

HALOFİLİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ VE GIDA SANAYİSİNDE KULLANIM ALANLARI

Seda Tahtacı, Gülden Başıyigit Kılıç*

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur

Geliş tarihi / Received: 25.01.2015

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 01.04.2015

Kabul tarihi / Accepted: 06.04.2015

Özet

Halofilik laktik asit bakterileri (HLAB), gelişmeleri için tuza gereksinim duyan, yüksek tuz konsantrasyonunu (>%18) tolere edebilen veya tuz-seven bakteriler olarak tanımlanmaktadır. HLAB, tuz içeriği yüksek fermente gıdalarda görülen baskın mikroorganizmalardır. Özellikle *Tetragenococcus* ve *Pediococcus* türlerinin fermentasyonda önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda *Tetragenococcus halophilus*, *Tetragenococcus muriaticus*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus plantarum* türleri yaygın olarak tespit edilmiştir. HLAB, başlatıcı kültür olabilmeye, aroma bileşenleri ve organik asit üretebilme özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde önemli yere sahiptir. Bu bakteriler tarafından üretilen laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler patojen mikroorganizmaların gelişmesini inhibe ederek üründe bozulmayı azaltır, aynı zamanda lezzet gelişimine katkıda bulunur. Ayrıca bu mikroorganizmalar tarafından üretilen β -karoten, poli- β -hidroksialkonat, ekzopolisakkaritler, enzimler, ektoin ve gliserol gibi belli özel bileşikler endüstride kullanılmaktadır. Bu derleme çalışmasında gıda sanayisinde önemli yere sahip olan HLAB hakkında bilgi verilmiş, bu bakterilerin üretimde kullanılmalarına yönelik yapılmış çalışmalardan örnekler sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Halofilik laktik asit bakterileri, tuz, ürün geliştirme

HALOPHILIC LACTIC ACID BACTERIA AND THEIR APPLICATION IN THE FOOD INDUSTRY

Abstract

Halophilic lactic acid bacteria (HLAB) are microorganisms that can live in high salt concentrations (>18%) and they are described as salt-loving bacteria. HLAB are dominant bacteria in the fermented foods contain higher salt. Especially *Tetragenococcus* and *Pediococcus* species play important role in the fermentation. *Tetragenococcus halophilus*, *Tetragenococcus muriaticus*, *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus plantarum* species have been commonly determined in previous studies. HLAB are significant in food industry due to produce flavoring components, organic acid and to be starter culture. Organic acids such as lactic acid and acetic acid produced by these bacteria reduce spoilage of products by inhibiting pathogenic microorganisms, and also contribute to development of flavor. In addition to these features, certain specific compounds as β -carotene, poly- β -hydroxyalconate, exopolysaccharides, enzymes, ectoine and glycerol are used in industry. In this review, information is given about HLAB and previous studies in this area were reviewed.

Keywords: Halophilic lactic acid bacteria, salt, product development

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ gkılıç@mehmetakif.edu.tr,

© (+90) 248 213 2724,

☎ (+90) 248 213 2704

GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), gıda fermantasyonlarındaki temel fonksiyonları sebebi ile oldukça önemli yere sahip olan mikroorganizmalardır. LAB, süt ve süt ürünlerinde, bitki ve bitki atıklarında, et ve et ürünlerinde, sıcakkanlı canlıların sindirim sisteminde bulunmaktadır (1, 2).

Halofilik laktik asit bakterileri (HLAB) gelişmeleri için tuza gereksinim duyan ve yüksek tuz konsantrasyonunu (>%18) tolere edebilen bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Halofilik mikroorganizmalar tuz-seven olarak da tanımlanmaktadır. Halofilik mikroorganizmaların tuz gereksinimleri ve tuz toleransları türlere göre farklılık göstermektedir. Larsen (1962), <%2 NaCl konsantrasyonunda gelişen bakterileri halofilik olmayan, %2-5 NaCl konsantrasyonunda gelişenleri hafif halofilik, %5-20 NaCl konsantrasyonunda gelişenleri orta halofilik ve %20-30 NaCl konsantrasyonunda gelişenleri ise aşırı halofilik mikroorganizmalar olarak tanımlamıştır (3).

Yapılan bu derleme çalışmasında özellikle Uzak Doğu ülkelerinde tuzlu fermente gıdalardan izole edilen HLAB hakkında bilgi verilmiş, bu bakterilerin teknolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine yapılmış çalışmalardan örnekler sunulmuştur.

HALOFİLİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ

HLAB, Uzak Doğu mutfağında önemli yer tutan soya sosu, kimçi, fermente siyah fasulye, hardal, ançüez gibi geleneksel fermente tuzlu gıdaların üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca bu mikroorganizmalar tarafından üretilen β -karoten, poli- β -hidroksialkonat, ekzopolisakkaritler, yüksek tuzlu ortamlarda ürettikleri enzimler, ektoin ve gliserol gibi belli özel bileşikler endüstride kullanılmaktadır (4, 5). HLAB tarafından üretilen β -karoten güçlü bir antioksidan olup gıdalarda, poli- β -hidroksialkonat dönüştürebilir plastik üretiminde, ekzopolisakkaritler ise yapıştırıcı ve ilaç sanayisinde kaplama materyali olarak, ayrıca tekstil, kozmetik sanayisinde kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalar tarafından yüksek tuzlu ortamlarda üretilen enzimler ve ektoin, yaşlanmayı yavaşlatıcı etkisi, kuru ve yıpranmış ciltleri onarma özelliği ile cilt bakım ürünlerinde, gliserol ise ilaç ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır (4, 6-9). Fermente ürünlerden izole edilen HLAB arasında *Tetragenococcus* ve *Pediococcus* türlerinin baskın florayı oluşturdukları belirtilmektedir (10). Yapılan çalışmalarda *T. halophilus*, *T. muriaticus*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus plantarum* türleri fermantasyonda yaygın olarak tespit edilmiştir. 2012 yılına kadar *T. halophilus*, *T. muriaticus*, *T. solitarius*, *T. koreensis* olmak üzere 4 tür olarak bilinen *Tetragenococcus* cinsine *T. osmosphilus* beşinci tür olarak eklenmiştir (11).

