T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN FARKLI *ENTEROCOCCUS* TÜRLERİNİN BAKTERİYOSİN ÜRETME YETENEKLERİNİN VE BAKTERİYOSİNLERİNİN KARAKTERİSTİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Zeynep NALVURAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Aralık-2013
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN FARKLI *ENTEROCOCCUS* TÜRLERİNİN BAKTERİYOSİN ÜRETME YETENEKLERİNİN VE BAKTERİYOSİNLERİNİN KARAKTERİSTİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Zeynep NALVURAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nihat AKIN

2013, 55 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Nihat AKIN
Doç. Dr. Cemalettin SARIÇPOBAN
Yrd. Doç. Dr. Durmuş SERT

Bu çalışmada farklı peynirlerden izole edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının çeşitli indikatör bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir. Disk difüzyon, agar kuyu-difüzyon, spot-on-lawn ve modifiye agar-sandviç yöntemleri değerlendirilmiştir. Modifiye agar-sandviç yöntemi en uygun yöntem olarak seçilmiş ve kullanılmıştır. *Enterococcus* spp. izolatlarının ürettiği bakteriyosin benzeri maddelere en duyarlı indikatörler *Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes* olarak, en dirençli indikatör bakteri ise *Staphylococcus aureus* olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enterococci, bakteriyosin, modifiye agar-sandviç yöntemi, peynir

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF BACTERIOCIN PRODUCING ABILITY OF *ENTEROCOCCUS* SPP THAT ISOLATED FROM ARTISANAL CHEESE AND CHARACTERISATION OF THESE BACTERIOCINS

Zeynep NALVURAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN FOOD ENGINEERING

Advisor: Prof. Dr. Nihat AKIN

2013, 55 Pages

Jury
Prof. Dr. Nihat AKIN
Assoc Prof. Dr. Cemalettin SARIÇPOBAN
Asist Prof. Dr. Durmuş SERT

In this study, antimicrobial activity of *Enterococcus* spp. isolated from different cheeses on various indicator bacteria was determined. Disk diffusion, agar well-diffusion, spot-on-lawn and modified agar-sandwich methods were determined and modified agar-sandwich method was found favorable. *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* are the most sensitive indicators as *Staphylococcus aureus* is the most resistant indicator to bacteriocin-like substances produced by *Enterococcus* spp. isolates.

Keywords: Enterococci, bacteriocin, modified agar-sandwich method, cheese

ÖNSÖZ

Öncelikle bana kendisiyle çalışma fırsatı tanıyan, ilgi ve desteğini eksik etmeyen danışman hocam Sayın Prof Dr Nihat AKIN'a,

Bu süreçte tüm yardımları ve desteği için arkadaşım Nilgün ZENGİN'e ve,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen, beni bugünlere getiren aileme en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep NALVURAN
KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

2.1. Enterokoklar 3
2.2. Enterokokların Ekolojisi ve Kaynakları 4
2.3. Enterokokların Fonksiyonel Özellikleri 4
2.3.1. Bakteriyosin üretimi 5
2.3.2. Enterokokların gıdalardaki önemi 13
2.3.3. Enterokokların probiyotik olarak kullanımı 15
2.4. Enterokokların Patojenitesi 15
2.4.1. Antibiyotiklere karşı direnç 16
2.4.2. Virulans faktörleri 17

3. MATERYAL VE YÖNTEM **19**

3.1. Materyal 19
3.1.1. Enterokoklar 19
3.1.2. İndikatör bakteriler 19
3.1.3. Kullanılan besiyerleri ve diğer kimyasallar 19
3.2. Yöntem 20
3.2.1. Bakterilerin hazırlanması 20
3.2.2. Antimikrobiyal aktivitenin tayini 20
3.2.3. Antimikrobiyal aktivitenin karakterizasyonu 22

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **24**

4.1. Bakteriyosin Benzeri Madde Üreten *Enterococcus* Suşlarının Belirlenmesi 24
4.1.1. Disk-difüzyon yöntemi 24
4.1.2. Spot-on-lawn yöntemi 24
4.1.3. Agar kuyu-difüzyon yöntemi 25
4.1.4. Modifiye Agar-sandviç yöntemi 25
4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Karakterizasyonu 28
4.2.1. Proteolitik enzimlerin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisinin değerlendirilmesi 28
4.2.2. Farklı pH değerlerinin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisinin değerlendirilmesi 34

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 37

KAYNAKLAR 41

ÖZGEÇMİŞ 56

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

ACE inhibitörü: Angiotensin-converting enzyme inhibitor

ARE: Antibiotic-resistant Enterococci

ATP: Adenozin trifosfat

BCP: Bromocresol purple

BHI: Brain Heart Infusion

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

LAB: Laktik asit bakterileri

LDL: Low-density lipoprotein

rRNA: Ribozomal RNA

TCC: 1,3,5-trimetil-tetrazolyum klorür

VRE: Vancomycin-resistant Enterococci

AcH: Asetil kolin

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), fermente et, süt, sebze, meyve ve tahıl ürünlerinin üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır. Çeşitli gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski gıda muhafaza metotlarından birisi olarak kabul edilmektedir. Günümüzde modern işleme ve koruma yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen, özellikle son yıllarda tüketicilerin doğal ve katkısız ürünlere gösterdikleri talep artışı dolayısıyla, laktik asit bakterileri potansiyel gıda koruyucusu olarak önemini halen sürdürmektedir.

Laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği antagonistik aktivite, ürettikleri laktik ve asetik asit gibi organik asitler, H_2O_2, bakteriosin veya bakteriosin benzeri metabolitler, diasetil, alkol ve CO_2 gibi metabolitlerden kaynaklanmaktadır.

Bakteriyosinlerin gıdalarda antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra, doğal olmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları da ürün özellikleri açısından oldukça önemlidir. Peptid veya protein yapılarında olmaları ise pankreas kaynaklı proteolitik enzimlerden, mide salgılarından etkilenebildiklerini ve insan vücudunda sindirilebileceklerini göstermektedir. Ayrıca bazı bakteriyosinlerin (Grup II) ısı stabilitelerinin olması, yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır. Hatta bazı bakteriyosinler otoklavlama sıcaklığında bile stabil kalabilmektedir. Dolayısıyla bakteriyosinlerin et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok gıdada kullanımı mümkün olmaktadır.

