus* tarafından üretilen tiramin miktarını kullanılan BEO ve BNE grupları önemli ölçüde engellemiştir. Kucerova ve ark. (2009) süt ve peynirden izole edilen *Enterococcus* üyelerinin çoğunun tirozin dekarboksilaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. HDB'de gıda kaynaklı patojenler tarafından TYR birikimi 1.1-13.4 mg/L arasında olmuştur (Gokdogan ve ark., 2012). Bu çalışmada, kontrol grubunda tiramin üretimi 0.59 mg/L (patojen *E. faecalis*) ve 145.58 mg/L (*P. damsela*) arasında olmuştur. BEO ve BNE grupları genel olarak TYR üretimini kontrol ve Tween 80 gruplarından daha fazla inhibe ederken ederken, *P. mirabilis*'te Tween 80, BEO ve BNE grupları benzer oranda etki etmişlerdir ve bu minör farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz olmuştur (p<0.05).

Kullanılan patojen ve bozucu bakteriler farklı

oranlarda TMA üretmişlerdir. HDB içerisinde patojen bakteriler arasında en düşük ve en yüksek TMA üreten bakteriler sırasıyla BNE varlığında 0.98 mg/L ile *E. faecalis* ve kontrol grubunda 89.26 mg/L ile *K. pneumoniae* olurken; bozucu bakteriler arasında en düşük ve en yüksek TMA üreten bakteriler sırasıyla BEO varlığında 0.43 mg/L ile *S. liquefaciens* ve kontrol grubunda 83.90 mg/L oranıyla *P. luteola* olmuştur.

Agmatin (AGM) arjininden direk olarak üretilmekte ve arjinin dekarboksilaz enzimi ile N-carbamoylputresine dönüşmektedir (Burne ve ark., 2006). Histidin dekarboksilaz sıvısında kontrol grupları arasında en yüksek agmatin üretimi *K. pneumoniae* tarafından (42.15 mg/L) gerçekleşmiştir. Genel olarak AGM üretimine bakıldığında ise yine kullanılan muamele grubuna bağlı olarak tüm bakteriyel suşlarda inhibisyon söz konusu olmuştur.

### SONUÇ ve ÖNERİLER

Literatür çalışmalarına bakıldığı zaman bu konuda Türkiyede ve dünyada sınırlı sayıda çalışma bulunduğu görülmektedir. Bu çalışmada biberiye esansiyel yağı ve bu yağ kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonların gıda kaynaklı patojen ve balıkta bozucu bakterilerin ürettiği oldukları biyojen aminlere karşı antimikrobiyal etkileri araştırılmış ve gıda sanayinde kullanımını mümkün kılacak ve uygulanabilecek sonuçlar bulunmuştur. Sistem içindeki esansiyel yağ formu dikkate alındığında, bunun antibakteriyel özellikleri nanoemülsiyon sistemine dahil edilerek geliştirilmiştir. Nanoemülsiyon, test edilen çoğu bakteri türlerine karşı antimikrobiyal özellikler göstermiştir, ancak bu etkinin bakteriyostatik veya bakterisidal etki olduğu gözlenmemiştir. Nanoemülsiyon hazırlama yöntemi ve formülasyonundaki gelişme, antibakteriyel özelliklerini daha da iyileştirmek için daha fazla araştırılması önerilmektedir.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (ODÜ/BAP) tarafından A-2012 numaralı proje ile desteklenmiştir.

### Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

### Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### KAYNAKLAR

Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H 2014. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and

their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35, 177-183.