Pediococcus ve *Tetragenococcus* cinsleri Gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif, mikroaerofilik olan tipik LAB cinsleridir. Bu bakteriler homofermentatif olup, laktik asit üretirler, fakat glukozdan CO₂ üretmez ve nitratı indirgemezler. L (+) laktik asit üreten *Pediococcus clausenii* dışında bütün pediyokoklar glukoz fermantasyonu sonunda ana ürün olarak DL laktik asit üretirken, tetragenokoklar L (+) laktik asit üretmektedir. Bu bakterilerin sahip oldukları peptidoglukan yapıları benzerdir. Hücreleri oval veya ince uzun olmayıp, tetrat şekilleri ile diğer LAB'tan ayrılmaktadır (12-14). Tetragenokoklar pediyokoklardan yüksek tuz konsantrasyonlarına toleransları (>%18 NaCl) ve pH 5.0-9.0 arasında gelişebilme özellikleri ile ayrılmaktadır. Pediyokoklar pH 5.0'da gelişme gösteren asidurik mikroorganizmalardır. Pediyokoklar fenotipik ve genotipik olarak *Lactobacillus casei/paracasei*'ye daha çok benzerlik gösterirken *Tetragenococcus* cinsine uzak akrabadır (12). Halofilik tür olan *Pediococcus halophilus*'un *Enterococci* ve *Carnobacteria*'ya diğer pediyokoklardan daha fazla benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve bu türün üyelerinin *T. halophilus* olarak isimlendirilmesi önerilmiştir (12, 15). Dobson ve ark. (16) pediyokoklar arasındaki filogenetik ilişkiyi araştırmak için 16S rRNA gen analizleri ve HSP60 proteini araştırmaları yapmıştır ve bu çalışma ile de *T. halophilus*'un diğer pediyokok türlerine filogenetik açıdan benzerlik göstermediği bir kez daha tespit edilmiştir.

Halotolerant veya halofilik mikroorganizmaların yüksek tuz konsantrasyonlarına hızlı bir şekilde adapte olabilme yetenekleri, bakterilerin canlılıklarını devam ettirebilmeleri için sahip olmaları gereken önemli bir özelliktir (17). Mikroorganizmaların hücre dışında artan NaCl konsantrasyonlarına karşı sağladıkları adaptasyon, hücre sitoplazmalarında çeşitli küçük molekülleri biriktirmeleri ile dışarıda artan ozmotik basınca karşı koyma şeklinde gerçekleşmektedir. Tuz stresine diğer adıyla ozmolitlere karşı mikroorganizmaların verdiği yanıt olarak organik çözünenlerin biriktirilmesi mikroorganizmaların sahip oldukları ilginç mekanizmalar olarak belirtilmektedir. Ozmotik basıncın dengelenmesinde inorganik katyonlar (K⁺ ve bazı hücrelerde Na⁺) önemli rol oynamaktadır. Ozmolitler hücre tarafından sentezlenebilir ya da besi ortamından hücre içine taşınabilirler (18-20).

HLAB'IN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Uzak Doğu mutfağının vazgeçilmez lezzeti olan soya sosu, Korelilerin tüm dünyaya tanıttıkları kimçi, fermente balık ile hazırlanan Japon yemeği izushi, Tayvan'a özgü siyah fasulye ve hardal gibi farklı fermente gıdalardan HLAB izolasyonuna yönelik pek çok araştırma bulunmaktadır. Satomi

ve ark. (21) tarafından Japonya'da yapılan bir araştırmada, kalamar karaciğer sosundan izole edilmiş olan 11 adet orta halofilik bakterinin fenotipik, genotipik ve filogenotipik özellikleri araştırılmıştır. Suşların fiziksel, morfolojik ve kemotaksonomik karakterlerine göre *Tetragenococcus* türüne ait oldukları belirlenmiştir. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları, izolatların *T. muriaticus* olarak önerilen yeni bir *Tetragenococcus* türünü temsil ettiğini göstermiştir. Tayvan'a özgü geleneksel fermente hardalda (suan-tsai) bulunan LAB'ın izolasyonu, tanımlanması ve karakterize edilmesi için yapılan bir çalışmada ise fenotipik ve biyokimyasal özellikler 2 farklı bakteri grubunu tanımlamıştır. Elde edilen sonuçlar *P. pentosaceus*'un fermantasyonun başlangıcında baskın olduğunu ancak fermantasyonun ileri aşamasında tuzla daha fazla toleranslı olan *T. halophilus*'un, *P. pentosaceus*'un yerini aldığı ortaya koymuştur. Bütün izolatların %6 NaCl konsantrasyonu içeren sıvı besiyerinde geliştiği belirtilirken, sadece *T. halophilus*'un %10 NaCl konsantrasyonunda canlılığını sürdürdüğü tespit edilmiştir (22). Yapılan başka bir araştırmada 3 farklı üreticiden, 30 adet geleneksel Tayvan yemeği olan fermente siyah fasulye (dochi) toplanmıştır. Örneklerden 52 adet LAB izolatu elde edilmiş ve bakteriler fenotipik ve genotipik olarak sınıflandırılmıştır. Fermente siyah fasulyeden izole edilen LAB arasında en çok bulunan tür *Enterococcus faecium* olmuştur. Bütün izolatlar %6 NaCl içeren besiyerinde gelişirken *Enterococcus*, *Pediococcus* ve *Tetragenococcus* türleri, %10 NaCl içeren besiyerinde gelişme göstermiştir (23). Chao ve ark. (24) Asya bölgesinde çok popüler bir atıştırmalık yiyecek olmasına rağmen, mikrobiyel çeşitliliği ve özellikle LAB florası araştırmaları zayıf kalmış olan tofu üzerine çalışmıştır. Yapılan çalışmada klasik tofunun tuzlu fermente suyundan, sert soya peyniri suyu ve yumuşak soya peyniri suyundan 168 adet bakteri izole edilmiştir. RAPD analizleri ve 16S rDNA sekans analizleri ile incelenen bakteriler arasında 2 adet *Enterococcus*, 14 adet *Lactobacillus*, 3 adet *Lactococcus*, 6 adet *Leuconostoc*, 1 adet *Pediococcus*, 2 adet *Streptococcus* ve 4 adet *Weissella* türü olduğu belirlenmiştir. Chao ve ark. (25) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise Tayvan'ın geleneksel hardal ürünlerinden olan suan-tsai ve fu-tsai örneklerindeki LAB çeşitliliği ve suşların farklı tuz konsantrasyonlarına dayanıklılıkları belirlenmiştir. 16S rRNA sekans analizleri ile LAB'ın mikrobiyel çeşitliliğinin belirlenmesi için bu ürünlerin 5 farklı üretim basamağından izolasyon yapılmıştır. 500 adet LAB izolatu içerisinde tanımlanan 119 adet bakterinin *Enterococcus* (1 tür), *Lactobacillus* (11 tür), *Leuconostoc* (3 tür), *Pediococcus* (1 tür) ve *Weissella* (2 tür) olmak üzere 5 cins ve 18 türe ait olduğu saptanmıştır. Araştırılan 119 adet suşun yaklaşık %94.9'u %8 NaCl konsantrasyonundaki ortamda canlılığını sürdürebilmiştir. *Lactobacillus brevis*,