Bakteriyosinler birkaç LAB tarafından üretilmektedir, biyolojik bozulma ve patojen mikroorganizmaların kontrolüne katkıda bulunmaktadır. Bu metabolik bileşiklerin muhtemelen sinerjist rol oynadıkları dikkate alınmalıdır. *Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Carnobacterium, Enterococcus* ve *Pediococcus* üyeleri de dahil olmak üzere birçok LAB nin bakteriyosin ürettiği bilinmektedir.

Gıda ile alakalı birçok *Enterococcus* suşu, özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium,* enterosin üretme yeteneğine sahiptir ve *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum* ve *Clostridium perfringens'*i de içine alan *Clostridium* spp. ve *Vibrio cholerae* gibi Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite sergilerler (Giraffa, 1995; Franz ve ark., 1996; Maisnier-Patin ve ark., 1996; Nunez ve ark., 1997; Simonetta ve ark., 1997; Ennahar ve ark., 1998; Laukova ve Czikkova, 1999; Sarantinoupoulos ve ark., 2002). Enterosinler genellikle Grup II bakteriyosinler

sınıfına aittir, yani küçük, ısıya dirençli, lantionin içermeyen genellikle kuvvetli antilisterial aktiviteye sahiptirler. Patojenlerin gelişimi üzerindeki etkilerinden dolayı, bakteriyosinlerin ya da bakteriyosin üreten suşların doğal gıda koruyucu olarak kullanılma potansiyeli vardır. Bu nedenle peynirlerden izole edilecek farklı *Enterococcus* türlerinin indikatör mikroorganizmalara karşı bakteriyosin (enterosin) üretme yeteneklerinin incelenmesi, üretmeleri beklenen bakteriyosinlerin özelliklerinin belirlenmesi dolayısıyla, dünya gıda sanayinde oldukça önemli bir paya sahip olan bakteriyosinlerin doğal koruyucu olarak kullanım olanaklarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Enterokoklar

Enterokoklar ilk olarak 1899 yılında Thiercelin tarafından tanımlanmıştır (Franz ve ark., 1999). 1933 yılında Lancefield tarafından D grup antijene sahip olan fekal streptokoklar için serolojik bir tiplendirme geliştirilmiştir. *Streptococcus* cinsi bakteriler 1937 yılında Sherman tarafından; piyojenik streptokoklar, viridans streptokoklar, laktik streptokoklar ve enterokoklar olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. *Streptococcus* cinsi daha sonra modern sınıflandırma tekniklerinin uygulanması ve yapılan serolojik çalışmalar dikkate alınarak *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Enterococcus* olmak üzere 3 ayrı cins başlığında anılmaya başlanmıştır.

16S rRNA dizilimi dikkate alındığında enterokoklar 4 gruba ayrılmaktadır. *E. faecium*, *E. hirae, E. mundtii* "faecium" grubu içinde; *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus* ve *E. pseudoavium* "avium" grubu içinde; *E. classeliflavus* ve *E. gallinarum* "gallinarum" grubu içinde yer almakta; *E. columbae* ve *E. cecorum* da dördüncü grubu oluşturmaktadır. *E. faecalis*, *E. dispar*, *E. flavescens*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfurous* ve *E. seriolicida* gibi diğer tüm enterokoklar bireysel olarak sınıflandırılmıştır (Franz ve ark., 1999; Franz ve ark., 2003; İşleroğlu ve ark., 2008).

Enterokoklar, proteolitik ve lipolitik aktivitelerinden dolayı pek çok fermente gıdanın duyusal özelliklerinde rol oynayan, bazı suşları bakteriyosin üretebilen, pastörizasyon sıcaklıklarına dirençli ve farklı sıcaklıklara ve üreme koşullarına adapte olabilme yeteneğine sahip bakterilerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde enterokokların starter, yardımcı kültür ve probiyotik olarak kullanımının arttığını göstermektedir. Bazı suşlarının iyi bilinen yararlı etkilerinin yanında enterokokların bakteriyemi, endokarditis, üriner sistemde ve diğer dokularda enfeksiyonlara neden olan hastahane kaynaklı patojen olduğu da bilinmektedir. Enterokokların patojenitesi virülens faktörleri ve antibiyotiklere direnç özellikleri ile ilişkilendirilmektedir. Antibiyotiklere dirençli suşlar et ürünleri, süt ürünleri ve hazır gıdalarda bulunabilmekte, hatta probiyotik olarak kullanılan suşlar dahi antibiyotiklere dirençli olabilmektedir.

Enterokoklar, karbonhidratları L-laktik aside fermente edebilme özelliklerinden dolayı homofermentatif laktik asit bakterileri içinde yer alan Gram pozitif, spor

oluşturmayan, bazı suşların pseudo-katalaz reaksiyonu göstermesine karşın genellikle katalaz negatif, oksidaz negatif, fakültatif anaerobik, *Enterococcus casseliflavus* ve *E. gallinarum* gibi bazı türleri dışında hareketsiz, kok şekilli bakterilerdir. % 6.5 NaCl ve pH 9.6 ortamında üreyebilmekte, 60 °C'de 30 dakikalık ısıl işleme dayanabilmekte ve suşların çoğu % 40 safra tuzu varlığında eskulini hidrolize edebilmektedir (Franz ve ark., 1999; İşleroğlu ve ark., 2008). Termodurik bakterilerdir, süte uygulanan pastörizasyon işlemi ile elimine edilemezler. Donma ve kurutmaya karşı *Escherichia coli*'ye kıyasla daha dayanıklıdırlar. Bütün türleri eskülini hidroliz eder ve 1,3,5-trimetil-tetrazolyum klorürü (TCC) indirgerler. Diğer yandan enterokoklar birçok karbonhidratı fermentatif olarak kullanırlar. *E. faecalis* ve *E. faecium* karbonhidratlardan fermentasyon yoluyla başlıca ürün olarak laktik asit ürettiklerinden çeşitli peynirlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılabilirler.