- Agatemor C 2009. Antimicrobial activity of aqueous and ethanol extracts of nine Nigerian spices against four food borne bacteria. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 8(3), 195-200.
- Akgül A 1993. Baharat bilimi ve teknolojisi. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, 15, 111-113.
- Anderson AK 2008. Biogenic and volatile amine-related qualities of three popular fish species sold at Kuwait fish markets. *Food Chemistry*, 107(2), 761-767.
- Aprotosoae AC, Luca VS, Trifan A, Miron A 2019. Antigenotoxic potential of some dietary non-phenolic phytochemicals. *In Studies in Natural Products Chemistry*, 60, 223-297.
- Arnold SH, Brown WD 1978. Histamine toxicity from fish products. In: *Advances in Food Research* (edited by C. O. Chishester, E. M. Mrak & G. F. Stewart), 113-154. New York: Academic Press.
- Ayas, D., Ozogul, Y., Ozogul, İ., & Uçar, Y. (2012). The effects of season and sex on fat, fatty acids and protein contents of *Sepia officinalis* in the northeastern Mediterranean Sea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(4), 440-445.
- Brink BT, Damink C, Joosten HMLJ, Huis Int Velt JHJ 1990. Occurrence and formation of biologically active amine in food. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 73-84.
- Bunkova L, Bunkab F, Klčovska P, Mrkvickac V, Dolezalova M, Kracmard S 2010. Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chemistry*, 121, 203-206.
- Burne RA, Griswold AR, Jameson-Lee M 2006. Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. *Journal of Bacteriology*, 188(3), 834-841.
- Chang SC, Kung HF, Chen HC, Lin CS, Tsai YH 2008. Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in a food borne poisoning. *Food Control*, 19, 16-21.
- Che Marzuki NH, Wahab RA, Abdul Hamid M 2019. An overview of nanoemulsion: Concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1), 779-797.
- Chen CM, Wei CI, Koburger JA, Marshall MR 1989. Comparison of four agar media for detection of histamine-producing bacteria in tuna. *Journal of Food Protection*, 52, 808-813.
- Chu Y, Gao CC, Liu X, Zhang N, Xu T, Feng X, Yang Y, Shen X, Tang, X 2020. Improvement of storage quality of strawberries by pullulan coatings incorporated with cinnamon essential oil

- nanoemulsion. *LWT-Food Science and Technology*, 122, 109054.
- De Las Rivas B, Marcobal A, Carrascosa A, Munoz R 2006. PCR detection of food bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine and cadaverine. *Journal of Food Protection*, 69, 2509–2514.
- Dimitrijević SI, Mihajlovski KR, Antonović DG, Milanović-Stevanović MR, Mijin DŽ 2007. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chemistry*, 104(2), 774-782.
- Durlu-Ozkaya F, Ayhan K, Vural N 2001. Biogenic amine produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products. *Meat Science*, 58, 163–166.
- Edmunds WJ, Eitenmiller RR 1975. Effects of storage time and temperature on histamine content and histidine decarboxylase activity of aquatic species. *Journal of Food Science*, 40, 516-519.
- Gokdogan S, Ozogul Y, Kuley E, Ozogul F, Kacar C, Ucar Y 2012. The influences of natural zeolite (cliptinolite) on ammonia and biogenic amine formation by foodborne pathogen. *Journal of Food Science*, 77, 452-457.
- Kučerová K, Svobodová H, Tůma Š, Ondráčková I, Plocková M 2009. Production of biogenic amines by Enterococci. *Czech Journal of Food Science*, 2, 50-55.
- Kuley E, Balikci E, Ozogul I, Gokdogan S, Ozogul F. 2012. Stimulation of cadaverine production by foodborne pathogens in the presence of Lactobacillus, Lactococcus, and Streptococcus spp. *Journal of Food Science*, 77, 650-658.
- Kuley E, Özogul F 2011. Synergistic and antagonistic effect of lactic acid bacteria on tyramine production by food-borne pathogenic bacteria in tyrosine decarboxylase broth. *Food Chemistry*, 127, 1163–1168.
- Lahreche, T., Ucar, Y., Kosker, A. R., Hamdi, T. M., & Ozogul, F. (2019). Combined impacts of oregano extract and vacuum packaging on the quality changes of frigate tuna muscles stored at 3±1°C. *Veterinary World*, 12(1), 155-164. Abstract.
- López-Sabater EI, Rodríguez-Jerez J, Hernández-Herrero M, Mora-Ventura MT 1996. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *International Journal of Food Microbiology*, 28(3), 411-418.
- Mao L, Xu D, Yang J, Yuan F, Gao Y, Zhao J 2009. Effect of small and large molecules emulsifiers on the characteristics of beta-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization. *Food Technology and Biotechnology*, 47(3), 336-342.
- Mason TJ, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM 2006. Nanoemulsions, formation, structure and physical properties. *Journal of Physics Condensed Matter*, 18, 635–66.
- Mehmood T, Ahmad A, Ahmed N, Ahmed Z 2017. Optimization of olive oil based O/W nanoemulsions prepared through ultrasonic homogenization: A response surface methodology approach. *Food Chemistry*, 229, 790–796.
- Mitić-Čulafić D, Žegura B, Nikolić B, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J, Filipič M 2009. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 260-266.
- Moghtader M, Salari H, Farahm A 2013. Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, 3(6), 210-214.
- Nakajima M 2005. Development of nanotechnology and materials for innovative utilization of biological functions. Proceedings of the 34th United States and Japan Natural Resources (UJNR) Food and Agriculture Panel, Susono, Japan
- Nielsen CK, Kjems J, Mygind T, Snabe T, Meyer RL 2016. Effects of Tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1878.
- Niven Jr CF, Jeffrey MB, Corlett Jr DA 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 321-322.
- Nowak A, Kalemba D, Krala L, Piotrowska M, Czyzowska A 2012. The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. *Food Microbiology*, 32, :212-6.
- Ordóñez JA, Hierro EM, Bruna JM, De La Hoz L 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329–367.
- Özogul F, Taylor KDA, Quantick P, Özogul Y 2002. Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 515–522.
- Özogul F 2004. Production of biogenic amines by *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Hafnia alvei* using a rapid HPLC method. *European Food Research and Technology*, 219, 465–469.
- Özogul F, Özogul Y 2007. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research Technology*, 225, 385–394.
- Özogul F 2011. Effects of specific lactic acid bacteria species on biogenic amine production by foodborne