L. plantarum, *Leuconostoc pseudomesenteroides* ve *P. pentosaceus*'e ait olan 6 suş ise %8 NaCl konsantrasyonunda canlılığını sürdürememiştir. Cui ve ark. (26)'nın yaptığı bir çalışmada *T. halophilus*'un soya fasulyesi ezmesinde baskın olarak bulunduğu saptanmıştır. Güney Doğu Hindistan'a ait geleneksel fermente soya fasulyesinin fizyokimyasal analizi ve LAB'ın moleküler karakterizasyonu amacıyla yapılan başka bir çalışmada, mikrobiyolojik analizler örneklerin yüksek sayıda aerobik mezofilik bakteri ve düşük sayıda maya ve küf içerdiğini göstermiştir. Bütün ürünlerdeki baskın bakterilerin LAB, *Bacillus* ve *Staphylococcus* türlerine ait olduğu tespit edilmiştir. Örneklerdeki LAB'ın *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* türlerine ait olduğu belirlenmiştir (27). Kim ve ark. (28) tarafından yapılan bir çalışmada Kore'ye ait, tuz ile hazırlanmış geleneksel fermente bir deniz ürünü olan Jeotgal'in mikrobiyel çeşitliliği incelenmiştir. %26 ve %30 arasında NaCl içeriğine sahip iki üründe yapılan incelemede, her iki üründe de mikrobiyel çeşitlilikte fark saptanmamıştır. 16S rDNA gen dizi analizleri ile baskın olarak bulunan HLAB'ın *T. halophilus* ve *T. muriaticus* olduğu belirlenmiştir. *T. halophilus* ve *T. muriaticus* Endonezya soya ezmesi, Japon soya sosu, tuzlu ançüez, fermente kara bezelye, hardal ve Endonezya karides ezmesi (terasi) gibi gıdalardan da izole edilmiştir (22, 23, 29).

Tahtacı (2014) tarafından Burdur ve yöresindeki sofralık zeytinlerle yapılan çalışmada, 135 adet zeytin örneği incelenmiştir. Örneklerden %7 NaCl konsantrasyonunda de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) katı besiyerine yayma yöntemi ile ekim yapılmış, morfolojik özellikleri birbirinden farklı, çubuk ve kok şekilli 105 adet Gram pozitif, katalaz negatif HLAB izole edilmiştir (Tahtacı, 2014, Basılmamış veri).

HLAB'IN TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Fermantasyon süresince gıdalarda birçok kimyasal, biyokimyasal ve mikrobiyolojik değişiklikler meydana gelmekte ve sonuç olarak ürünün karakteristik tat, koku, aroma, tekstür ve renk gelişimleri gerçekleşmektedir. Her zaman aynı tat ve aromada, aynı yapı ve görünüşte kısacası standart kalitede ürünlerin üretimi ancak başlatıcı kültürlerle sağlanabilmektedir (30). Yapılan çalışmalarda gıda endüstrisinde kullanılan HLAB'ın, ürünlerin teknolojik özelliklerinin gelişmesi üzerine pek çok olumlu özelliği tespit edilmiştir. HLAB proteaz ve peptidaz enzimleri sayesinde süttteki proteinleri hidrolize etmekte ve aminopeptidaz enzimleri ile aminoasitlerin salınımında önemli rol oynamaktadır (31). Sakagucki (32) tarafından 1970'lerde soya sosu püresinden izole edilen halotolerant *T. halophilus* NBRC 12172'nin pH düşüşünde önemli olduğu ve modern soya sosu

fermantasyonunda tat oluşumuna ve ürün kalitesinin geliştirilmesine katkı sağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu suşun tuza olan yüksek direnci ve yüksek miktarda enzim üretim özelliği ile endüstriyel uygulamalar için önemli bir kaynak olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir.