2.2. Enterokokların Ekolojisi ve Kaynakları

Enterokoklar, insan ve hayvanların sindirim sisteminin baskın florasını oluşturmakla birlikte toprak, yüzey suları, bitkiler, sebzeler ve böceklerde de bulunmaktadır. Enterokok türlerinden *E. faecalis*, *E. faecium ve E. durans*'ın insan dışkısından sıklıkla izole edilmesinin yanında bu bakterilere çiftlik hayvanlarında da daha az sıklıkta rastlandığı belirtilmektedir. *Enterococcus* cinsi içinde insan dışkısıdan en fazla *E. faecalis* ve *E. faecium*'un, tavuk, sığır ve domuz gibi hayvanlardan ise en fazla *E. faecium*'un izole edildiği, bunun yanında *E. faecalis* ve *E. cecorum*'un ve daha az sıklıkla da *E. gallinarum* ve *E.durans/hirae* ya da *E. avium*'a rastlandığı bildirilmektedir. *E. mundtii* ve *E. casseliflavus*'un ise tipik olarak bitki kaynaklı olduğu ifade edilmektedir (Franz ve ark., 1999; Tunail, 1999; Franz ve ark., 2003).

2.3. Enterokokların Fonksiyonel Özellikleri

Enterokoklar, probiyotik karakterleri ve süt ürünlerinin üretiminde starter olarak kullanılabilme imkânları gibi önemli biyoteknolojik özelliklere sahiptirler. Probiyotik olarak kullanılan suşlar insanların gastrointestinal sistemlerinden izole edilmekte olup, genel olarak Lactobacillus ve Bifidobacterium türlerine aittir. Bununla birlikte laktik asit bakterileri ve enterokoklarda son zamanlarda probiyotik olarak kullanılmaya başlanmıştır (Holzapfel ve ark., 1998). *E. faecalis* SF68 probiyotik olarak kullanılan ve

üzerinde en fazla çalışılan suş olup, çocuklarda görülen diyarenin önlenmesinde etkili olduğu öne sürülmüştür (Bellomo ve ark., 1980). Aynı zamanda *E. faecalis* SF68'in yetişkinlerde diyare septomlarının süresini kısalttığı ve dışkılama zamanını düzenlediği belirlenmiştir (Buydens ve Debeuckelaere, 1996). *E. faecium* ve *S. thermophilus* kullanılarak üretilen probiyotik ürünün, kolesterol seviyesini kısa dönemde azalttığı, ancak uzun dönemde LDL kolesterol seviyesinin azalmasında etkili olmadığı tespit edilmiştir (Richelsen ve ark., 1996). Diğer bir çalışmada *Lb. jugurti* ile *E. faecium* CRL 183 birlikte kullanılmasıyla üretilen soya sütünün in vitro da kolesterol miktarını %43 oranında azalttığı belirlenmiştir (Rossi ve ark., 1999). Gardiner ve ark., (1999) Çedar peyniri üretiminde probiyotik olarak *E. faecium PR88* suşunu kullandıkları çalışmada, kısa bağırsak sendromunun önemli ölçüde azaldığını ve peynirin duyusal özelliklerine de katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir. Muguerza ve ark., (2006), çiğ süt ten izole etikleri *E. faecelis* suşlarını kullanarak üretmiş oldukları fermente sütlerde, bu suşların potansiyel ACE inhibitorü aktivitesine sahip peptit oluşumunu sağladığını ve dolayısıyla antihipertansif bir etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. Özellikle hastalık oluşturan etmenlerin kodlandığı genler ile antibiyotiklere karşı direnç oluşturan genlerin gastrointestinal sistemdeki diğer bakterilere transfer olma olasılığı endişelerin artmasına neden olmuştur (Franz ve ark., 2003).

2.3.1. Bakteriyosin üretimi

Bakteriler tarafından üretilen protein yapısındaki antimikrobiyal maddenin tanımlanması ve isimlendirilmesinde 'Bakteriyosin' terimi ilk olarak 1953 yılında Jacob ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Jacob ve ark., 1953). 1969 yılına kadar bakteriyosinlerle ilgili yapılan çalışmalarda pek bir aşama kaydedilmemiş, 1969 yılında nisinin gıda koruyucu katkı maddesi olarak kullanımına izin verildikten sonra bakteriyosin kullanımının belirli bir potansiyel oluşturduğu fark edilmiş ve araştırmalar yoğunlaştırılmıştır.

Birçok gıda kaynaklı laktik asit bakterisi türü; *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium* ve *Propionibacterium*, bakteriyosin adı verilen küçük antimikrobiyal proteinler üretmektedirler. Gram-pozitif bakteriye karşı bakterisidal etki göstermekte, gıdanın bozulmasını sağlayan ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bazı mikroorganizmaları

da inhibe etmektedir (Tagg ve ark., 1976, Ray ve Daeschel 1992a, Klaenhammer 1993, Hoover ve Steenson 1993, De Vuyst ve Vandamme 1994, Jack ve ark., 1995).

Çoğu bakteriyosin bir veya birden fazla proteolitik enzime karşı duyarlıdır (Klaenhammer 1993, Schillinger 1990). LAB bakteriyosinleri belirli Gram-pozitif bakterilere karşı inhibisyon etkisine sahip olmaktadır. Normal şartlarda Gram-negatif bakteriler LAB'nin ürettiği bakteriyosinlere karşı dayanıklıdır, fakat EDTA gibi şelatlayıcı maddelere, ısı ve donma işlemlerine maruz bırakıldıklarında nisine karşı duyarlı hale geldikleri belirlenmiştir (Delves-Broughton ve ark., 1996). LAB bakteriyosinleri biyokimyasal ve genetik olarak membran geçirgenlik özelliğine sahip olup ve sitoplazmik membran üzerinde etkisini göstermektedir. Bunlar, aminoasit sekansı bilinen çoğu α-heliks veya β-pilili ikincil yapıya sahip amfifilik katyonik peptitler olup, bu ikincil yapıların membran aktif peptitlerin biyolojik aktivitelerinde önemli bir rolü olduğu saptanmıştır. Nisin ve pediocinin hayvanlar üzerinde toksik olmadığı ortaya konulmuştur (Ray, 1992b). LAB bakteriyosinleri genellikle 100ºC'de 20 dakika veya daha fazla süreyi tolere edebilmekte aktivitelerinde önemli bir değişim olmaksızın otoklav koşullarına dayanabilmektedirler. Nisin ve pediocin AcH asidik koşullarda yüksek sıcaklıkta ısıl işleme daha dayanıklıdır. Yüksek pH değerleri aminoasitlerin sekansında veya yapılarında geri dönüşümsüz değişikliklere neden olmaktadır.