- pathogen. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 478–484.
- Özogul Y, Yuvka İ, Ucar Y, Durmus M, Köşker AR, Öz M, Özogul F 2017. Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. *LWT*, 75, 677-684.
- Özogul Y, Boğa EK, Akyol I, Durmus M, Ucar Y, Regenstein JM, Köşker AR 2020. Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. *Food Bioscience*, 36, 100635.
- Özogul Y, Özogul F, Kulawik P 2021. The antimicrobial effect of grapefruit peel essential oil and its nanoemulsion on fish spoilage bacteria and food-borne pathogens. *LWT*, 136, 110362.
- Özogul Y, El Abed N, Özogul F 2022. Antimicrobial effect of laurel essential oil nanoemulsion on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. *Food Chemistry*, 368, 130831.
- Redmond JW, Tseng A 1979. High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *Journal of Chromatography A*, 170(2), 479-481.
- Richa R, Choudhury AR 2020. Exploration of polysaccharide based nanoemulsions for stabilization and entrapment of curcumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 1287–1296.
- Seitter M, Geng B, Ertel C 2011. Binding to extracellular matrix proteins and formation of biogenic amines by food-associated coagulase-negative Staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 483-7.
- Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M 2007. Design and development of oral oil in water ramipril nanoemulsion formulation: *In vitro* and *in vivo* assessment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(1), 28-44.
- Shalaby AR 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29:675e690.
- Silla Santos MH 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213e231.
- Sundararajan B, Moola AK, Vivek K, Kumar BDR 2018. Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). *Microbial Pathogenesis*, 125, 475–485.
- Taylor SL 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Critical Reviews Toxicology*, 17, 91-128.
- Uçar Y 2020. Narenciye kabuğu esansiyel yağları kullanılarak hazırlanan mikroenkapsüle balık yağı tozlarının depolama süresince renk ve duyuşal değişimleri. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(2), 515-526.
- Yazgan H 2020. Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. *LWT*, 130, 109669.
- Yazgan H, Ozogul Y, Kuley E 2019. Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 306, 108266.