Sofralık yeşil zeytinlerin fermentasyonunda uygun şartları belirlemek amacıyla Quintana ve ark. (33) tarafından yapılan çalışmada, zeytinlerin salamura suyundan 4 adet *L. plantarum* izole edilmiştir. İzolatların MRS sıvı besiyerinde gelişme hızları ve asit oluşturma yetenekleri, yeşil zeytin salamurasında 4.5 ve 5.0 pH değerleri, %3, %4 ve %5 NaCl konsantrasyonu ve 9, 12, 15 °C'de gelişme özellikleri araştırılmıştır. MRS sıvı besiyerinde asidifikasyonu etkileyen en önemli parametrenin sıcaklık olduğu saptanmıştır. Maksimum asidifikasyon 13 °C'de yaklaşık %3.3 NaCl konsantrasyonunda sağlanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde uygun başlatıcı kültür kullanımı ile %3 NaCl konsantrasyonu ve pH 5.0'da, düşük sıcaklıkta normal yeşil zeytin fermentasyonunun gerçekleşebileceği belirtilmiştir. Korukluoğlu ve ark. (34)'nin taze zeytin mikroflorasında bulunan LAB'ın belirlenmesi üzerine yaptığı bir başka çalışmada, incelenen 18 örneğin yalnızca 12'sinden LAB izole edilebilmiştir. Bakterilerin 15 °C'de ve %10 tuzda gelişme yeteneğinde olması, fazla sayıda karbon kaynağından yararlanması ve homofermentatif olup, gazlı bozulmalar yönünden tehlike oluşturmamaları nedeniyle *L. plantarum* ve *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* türlerinin doğal veya aşılmalı zeytin fermentasyonunda başlatıcı kültür olarak kullanımının uygun olabileceği belirtilmiştir.

Hypophthalmichthys molitrix (Gümüş Sazanı)'den elde edilen balık sosu fermentasyonunda soya sosu (koji) ve *T. halophilus*'un etkisinin incelendiği bir çalışmada, koji ve LAB olmadan hazırlanan balık sosunda düşük seviyede organik asit, toplam azot ve organik materyal belirlenmiştir. Soya sosunun kullanılması bu kalite parametrelerinde artışa ve balık sosundaki aminoasit miktarının artmasına sebep olmuştur. Soya sosu içeren balık sosuna *T. halophilus* eklenmesi ise, fermentasyon başlangıcındaki pH seviyesini düşürmüştür. Yapılan çalışmada *T. halophilus*'un Gümüş Sazanı balık sosu fermentasyonunda önemli rol oynadığı belirtilmiştir (35). Bir başka çalışmada ise, geleneksel Kore yemeği olan kimçiden izole edilen LAB'ın tanımlanması ve fermente sucuk üretiminde başlatıcı kültür olarak kullanılması üzerine çalışılmıştır. Bunun için tuzlu çin lahanası, pırasa, kırmızı biber tozu, sarımsak, zencefil ve şekerden oluşan baechu-kimchi tarifine göre hazırlanmış olan kimçiden toplam 31 adet *Lactobacillus* suşu izole edilmiştir. İzolatlar, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sake* ve *Leu. mes. mes. /dent* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlar arasında *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. plantarum* ve

L. sake'nin fermente sucuğa özgü şartlarla modifiye edilmiş sıvı besiyerindeki metabolik özellikleri ve gelişme profili incelenmiştir. Sonuçlara göre *L. curvatus* özel çevre şartlarına uyum sağlayamamış, *L. brevis* 8.18 KOB/ml, *L. plantarum* 8.51 KOB/ml ve *L. sake* ise 8.17 KOB/ml gelişme göstermiştir. *L. curvatus*, *L. plantarum* ve *L. sake* yüksek derecede asitlik meydana getirirken, *L. brevis*'in pH değerini çok az düşürdüğü gözlenmiştir. Glukoz fermentasyonu sonucuna göre ise yalnızca *L. plantarum* homofermentatif özellik göstermiştir. Kimçiden izole edilen izolatlar arasında sadece *L. plantarum*'un fermente sucuğun kompleks yapısına uyum sağlama yeteneğinde olduğu belirtilmiştir (36). Udomsil ve ark. (31)'nin yaptığı bir çalışmada ise, balık sosu fermentasyonunda *T. halophilus*'un %26-30 NaCl içeren ortamda balık proteinlerini hidrolize edebildiği ve başlatıcı kültür olma özelliği taşıyabileceği belirlenmiştir.

HLAB'ın ürettiği laktik asit, asetik asit gibi organik maddelerin bazı patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyel etki gösterip, bu bakterileri inhibe ettiği de yapılan bazı araştırmalar ile ortaya konmuştur. Japon fermente deniz ürünlerinden izole edilen antibakteriyel metabolit üreten *P. pentosaceus* Iz3.13 suşunun deniz ürünlerinde salgınlara sebep olan *Listeria* ve *Clostridium botulinum* bakterilerinin gelişmelerini inhibe ettiği belirlenmiştir. 100 °C'de 15 dakika ve pH 2-8 aralığında aktif olan bakteriyosinin *Listeria monocytogenes*'e karşı bakterisidal ve bakteriyolitik etki gösterdiği tespit edilmiştir (37). Morales ve ark. (38)'nin Meksika'ya ait geleneksel Cotija ve doble crema peynirlerinden izole edilen halotolerant veya halofilik LAB'ı tanımladığı bir çalışmada, en yüksek proteolitik aktivite *T. halophilus* ve *L. plantarum* suşlarında tespit edilmiştir. En yüksek asit oluşturan mikroorganizma *L. pentosus* ve *L. plantarum* iken, *T. halophilus*'un asit oluşturma özelliğinin yavaş olduğu saptanmıştır.

Gıda endüstrisinde HLAB'ın sağladığı bir başka olumlu özellik, mikroorganizmaların aroma maddesi üretme yetenekleridir. Aroma bileşenleri ürünlerin karakteristik tat ve kokusunun oluşmasında önemlidir (39). HLAB glutamik asit, aspartik asit, lizin, alanin, glisin ve triptofan içeren çok sayıda peptid ve aminoasitleri üretmek için protein yapıları ile reaksiyona girecek enzimleri üretir. Bu protein yapıları son ürünün lezzet oluşumuna katkıda bulunmaktadır (26). HLAB tarafından üretilen aminoasitler, peptidleri ve/veya oligopeptidleri lezzet oluşumu için öncü madde olan aminoasitlere dönüştürmede rol oynarlar (31). Bu bakteriler tarafından üretilen laktik asit ve asetik asit lezzet gelişimine katkıda bulunur (26). Balık sosundan izole edilen *T. halophilus* ile yapılan pek çok çalışmada fermentasyon süresince bu bakterinin kalite artırıcı özellikleri belirlenmiştir (32, 40, 41). *T. halophilus*'un asit üretiminde,