2.3.1.1. Bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesi

Diğer laktik asit bakterileri üzerine bakteriyostatik etkiye sahip laktosin 27 istisna edilir ise, bakteriyosinler hassas hücrelere karşı bakteriyosidal etkili olarak rol oynamaktadırlar. İnhibitör aktivite yönünden bakteriyosinler iki temel gruba ayrılarak incelenebilmektedir.

a) Gram pozitif mikroorganizmaların nisbeten geniş bir kısmını inhibe edenler. Örneğin; nisin, pediosin A ve pediosin AcH.

b) Sadece üretici suşlar ile yakın ilişkili türleri inhibe edenler. Örneğin, laktasin F, laktakin B.

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin etki mekanizması üzerine ilk bilgiler kolisinler ile yapılan çalışmalara dayandırılmış ve geniş kabul görmüştür. Bu ilk görüşler, bakteriyosinin letal etkisinin iki safhada olduğunu ileri sürmektedir. İlk basamakta hassas organizmaların hücre duvarlarındaki özel reseptörler

vasıtası ile bakteriosin absorblanmakta, ikinci basamakta ise membranda öldürücü biyokimyasal hasarlar meydana gelmekte ve sonuçta hücre ölmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu birkaç yazar optik dansitede azalma olmaksızın, bakteriyosidal aktivite gözlemlemişlerdir ki bu, lethal etkinin önemli hücre lizisi olmadan da gerçekleşebileceğine işaret etmektedir. Yine laktobasil ve pediokoklar, bütün bakteriyosinleri absorbsiyon açısından denenmiş ve hem hassas hem de hassas olmayan hücreler tarafından bakteriyosinlerin absorblanabildiği belirlenmiştir.

Bu absorbsiyonun spesifite eksikliği, bakteriyosine karşı dayanıklılığın veya hassasiyetin yalnızca yüzeydeki reseptörlerin olmasına dayandırılamayacağını göstermiştir. Zajdel ve ark. (1985), laktostrepsin 5 ile yaptıkları denemede, reseptörlerin protein tabiatında olduğunu belirlemişler (tripsin muamelesi ile) ve laktostrepsin 5 aktivitesinde birinci hedefin hücre membranı olduğuna karar vermişlerdir. Laktostrepsin 5'in bu etkisi sonucu bütünlüğünü koruyamayan ve intrasellülar pH'yı sürdürmeyi başaramayan hücreler meydana gelmektedir. Bazı araştırıcılar ise laktostrepsin 5'in DNA, RNA ve protein sentezini geciktirdiğini belirtmişlerdir (Klaenhammer, 1988).

Bakteriyosinlerin belkide en önemlisi olan nisin, en çok sitoplazmik membran üzerine etkili olmaktadır. Hücrede ya ATP gibi sellülar materyalin kaybına neden olmakta veya lizize yol açabilmektedir. Son çalışmalar nisinin sitoplazmik membranda sülfidril gruplarına etki ettiğini ortaya koymuştur (Delves-Broughton, 1990). Aynı zamanda, murein sentezine de müdahele ettiği belirtilmektedir. Bu iki etki muhtemelen sinerjistiktir. Nitekim, Ramseier (1960) nisinin hassas *Clostridium butyricum* hücrelerine absorblanırken, dayanıklı hücrelerce absorblanmadığını ortaya koymuştur. Bundan dolayı nisinin hücredeki ilk hedefinin hücre membranı olduğu ve takibinde sitoplazmik membranı parçaladığı ve sitoplazmik materyalin dağılmasına neden olduğu ileri sürülmüştür. Sporlarda da çimlenme sonunda sitoplazmik membranın derhal parçalandığı ortaya konulmuştur (Lueck, 1980). Linnett ve Strominger (1973) tarafından da yüksek nisin konsantrasyonunun *Bacillus stearothermophilus* ve *E. coli*'de peptidoglikan sentezini inhibe ettiği saptanmıştır (Davidson ve Hoover, 1993).

L. helveticus tarafından üretilen laktosin 27, DNA, RNA ve ATP seviyesine etki etmez iken, protein sentezini sınırlandırarak bakteriyostatik etki göstermektedir. Streptococcus cremoris tarafından üretilen diplokoksin ise hassas hücrelerde doğrudan DNA ve RNA sentezini durdurmakta ve hücre lizize uğramaksızın ölmektedir. Günümüzde nisin, 40'ı aşkın ülkede pastörize işlenmiş peynirlerde gıda preservatifi olarak kullanılmaktadır. Birçok ülkede de buna ilaveten süt tatlılarında, taze sütte bazı

konserve gıdalarda (patates, bezelye, hazır çorba, domates gibi) ve alkollü içkilerde kullanılmaktadır (Davidson ve Hoover, 1993; Delves-Broughton, 1990). Ülkemizde de peynirlerde kullanımına izin verilmiştir.

2.3.1.2. Enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler (enterosinler)

Bakteriyosin üreten enterokoklar doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve süt ürünleri (Foulquie Moreno ve ark., 2006), et (Garver ve Muriana 1993; Aymerich ve ark., 1996; Laukova ve ark., 1999; Bjorkroth ve ark., 2005; Arlindo ve ark., 2006), sucuk (Cintas ve ark., 1997; Ananou ve ark., 2005; Herranz ve ark., 1999), sebzeler (Foulquie Moreno ve ark., 2006), deniz ürünleri (Dalgaard ve ark., 2003; Campos ve ark., 2006; Rodriguez 2006; Arlindo ve ark., 2006), silaj gibi geniş yelpazede gıdalardan izole edilebildiği gibi memeli sindirim sisteminden de izole edilmektedirler.

Gıda ile alakalı birçok *Enterococcus* suşu, özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium*, enterosin üretme yeteneğine sahiptir ve *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* ve *Clostridium perfringens'*i de içine alan *Clostridium* spp. ve *Vibrio cholerae* gibi Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Giraffa, 1995; Franz ve ark., 1996; Maisnier-Patin ve ark., 1996; Nunez ve ark., 1997; Simonetta ve ark., 1997; Ennahar ve ark., 1998; Laukova ve Czikkova, 1999; Sarantinoupoulos ve ark., 2002). Enterosinler genellikle Grup II bakteriyosinler sınıfına aittir, yani küçük, ısıya dirençli, lantionin içermeyen genellikle kuvvetli antilisterial aktiviteye sahiptirler.