ürünlerin parlak renginin sürdürülmesinde, maya gelişmesinin indüklenmesinde, arzu edilen lezzetin geliştirilip, istenmeyen kokuların maskelenmesinde önemli olduğu ortaya konmuştur (42). Cui ve ark. (26)'nın yaptığı bir çalışmada *T. halophilus* T5, *Zygosaccharomyces* ve *Torulopsis candida* ile fermente edilmiş soya fasulyesinde 25 adet uçucu bileşik tespit edilirken, kontrol soya fasulyesi ezmesinde ise 13 adet uçucu bileşik belirlenmiştir. Karışık mikroorganizma içeren fermente soya fasulyesi ezmesi, kontrol soya fasulyesi ezmesi ile kıyaslandığında daha yüksek konsantrasyonda laktik asit içerdiği de tespit edilmiştir. *T. halophilus* T5 yüksek tuz konsantrasyonunda kuvvetli fermantasyon ve hızlı asidifikasyon özelliği gösterdiği için farklı yan ürünler oluşturmuştur. Soya fasulyesi ezmesinde fermantasyonun son aşamasında *T. halophilus*'un baskın olarak bulunduğu belirlenmiştir. Aroma maddesi üretimiyle ilgili yapılan başka bir çalışmada ise, yumuşak ve yarı-sert peynirlerden izole edilen 9 adet halofilik ve alkalofilik bakterinin genel olarak format, asetat, etanol ve laktat oluşturdukları tespit edilmiştir (43). Lee ve ark. (39) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, soya sosundan izole edilen *T. halophilus*'un ürettiği 107 adet uçucu madde tanımlanmıştır. *T. halophilus* ile işlenmiş soya sosu örneklerindeki en önemli uçucu maddelerin asetik asit, formik asit, benzaldehit, metil asetat, etil 2-hidroksi-proponat, 2-hidroksi-3-metil-2-siklopenten-1-on ve 4-hidroksi 3-metioksibenzaldehit olduğu tespit edilmiştir.

HLAB'ın gıda endüstrisinde kullanımı sırasında dikkat edilmesi gereken en önemli özelliklerinden bir tanesi bu bakterilerin biyojen amin üretme yetenekleridir. Biyojen aminler, aminoasitlerin dekarboksilasyonu ya da aldehit ve ketonların aminasyon ve transaminasyonu ile oluşan temel azotlu bileşikler olarak tanımlanmaktadır (44-45). Biyojen aminler temelde gıdalardaki aminoasitlerin, mikroorganizmaların dekarboksilaz enzimleriyle dekarboksilasyonu sonucu oluşmaktadır. Biyojen aminler büyük ölçüde proteince zengin gıdalar ve fermente gıdalarda oluşmaktadır (46). Biyojen aminler genellikle gıdalarda önemli seviyelerde bulunduğunda, insanlar için ciddi bir sağlık tehlikesi olarak kabul edilmektedir (47). Birçok çalışmada farklı bakteri suşlarının biyojen amin ya da amin dekarboksilaz enzimi ürettiği ortaya konmuştur. Gıdalarda önemli olan biyojen aminler; dopamin, feniletamin, histamin, kadaverin, oktopamin, putresin, serotonin, spermidin, spermin, tiramin ve triptamindir (48).

Kimura ve ark. (49) tarafından yapılan bir çalışmada balık sosundan izole edilen HLAB olan *T. muriaticus*'un histamin oluşturması incelenmiştir. Histamin varlığı balığın bakteriyolojik bozulmasına işaret eden kimyasal bir indeks olarak kabul edilmektedir (50). Araştırmada histamin oluşumu %3-20 NaCl konsantrasyonunda gözlenmiştir.

Optimum histamin oluşumu %3-7 NaCl konsantrasyonunda meydana gelirken, %20 NaCl konsantrasyonunda bile histamin oluşumunun önlenemediği tespit edilmiştir.

Tsai ve ark. (51)'ı Tayvan'da marketlerde ve perakende olarak satılan 33 adet tuzlu uskumruda histamin ve histamin üreten bakterilerin varlığını incelemiştir. Bütün örneklerdeki 9 biyojen aminin her biri 30 ppm'den az olmasına rağmen Kuzey Tayvan'dan toplanan 18 örnekten 2'sinin 70.1 ve 120.2 ppm seviyelerinde FDA'nın önerdiği limit olan 50 ppm'den daha fazla histamin içerdiği tespit edilmiştir. Seçici besiyerinden izole edilmiş 40 adet histamin üreticisi bakteriden 4 adet suşun %2 L-histidin ilaveli CASO sıvı besiyerinde 18.3 ppm'den 21.0 ppm'e değişen oranda histamin ürettiği belirlenmiştir. Histamin üreten bakterilerin 2 adedi *Pantoea* spp., 1 adedi *Pantoea agglomerans* ve 1 adedi ise *Enterobacter cloacae* olarak tanımlanmıştır. HLAB'ın yaygın olarak izole edildiği tuzlanmış balıklarda, kötü kaliteli hammadde, yetersiz işleme ve depolamaya bağlı olarak yüksek miktarlarda histamin oluştuğu ve bunun da histamin zehirlenmesine neden olduğu bildirilmektedir (32).

Udomsil ve ark. (31) tarafından yapılan bir çalışmada balık sosu fermantasyonu boyunca *T. halophilus*'un tiramin ve histamin birikiminde etkisi incelenmiştir. Balık sosundan izole edilen *T. halophilus* %10 NaCl ve histidin içeren ortamda, düşük olduğu varsayılan 44.6 ppm histamin üretmiştir. %25'lik yüksek tuz konsantrasyonunda ise histamin üretimi gerçekleşmemiştir. *Tetragenococcus* spp.'nin histamin birikimini baskılayıcı etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise, pirinç kepeği ile yapılmış geleneksel tuzlu fermente Japon yemeği Fish-nukazukeden izole edilmiş 200 izolattan, 130 adet suş histamin üretmezken, 13 suşun %0.5 histidin içeren ortamda 200 ppm'den fazla histamin ürettiği tespit edilmiştir (52). Biyojen amin üretimi üzerine Satomi ve ark. (41)'nin yaptığı başka bir çalışmada ise; *Tetragenococcus* spp.'den histamin üreten bakterilerde bulunan piruvol bağlı histidin dekarboksilaz geni (*hdca*) kodlayan plazmidlerin tam dizisi saptanmıştır. *hdca* geni varlığı, gene özgü primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak saptanmıştır. Histamin üreten izolatların *hdca* genine sahip olduğu jel elektroforezi ile görüntülenmiş ve uygun bantların gözlenmesi ile karar verilmiştir. Çalışma sonucunda fenotipik ve 16S rRNA gen sekans analizleri sonucunda bütün izolatlar balık sosu fermantasyonu sırasında ağırlıklı olarak histamin üreten bakteri olan *T. halophilus* olarak tanımlanmıştır.

Kore mutfağına özgü tuzlu fermente balık olarak tüketilen Myeolchi-jeot yemeğindeki biyojen amin miktarının azaltılması amacıyla yapılan bir çalışmada ise çeşitli gıda katkı maddelerinin biyojen amin oluşumu üzerine etkisi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tespit

edilmiştir. Biyojen amin üretimi üzerinde en büyük engelleyici faktörün glisin ile muamele edilmiş kültürlerde olduğu tespit edilmiştir. Kültür ortamına sodyum klorür, sükröz, glukoz, D-sorbitol, laktik asit, sitrik asit ve sorbik asit ilavesinin ise biyojen amin üretimi üzerinde önemli bir engelleyici etki meydana getirmediği belirlenmiştir (53). *T. halophilus* tarafından histaminden daha az üretildiği düşünülen diğer bir biyojen amin ise tiramindir. Yapılan bir çalışmada balık sosu fermantasyonunda *P. pentosaceus*'un ve *Enterococcus* spp.'nin de 79.6–81.0 ppm ve 32.0–201.0 ppm arasında tiramin ürettiği saptanmıştır (32).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda fermente gıdaların fibrinolitik enzimlerin kaynağı olduğu tespit edilmiştir. Fibrinolitik enzimler fibrini parçalama yeteneğine sahip olan proteolitik enzimlerin alt sınıfı olarak bilinmektedir. Geçmiş yıllarda bu enzimler kertenkele, solucan ve yılan gibi bazı hayvanlardan da izole edilirken son yıllarda bazı bakteriler ve fungusların da bu enzimi üretme yeteneğine sahip oldukları tespit edilmiştir (54). Soya fasulyesinden yapılan geleneksel Japon yemeği Natto, deniz canlılarından yapılan geleneksel Japon yemeği skipjack shiokara, bal mantarı olarak bilinen *Armillariella mellea* ve kimçi gibi birkaç fermente üründe varolan mikroorganizmalarda fibrinolitik enzimler bulunmuştur (55-57).

Prihanto ve ark. (58)'in iki fermente ürünündeki HLAB'ın proteolitik ve fibrinolitik enzim aktivitelerini incelediği çalışmada 70 adet izolat elde edilmiştir. İzolatlardan 25 adedi proteaz aktivitesi gösterirken, sadece 4 adedi fibrinolitik enzim üretmiştir. En yüksek proteolitik ve fibrinolitik enzim aktivitesi gösteren suş ise *Bacillus coagulans* TB1 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde son yıllarda yapılan araştırmalarda HLAB'ın metiyonin sentaz ve ribonükleotid redüktaz aktivitesinde kofaktör görevi gören B12 vitaminini biriktirme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada Watanabe ve ark. (59) fermente orkinostan izole edilen *T. halophilus* IAC-ks6 suşunun B12 vitamini biriktirme yeteneğinde olduğunu tespit etmiştir. Ancak bu konuda yapılan çalışmalar henüz çok sınırlıdır.

SONUÇ

HLAB ile ilgili yapılan araştırmalar, bu bakterilerin bazı teknolojik özellikleri sayesinde gıda endüstrisinde önemli olduklarını ortaya koymuştur. Gıdaların doğal florasında bulunan HLAB'ın, tuz içeriği yüksek fermente gıdalarda görülen baskın mikroorganizmalar oldukları için, aroma ve lezzet gelişiminde başlatıcı kültür olarak rol oynayabilecekleri düşünülmektedir. HLAB ile yapılmış çalışmalar incelendiğinde, araştırmaların çok yeni olduğu tespit edilmiş ve ülkemizde bu konu ile ilgili yapılmış kapsamlı bir araştırmaya