Enterococcus faecium tarafından üretilen bakteriyosinler sıkça rapor edilmiştir. Çizelge 2.1'de enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler verilmiştir. Enterosin L50A ve B (Toit ve ark., 2000), enterosin B (Caseus ve ark., 1997), enterosin 23 CCM 4231 (Laukova ve Czikkova 1998), enterosin ON-157 (Ohmomo ve ark., 2000), enterosin Q (Cintas ve ark., 2000) bu bakteriyosinlerin içerisinde yer almaktadır. Enterosin'in antimikrobiyal aktivitesinde ısıya ve alkali uygulamasına karşı yüksek bir direnç vardır. Böylelikle enterosin RJ-11, nisinin aktivitesinin hızla kaybolduğu pH 12'de bile stabil olmaktadır (Rollema ve ark., 1995). Bu bakteriyosinin aminoasit sekansı enterosin L50A (Cintas ve ark., 1995, 1998a, 2000) ve enterosin I (Floriano ve ark., 1998) bakteriyosinleriyle yüksek oranda benzerlik sergilemektedir. *Enterococcus faecium* L1 tarafından üretilen maddeler ısı stabil proteinlerdir ve enterosin EL1 olarak adlandırılmıştır. Bu klasik bakteriyosinin bir karakteristiği de dar aktivite spektrumuna

sahip olmasıdır (Tagg ve ark., 1976). Enterosin EL1'in moleküler ağırlığı enterosin 101 ve 102'ye yani sırasıyla moleküler ağırlığı 2.000 Da ve 2.500 Da olan bakteriyosinlere benzemektedir (Kato ve ark., 1994). *Enterococcus faecium* DPC 1146 tarafından üretilen bakteriyosinin moleküler ağırlığı SDS-PAGE'den sonra 3.000 Da olarak hesaplanmıştır (Parente ve Hill 1992).

Çizelge 2.1. Enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler

Grup I	Suş	Enterosine ait amino asit dizisi	Referans
Cyl L_L	*E. faecalis* DS16	MENLSVVPSFEELSVEEMEAIQGSGDVQAETTPVCAVAATAAASSAACGWVGGGIFTGVTV VVSLKHC	Gilmore ve ark., 1994
Cyl L_S	*E. faecalis* DS16	VLNKENQENYYSNKLELVGPSFEELSLEEMEAIQGSGDVQAETTPACFTIGLGVGALFSAKFC	Gilmore ve ark., 1994

Grup IIa	Suş	Enterosine ait amino asit dizisi	Referans
Enterosin A	*E. faecium* CTC492	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC	Aymerich ve ark., 1996
Enterosin CRL 35	*E. faecium* CRL 35	KYYGNGVTLNKXGXSVNXXXA...	Farias ve ark., 1996
Bakteriyosin 31	*E. faecalis* Y1717	ATYYGNGLYCNKQKCWVDWNKASREIGKIIVNGWVQHGPWAPR	Tomita ve ark., 1996
Enterosin P	*E. faecium* P13	ATRSYGNGVYCNNSKCWVNWGEAKENIAGIVISGWASGLAGMGH	Cintas ve ark., 1997
Mundtisin	*E. mundtii* AT06	KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWSK	Bennik ve ark., 1998
Bakteriyosin RC714	*E. faecium* RC714	ATYYGNGLYCNKEKCWVDWNQAKGEIGKIIVNGWVNHGPWAPR	del Campo ve ark., 2001
Enterosin SE-K4	*E. faecalis* K-4	ATYYGNGVYCNKQKCWVDWSRARSEIIDRGVKAYVNGFTKVLG	Eguchi ve ark., 2001

Grup IIc	Suş	Enterosine ait amino asit dizisi	Referans
Enterosin AS-48	*E. faecalis* S-48	MAKEFGIPAAVAGTVLNVVEAGGWVTTIVSILTAVGSGGLSLLAAAGRESIK AYLKKEIKKKGKRAVIAW	Martinez-Bueno ve ark., 1994
Enterosin B	*E. faecium* T136	ENDHRMPNELNRPNNLSKGGAKCGAAIAGGLFGIPKGPLAWAAGLANVYSKCN	Caseus ve ark., 1997
Enterosin L50A	*E. faecium* L50	MGAIAKLVAKFGWPIVKKYYKQIMQFIGEGWAINKIIEWIKKHI	Cintas ve ark., 1998b
Enterosin L50B	*E. faecium* L50	MGAIAKLVTKFGWPLIKKFYKQIMQFIGQGWTIDQIEKWLKRH	Cintas ve ark., 1998b
Enterosin EJ97	*E. faecalis* EJ97	MLAKIKAMIKKFPNPYTLAAKLTTYEINWYKQQYGRYPWERPVA	Galvez ve ark., 1998; Sanchez-Hidalgo ve ark., 2003
Enterosin Q	*E. faecium* L50	MNFLKNGIAKWMTGAELQAYKKKYGCLPWEKISC	Cintas ve ark., 2000
Enterosin 1071A	*E. faecalis* BEF 1071	ESVFSKIGNAVGPAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKKH	Balla ve ark., 2000; Franz ve ark., 2002
Enterosin 1071B	*E. faecalis* BEF1071	GPGKWLPWLQPAYDFVTGLAKGIGKEGNKNKWKNV	Balla ve ark., 2000; Franz ve ark., 2002
Enterosin RJ-11	*E. faecalis* RJ-11	APAGLVAKFGRPIVKKYYKQIMQFIGEGSAINKIIPWIARMWRT	Yamamoto ve ark., 2003

Grup III	Suş	Enterosine ait amino asit dizisi	Referans
Enterolisin A	*E. faecalis* LMG 2333	ASNEWSWPLGKPYAGRYEEGQQFGNTAFNRGGTYFHDGFDFGSAIYGNGSVYAVHDG KILYAGWDPVGGGSLGAFIVLQAGNTNVIYQEFSRNVGDIKVSTGQTVKKGQLIGKFTS SHLHLGMTKKEWRSAHSSWNKDDGTWFNPIPILQGGSTPTPPNPGPKNFTTNVRYGLR VLGGSWLPEVTNFNNTNDGFAGYPNRQHDMLYIKVDKGQMKYRVHTAQSGWLPWVS KGDKSDTVNGAAGMPGQAIDGVQLNYITPKGEKLSQAYYRSQTTKRSGWLKVSADNG SIPGLDSYAGIFGEPLDRLQIGISQSNPF	Nilsen ve ark., 2003