rastlanmamıştır. HLAB ile ilgili yapılan araştırmaların sayısının artması ve bu bakterilerin farklı teknolojik özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılması ile gıda endüstrisinde sağlık açısından risk taşımayacak tuz oranı içeren yeni fermente ürünlerin geliştirilmesine önemli ölçüde katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Başığit Kılıç G, Kuleaşan H, Eralp İ, Karahan AG. 2009. Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains. *LTW-Food Sci Technol*, 42, 1003-1008.
2. Sağdıç O, Öztürk İ, Cankurt H, Tornuk F. 2011. Interaction between some phenolic compounds and probiotic bacterium in functional ice cream production. *Food Bioprocess Tech*, DOI 10.1007/s11947-011-0611-x.
3. Larsen H. 1962. *The Bacteria: a Treatise on Structure and Function*, Akademik baskı, I.C. Gunsalus, R.Y. Stainer (editörler), Newyork, 297-342.
4. Oren A. 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms, *Environ Technol*, 31, 8-9, 825-834.
5. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. 2010. Lactic acid bacteria: Their antimicrobial compounds and their uses in food production, *Annals of Biological Research*, 1 (4), 218-228.
6. Yılmaz M, Yuvalı Çelik G. 2007. Bakteriyel Ekstraselüler Polisakkaritler (EPS), *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 05, 2, 7-13.
7. Mueller L, Boehm V. 2011. Antioxidant activity of β -carotene compounds in different in vitro assays. *Molecules*, 16, 1055-1069; doi:10.3390/molecules1602105.
8. Nwodo U.U, Green E, Okoh A.I. 2012. Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects, *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 14002-14015; doi:10.3390/ijms131114002. Review
9. Kunte H.J, G Lentzen, Galinski E.A. 2014. Industrial production of the cell protectant ectoine: Protection mechanisms, processes, and products, *Current Biotechnology*, 3, 1, 10-25(16).
10. Uchida M, Miyoshi T, Yoshida G, Niwa K, Mori M., Wakabayashi H. 2014. Isolation and characterization of halophilic lactic acid bacteria acting as a başlatıcı culture for sauce fermentation of the red alga Nori (*Porphyra yezoensis*), *J Appl Microbiol*, ISSN 1364-5072.
11. Justé A, Van Trappen S, Verreth C, Cleenwerck I, De Vos P, Lievens B, Willems K.A. 2012. Characterization of *Tetragenococcus* strains from sugar thick juice reveals a novel species, *Tetragenococcus osmophilus* sp. nov., and divides *Tetragenococcus halophilus* into two subspecies, *T. halophilus* subsp. *halophilus* subsp. nov. and *T. halophilus* subsp. *flandriensis* subsp. nov., *Int J Syst Evol Microbiol.*, 62(1):129-37. doi: 10.1099/ij.s.0.029157-0.

12. Holzapfel W.H, Franz C.M.A.P, Ludwig W, Back W, Dicks L.M.T. 2006. The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*, *The Prokaryotes*, 229-266.
13. Lahtinen S (ed), Ouwehand A.C (ed), Salminen S (ed), Wright von A (ed). 2011. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, CRC Press, s. 98-99.
14. Justé A, Lievens B, Rediers H, Willems K.A. 2014. Genus *Tetragenococcus*, Chapter 16.
15. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N.R, Ludwig W, Rainey F.A, Schleifer K.-H, Whitman W.B. 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. New York*, s. 611-616.
16. Dobson C.M, Deneer H, Lee S, Hemmingsen S, Glaze S, Ziola B. 2002. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer, *Int J Syst Evol Microbiol.* 52:2003-2010.
17. Zajc J, Kogej T, Galinski E.A, Ramos J, Cimerman N.G. 2014. Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl, *Appl Environ Microbiol.*, 80, 1, 247-256.
18. Reshetnikov A.S, Khmelénina V.N, Mustahimov I.I, Klayuzhnaya M, Lidstrom M. Trotsenko Y.A. 2011. Diversity and phylogeny of the ectoine biosynthesis genes in aerobic, moderately halophilic methylotrophic bacteria. *Extremophiles*, 15, 6, 653-663.
19. Shivan P, Mugeraya G. 2011. Halophilic bacteria and their compatible solutes— osmoregulation and potential applications, *Curr Sci.*, 100, 10.
20. Lopez-Pérez M, Ghai R, Leon M.J, Olmos-Rodríguez C, Copa-Patiño J.L, Soliveri J, Sanchez-Porro C, Ventosa A, Rodriguez-Valera F. 2013. Genomes of "*Spiribacter*", a streamlined, successful halophilic bacterium. *BMC Genomics*, 14:787.
21. Satomi M, Kimufu B, Mizoi M, Sato T, Fujii T. 1997. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce, *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 47, 3, 832-836.
22. Chen Y.-S, Yanagida F, Hsu J.-S. 2006a. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from suan-tsai (fermented mustard), a traditional fermented food in Taiwan, *J Appl Microbiol.*, 101, 125-130, doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02900.x
23. Chen Y.-S, Yanagida F, Hsu J.-S. 2006b. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *dochi* (fermented black beans), a traditional fermented food in Taiwan, *Lett Appl Microbiol.*, 43, 2, 229-235.
24. Chao S.-H, Tomii Y, Watanabe K, Tsai Y.-C. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in fermented brines used to make stinky tofu, *Int J Food Microbiol.*, 123, 134-141.
25. Chao S.-H, Wu R.-J, Watanabe K, Tsai Y.-C. 2009. Diversity of lactic acid bacteria in suan-tsai and fu-tsai, traditional fermented mustard products of Taiwan, *Int J Food Microbiol.*, 135, 203-210.
26. Cui Y, Qu X, Li H, He S, Liang H, Zhang H. 2012. Isolation of halophilic lactic acid bacteria from traditional Chinese fermented soybean paste and assessment of the isolates for industrial potential, *Eur Food Res Technol*, 234:797-806.
27. Thokchom S, Joshi S.R. 2013. Physicochemical analysis of ethnically fermented soybean products of North-East India and molecular characterization of associated lactic acid bacteria, *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci.*, DOI 10.1007/s40011-013-0199-1.
28. Kim M.-S, Park E.-Jin. 2014. Bacterial communities of traditional salted and fermented seafoods from Jeju Island of Korea using 16S rRNA gene clone library analysis, *J Food Sci.*, 79, 5.
29. Fukui Y, Yoshida M, Shozen K-I, Funatsu Y, Takana T, Oikawa H, Yano Y, Satomi M. 2012. Bacterial communities in fish sauce mash using culture-dependent and -independent methods, *J Gen Appl Microbiol.*, 58, 273-281.
30. Bonomo M.G, Ricciardi A, Salzano. 2011. Influence of autochthonous starter cultures on microbial dynamics and chemical-physical features of traditional fermented sausages of Basilicata region, *World J Microbiol Biotechnol.*, 27, 1, 137-146.
31. Udomsil N, Rodtong S, Tanasupawat S, Yongsawatdigul J. 2010. Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds, *Int J Food Microbiol.*, 141, 186-194.
32. Sakaguchi K. *Tetragenococcus halophilus* NBRC 12172. <http://www.bio.nite.go.jp/ngac/e/th1-e.html> (Erişim Tarihi: 21 Ocak 2015)
33. Quintana M.C, Garcia P.G, Fernandez A.G. 1999. Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature, *Int J Food Microbiol.*, 51, 133-143.
34. Korukluoğlu M, Gürbüz O, Şahin İ. 2002. Taze zeytin mikroflorasında bulunan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 8 (2) 109-113.
35. Uchida M, Uchida M, Ou J, Chen B.-W, Yuan C.-H, Zhang X.-H, Chen S.-S, Funatsu Y, Kawasaki K.-I, Satomi M, Fukuda Y. 2005. Effects of soy sauce koji and lactic acid bacteria on the fermentation of fish sauce from freshwater silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*, *Fish Sci.*, 71, 422-430.
36. Lee J.-Y, Kim C.-J, Kunz B. 2006. Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages, *Meat Sci.*, 72, 437-445.