Çizelge 2.2. Enterosin üreten suşların gıdalardaki kullanımı

Suş	Enterosin	Kullanım	Referans
E. faecalis B114	Bilinmiyor	Camembert peyniri	Sulzer ve Buse, 1991
E. faecium 7C5	Enterosin 7C5	Taleggio peyniri	Giraffa ve ark., 1995b
E. faecalis INIA 4	Enterosin 4	Manchego peyniri	Joosten ve ark., 1995
E. faecalis INIA 4	Enterosin 4	Hispano peyniri	Garde ve ark., 1997
E. faecalis INIA 4	Enterosin 4	Manchego	Nunez ve ark., 1997
E. faecalis INIA 4	Enterosin 4	Hispano	Oumer ve ark., 2001
E. faecium CCM 4231	Enterosin CCM 4231	Saint-Paulin	Laukova ve ark., 2001
E. faecium CCM 4231	Enterosin CCM 4231	İspanyol usülü kuru fermente sosis	Callewaert ve ark., 2000
E. faecium RZS C13	Enterosin RZS C13	İspanyol usülü kuru fermente sosis	Callewaert ve ark., 2000
E. faecium CTC492	Enterosin A ve B	Kuru fermente sosis	Aymerich ve ark., 2000b
E. faecium CTC492	Enterosin A ve B	Pişmiş domuz eti	Aymerich ve ark., 2002
E. faecalis TAB 28	Enterosin AS-48	Çiğ süt peyniri	Rodriguez ve ark., 2001
E. faecium RZS C5	Enterosin RZS C5	Cheddar peyniri	Foulquie Moreno ve ark., 2003
E. faecium DPC 1146	Enterosin DPC 1146	Cheddar peyniri	Foulquie Moreno ve ark., 2003
E. faecium FAIR-E 198	Enterosin A ve/veya P	Feta peyniri	Sarantinopoulos ve ark., 2002b
E. casseliflavus IM 416K1	Enterosin 416K1	İtalyan sosisi (Cacciatore)	Sabia ve ark., 2003

Çizelge 2.3. Enterosinlerin katkı olarak kullanımı

Enterosin	Kullanım	Referans
Enterosin 226 NWC	Mozzarella peyniri	Villani ve ark., 1993
Enterosin CCM 4231	Soya sütü	Laukova ve Czikkova, 1999
Enterosin CCM 4231	Kuru fermente Hornad salamı	Laukova ve ark., 1999
Enterosin CCM 4231	Bryndza, koyun sütünden yapılan geleneksel Slovak süt ürünü	Laukova ve Czikkova, 2001
Enterosin CRL 35	Keçi peyniri	Farias ve ark., 1999
Enterosin CTC 492	Et ürünleri	Aymerich ve ark., 2000b
Enterosin CTC 492	Pişmiş domuz eti	Aymerich ve ark., 2002

2.3.2. Enterokokların gıdalardaki önemi

Enterokoklar, hayvanların bağırsak florasındaki yaygınlığına bağlı olarak özellikle hayvansal gıdalar başta olmak üzere pek çok gıdada bulunabilmektedir. Bu nedenle bazı kaynaklarda *E. faecalis* ve *E. faecium*'un fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirildiği görülmektedir (Klein, 2003). Ancak pek çok gıdada *E. faecalis*'in yaygın bulunuşunun her zaman için doğrudan fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirilmemesi gereğine de değinilmektedir. Enterokokların gıdalarda sadece yetersiz hijyen indikatörü olarak değil ayrıca gıdanın bir parçası olarak da göz önüne alınması gerektiği belirtilmektedir (Klein, 2003; İşleroğlu ve ark., 2008). Bununla birlikte enterokoklar diğer pek çok laktik asit bakterileri gibi ısıl işlem görmüş et ürünlerinde yüksek sıcaklığa karşı dirençli olma özelliğinden dolayı pastörizasyon sonrası canlı kalarak ya da dilimleme ve paketleme gibi işlem basamaklarında çapraz kontaminasyona bağlı olarak üründe bozulma yapabilmektedirler. Enterokoklar ayrıca fermente gıdalarda kontaminasyon düzeyini ya da kürleme işleminin yetersizliğini de yansıtmaktadır (Franz ve ark., 1999; Hugas ve ark., 2003).

Bu bakteriler, yukarıda açıklanan istenmeyen özelliklerinin yanında sahip oldukları pek çok yararlı özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde starter, yardımcı kültür (adjunct) ve probiyotik olarak da kullanılmaktadır. Pastörizasyon sıcaklıklarına direnci ve farklı sıcaklıklara ve üreme koşullarına adapte olabilme yeteneği (düşük ve yüksek sıcaklık, çok yüksek ve çok düşük pH değerleri ve tuz derişimleri) enterokokların özellikle peynir ve et ürünleri gibi fermente gıdaların mikroflorasının önemli bir parçasını oluşturmasını sağlamaktadır. Fermente gıdaların organoleptik özelliklerine katılması ve bakteriyosin (enterosin) üretim yetenekleri enterokokların gıda teknolojisinde kullanımı açısından önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar enterokokların starter ve yardımcı kültür olarak kullanımının arttığını göstermektedir (Klein, 2003; İşleroğlu ve ark., 2008; Khan ve ark., 2010).

Genel olarak laktik asit bakterileri, *Listeria* spp. gibi patojen ya da gıdalarda bozulma etmeni Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyel aktiviteye sahip bakteriyosinler üretmektedirler (Alvarez-Cisneros ve ark., 2010; Coşansu ve ark., 2009). Enterokokların ürettikleri bakteriyosinler ise enterosin olarak isimlendirilmektedir. Enterokokların ürettiği enterosinlerin kullanmı, sucuk fermentasyonunda ve dilimlenmiş vakum paketli pişmiş et ürünlerinde *L. monocytogenes*'in gelişiminin ve laktik asit bakterileri tarafından üründe yapışkan

tabaka oluşumunun önlenmesinde ek koruma yöntemi olarak yarar sağlamaktadır (Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3). Enterosin oluşturma özelliğindeki enterokoklar geleneksel kimyasal koruyuculara alternatif olarak et ürünlerinde patojenlerin kontrolü için kullanılabilmektedir (İşleroğlu ve ark., 2008; Hugas ve ark., 2003).

Enterokoklar, proteolitik ve lipolitik aktiviteleri ile diasetil gibi önemli uçucu bileşikleri üretebilme özellikleriyle peynirlerin olgunlaşması ve aroma gelişiminde katkı sağlamaktadır. Ayrıca bu bakteriler sucuk vb. geleneksel fermente gıdaların tat, koku ve kalite gelişiminde de önemli role sahiptirler. Enterokokların fermente et ve süt ürünlerinde sözü edilen istenilen özelliklerine karşın bazı enterokok suşlarının tiramin ve feniletilamin gibi biyojen aminleri oluşturabildikleri de belirtilmektedir (Hugas ve ark., 2003; Ayhan ve Durlu-Özkaya, 2007; İşleroğlu ve ark., 2008; Nieto-Arribas ve ark., 2011).

Enterokokların yüksek tuz derişimlerinde ve düşük pH'da üreyebilme yetenekleri ve peynirlerin olgunlaşması ve aroma gelişimindeki olumlu özellikleri nedeniyle peynirlerde starter ve yardımcı kültür olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda enterokokların starter olarak kullanımının, starter olmayan diğer laktik asit bakterilerinin üremesini olumlu yönde etkilediği, proteolitik indeksi ve serbest amino grubu derişimini arttırdığı, suda çözünebilir azot fraksiyonlarını zenginleştirdiği ve tat, aroma, renk, yapı ve tüm duyusal özellikleri olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir. Bunlara ilaveten enterokokların peynirlerde bakteriyosin oluşturarak *L. monocytogenes* gibi patojenleri inhibe ederek de yararlı etki sağladıkları, bakteriyosin üretiminin rennet, $CaCl_2$ ve enterokok olmayan diğer starter kültürler tarafından desteklenerek hedef bakterinin başarılı şekilde inhibe edildiği ifade edilmektedir (Franz ve ark., 2003; Hugas ve ark., 2003; İşleroğlu ve ark., 2008).

Gıda kaynaklı enterokoklara ilişkin ülkemizde yapılmış çeşitli çalışmalarda beyaz peynirden (Hajikhani ve ark., 2007), tulum peynirinden (Gürses ve Erdoğan, 2006; Tuncer, 2009), geleneksel Türk sucuğundan (Sırıken ve ark., 2006), tavuk, sığır eti, Cheddar peyniri, beyaz peynir, krem peynir, yoğurt, sütlü tatlılar gibi gıdalardan ve karabiber ve kırmızıbiber gibi baharattan (Koluman ve ark., 2009) enterokokların yaygın olarak izole edildiği belirtilmektedir.

2.3.3. Enterokokların probiyotik olarak kullanımı

Enterokokların bazı ülkelerde probiyotik olarak kullanımına ilişkin bilgiler bulunmaktadır (Franz ve ark., 1999; Franz ve ark., 2003; İşleroğlu ve ark., 2008). Probiyotik olarak en iyi bilinen *Enterococcus* suşu İsviçre'de üretilen *E. faecium* SF68'dir. Bağırsak bozukluklarının tedavisinde bu bakterinin etkinliğinin, bağırsakta kommensal olmasından ve kısa lag fazına ve jenerasyon süresine sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bakteri suşunun *in vitro* olarak *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp.'nin üremesi üzerinde inhibitor etki gösterdiğine de değinilmektedir. Bu suşun ayrıca düşük pH'lara dirençli olduğu, safra tuzlarından etkilenmediği, bireylerin bakteriye karşı yüksek tolerans gösterdiği ve bireylerde hiç bir yan etki görülmediği de ifade edilmektedir. Bu suşun ishal tedavisinde antibiyotik uygulamasına alternatif olarak kullanılabileceği ve ayrıca antibiyotik kaynaklı ishalin önlenmesinde ve çocuklardaki ishalin tedavisinde klinik olarak etkili olduğu belirtilmektedir (Franz ve ark., 1999; Erginkaya ve ark., 2007; İşleroğlu ve ark., 2008).

Probiyotikler hayvan yetiştiriciliğinde bağırsak hastalıklarının önlenmesi veya tedavisinde ya da büyümeyi teşvik edici olarak da kullanılabilmektedir. Sindirim sistemindeki patojen bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmelerinden dolayı, hayvan yetiştiriciliğinde enterokoklar ve diğer laktik asit bakterilerinin probiyotik preparatları daha bir önem kazanmaktadır. Probiyotiklerin hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotiklerin yerine kullanımı hayvansal gıdalardan antibiyotiğe dirençli patojenlerin yayılımının önlenmesi yönüyle gıda mikrobiyolojisi açısından da önemlidir (Franz ve ark., 1999).

2.4. Enterokokların Patojenitesi

Bazı suşlarının iyi bilinen yararlı etkilerinin yanında enterokokların en yaygın hastahane kaynaklı patojenlerin arasında yer aldığı, özellikle de *E. faecium* ve *E. faecalis*'in fırsatçı patojen olduğu, bakteriyemi ve endokarditisin yanında üriner sistemde ve merkezi sinir sistemi gibi dokularda enfeksiyonlara neden olabildiği bildirilmektedir. Enterokokların patojenite mekanizmalarında vankomisin gibi bazı antibiyotiklere direnç özelliklerinin ve sahip oldukları çeşitli virülens faktörlerinin önemli rolü olduğu belirtilmektedir (İşleroğlu ve ark., 2008).