37. Bagenda D.K, Hayashi K, Yamazaki K, Kawai Y. 2008. Characterization of an antibacterial substance produced by *Pediococcus pentosaceus* Iz3.13 isolated from Japanese fermented marine food, *Fish Sci.*, 74, 2, 439-448.
38. Morales F, Morales I.J, Hernandez C.H. 2011. Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses. *Appl Biochem Biotechnol.*, 164:889-905.
39. Lee K.E, Lee S.M, Choi Y.H, Hurh B.S, Kim Y.-S. 2013. Comparative volatile profiles in soy sauce according to inoculated microorganisms, *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 77(11), 2192-2200.
40. Gildberg A, Thongthai C. 2008. The effect of reduced salt content and addition of halophilic lactic acid bacteria on quality and composition of fish sauce made from sprat, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10:1, 77-88.
41. Satomi M, Furushita M, Oikawa H, Yano Y. 2011. Diversity of plasmids encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus* spp. isolated from Japanese fish sauce, *Int J Food Microbiol.*, 148, 60-5.
42. Onda T, Yanagida F, Uchimura T, Tsuji M, Ogino S, Shinohara T, Yokotsuka K. 2003. Analysis of lactic acid bacterial flora during miso fermentation, *Food Sci Technol Res.*, 9 (1), 17-24.
43. Ishikawa M, Yamasato K, Kodama K, Yasuda H, Matsuyama M, Okamoto Kainuma A, Koizumi Y, Yasuda H, Matsuyama M. 2013. Alkalibacterium gilvum sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic lactic acid bacterium isolated from soft and semi-hard cheeses, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63, 1471-1478, doi: 10.1099/ij.s.0.042556-0.
44. Naila A, Flint S, Fletcher G, Bremer P, Meerdink G. 2010. Control of biogenic amines in food existing and emerging approaches, *J Food Sci.*, 75, 7.
45. Stadnik J, Dolatowski Z.J. 2010. Biogenic amines in meat and fermented meat products, *Acta Sci Pol Technol Aliment.*, 9(3), 251-263.
46. Visciano P, Schirone M, Tofalo R, Suzzi G. 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood. Review Article. doi: 10.3389/fmicb.2012.00188.
47. Collins J.D, Noerrung B, Budka H, Andreoletti O, Buncic S, Griffin J, Hald T, Havelaar A, Hope J, Klein G, Koutsoumanis K, McLauchlin J, Müller-Graf C, Nguyen-The C, Peixe L, Maradona M.P, Ricci A, Sofos J, Threlfall J, Vågsholm I, Vanopdenbosch E. 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods, *EFSA Journal*, 9(10), 2393.
48. Spano G, Russo P, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Alexandre H, Grandvalet C, Coton E, Coton M, Barnovon L, Bach B, Rattray F, Bunte A, Magni C, Ladero V, Alvarez M, Fernandez M, Lopez P, Palencia de P.F, Corbi A, Trip H, Lolkema J.S. 2010. Biogenic amines in fermented foods. *Eur J Clin Nutr.*, 64, 95-100.
49. Kimura B, Konagaya Y, Fujii T. 2001. Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce, *Int J Food Microbiol.*, 70,1-2, 71-77
50. Françoise L. 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 27, 6, 698-709, doi: 10.1016/j.fm.2010.05.016.
51. Tsai Y.-H, Lin C.-Y, Chang S.-C, Chen H.-C., Kung H.-F, Wei C.-I, Hwang D.-F. 2005. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan, *Food Microbiol.*, 22, 461-467
52. Kuda T, Izowa Y, Ishii S, Takahashi H, Torido Y, Kimura B. 2012. Suppressive effect of *Tetragenococcus halophilus*, isolated from fish-nukazuke, on histamine accumulation in salted and fermented fish, *Food Chem*, 130, 3, 569-574.
53. Mah J.-H., Hwang H.-J. 2009. Effects of food additives on biogenic amine formation in Myeolchi-jeot, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicus*), *Food Chem.*, 114, 1, 168-173.
54. Dubey R, Kumar K, Agrawala D, Char T, Pusp P. 2011. Isolation, production, purification, assay and characterization of fibrinolytic enzymes (Nattokinase, Streptokinase and Urokinase) from bacterial sources, *Afr J Biotechnol.*, 10(8), 1408-1420.
55. Borah D, Yadav R.N.S, Sangra A, Shahin L, Chaubey A.K. 2012. Production, purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis*, isolated from tea garden soil samples of Dibrugarh, Assam, *Asian J of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5,3.
56. Lu C.-L, Chen S.-N. 2012. Fibrinolytic enzymes from medicinal mushrooms. Protein Structure, Eshel Faraggi E. (baş editör), InTech, s. 337-362.
57. Aradhya P.K, Chavan M.D. 2014. Production and characterization of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus niger*, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3,9, 843-851.
58. Prihanto A, Darius Firdaus M. 2013. Proteolytic and fibrinolytic activities of halophilus lactic acid bacteria from two Indonesian fermented foods, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2 (5) 2291-2293.
59. Watanabe F, Miyamoto E, Tanioka Y, Enomoto T, Kuda T, Nakano Y. 2006. TLC analysis of corrinoid compounds in the halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus*, *J Liq Chromatogr Relat Technol.*, 29:14, 2153-2158.