2.4.1. Antibiyotiklere karşı direnç

Enterokokların insan sağlığı açısından dikkat çekmesinin nedenlerinden biri antibiyotiklere direnç özellikleridir. Antibiyotik dirençliliği, enterokokların hastahane ortamında canlılığını sürdürmesine ve dirençli suşların yayılmasına neden olmaktadır. Enterokokların antibiyotik direnci doğal ve kazanılmış direnç şeklinde sınıflandırılmaktadır. Sefalosporinler, aminoglikozitler, polimiksinler, linkomisin ve klindamisine karşı oluşan direnç doğal direnç olarak tanımlanmaktadır. Makrolitler, tetrasiklinler, kloramfenikol, trimetoprim sulfametoksazol, rifampisin, aminoglikozitler, glikopeptitler (vankomisin ve teikoplanin vb.) ve ampisiline karşı oluşan dirence ise kazanılmış direnç denilmektedir. Ampisilin, vankomisin ve gentamisin, çoklu antibiyotiğe dirençli enterokokların tedavisinde klinik olarak en yaygın kullanılan antibiyotiklerdir. Son yirmi yılda vankomisinin yaygın kullanımı sonucu vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşlarının sayısında ve dolayısıyla da yüksek vankomisin direncine sahip hastahane kaynaklı enterokokların invazyon oranında artış görülmüştür. Hastahanelerin yanında hayvanlara tedavi amaçlı ya da geleneksel hayvan yetiştiriciliğinde büyümeyi desteklemek amacıyla verilen antimikrobiyel ajanlar da kazanılmış direnç genlerinin potansiyel kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Bu direnç genleri gıda zinciri yoluyla insanları etkileyebilmektedir. VRE suşları, bütün antienterokokal ilaçlara karşı da direnç göstermekte ve bu nedenle önemli bir risk grubunu oluşturmaktadır. Antibiyotiğe dirençli enterokok (ARE) suşlarına gıdalarda yaygın olarak rastlanılmaktadır. Bu suşlar et ürünlerinde, süt ürünlerinde, hazır gıdalarda bulunabilmekte ve hatta probiyotik olarak kullanılan suşlar dahi antibiyotiklere dirençli olabilmektedir. Bu nedenle gıdalarda kullanılan yardımcı ya da starter enterokok kültürlerinin, suş spesifikliği göz önüne alınarak kazanılmış antibiyotik dirençliliği yönünden güvenli olup olmadığının kontrol edilmesinin gereği üzerinde durulmaktadır (Franz ve ark., 1999; Klein, 2003; İşleroğlu ve ark., 2008; Frazzon ve ark., 2010).

İnsan-gıda zincirinde yer alan enterokokların, konjugatif antibiyotiğe direnç transpozonlarını ya da plazmitlerini taşıdıkları ve antibiyotiğe direnç özelliğini, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* gibi gıda kaynaklı patojenlere ya da gıda ortamında yaygın bulunabilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis biovar*. *diacetylactis* ve *Leuconostoc mesenteroides* gibi bakterilere transfer edebildikleri belirtilmektedir (Franz ve ark., 1999). Gıda kaynaklı suşlar ile normal bağırsak florasında yer alan

mikroorganizmalar arasında da gen aktarımları söz konusu olabilmektedir. Bağırsaktaki mikrobiyal flora, konjugatif plazmitler, cinsiyet feromonları ve transpozonlar aracılığıyla gen aktarımı yapabilmektedir. Sonuç olarak gıda kaynaklı bakteriler bağırsak mikroflorası mikroorganizmalarıyla gen aktarımı yönünden ardı kesilmeyen bir ilişki içinde olabilmekte ve bu da söz konusu durumu daha karmaşık hale getirmektedir (von Wright ve Bruce, 2003).

Gıdalardan izole edilen enterokokların antibiyotik dirençlilik özelliklerine ilişkin yapılmış çeşitli çalışmalarda (Canzek ve ark., 2005; Frazzon ve ark., 2010; Bhardwaj ve ark., 2010) yöresel peynirler, süt, çeşitli süt ürünleri, et ürünleri, sebzeler ve starter kültürlerden izole edilen bazı enterokok suşlarının klindamisin, tetrasiklin, streptomisin, gentamisin, eritromisin, kanamisin, kloramfenikol ve vankomisin gibi antibiyotiklere dirençli olabildiği ancak vankomisin direnç genleri olan vanA ve vanB genlerini taşımadıkları ifade edilmiştir.

2.4.2. Virulans faktörleri

Enterokokların patojenitesi antibiyotiklere olan dirençlerinin yanında virülens faktörleri ile de ilişkilendirilmektedir. Virülens faktörleri, mikroorganizmaların hastalık oluşturabilme yeteneğini arttıran efektör moleküllerdir. Sitolizin, agregasyon materyalleri, jelatinaz, hücre dışı yüzey proteini bunlara tipik örneklerdir. Sitolizin enzimi, deney hayvanı çalışmalarında *E. faecalis* suşlarının virülens faktörü olarak değerlendirilmektedir. Sitolizin, ökaryotik hücreleri lize edebilme yeteneği ve bakterisidal etkisi olan ender lantibiyotiklerdendir. Bu lantibiyotik jelatinaz, jelatin, kollajen, hemoglobin ve diğer biyoaktif peptitleri hidrolize eden bir hücre dışı metallo-endopeptidaz enzimidir. Gıdalardaki *E. faecalis* suşlarında jelatinaz üretimi yüksektir. Çalışmalarda genotipte jelatinaz geninin bulunmasına karşılık fenotipte bu özelliği göstermeyen bazı suşların olduğu belirlenmiştir. Hücre dışı yüzey proteininin adhezyonda ve konakçı bağışıklık sisteminden korunmada rol oynadığı düşünülmektedir. Patojenlerin konakçı dokudaki hücre dışı matrikse tutunması enfeksiyon açısından oldukça önemlidir. *E. faecium* ve *E. faecalis*, trombospondin, laktoferrin, vitronektin gibi özel hücre dışı matriks proteinlerine bağlanabilmektedir. Agregasyon materyalleri, önemli virülens faktörlerinden olup bağırsak hücreleri mikrovilluslarının yüzeyi ile ilişki içerisindedir. Agregasyon materyalindeki Arg-Gly-

Asp-Ser aminoasit motifinin ökaryotik hücreye bağlanmada rol aldığı düşünülmektedir (Franz ve ark., 1999; İşleroğlu ve ark., 2008).

Tartışmalar, patojenik enterokokların gıdalar aracılığıyla taşınıp taşınmadığı yönünde yoğunlaşmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar gıda ve etlerde bulunan enterokokların özellikle de *E. faecium*'un klinik izolatlara göre daha düşük patojenite potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Araştırmalarda gıdalardan izole edilen enterokokların antibiyotik direnç özelliklerinin yanında potansiyel virülens faktörleri yönüyle de incelenmesinin gerektiği vurgulanmaktadır (Franz ve ark., 1999; Franz ve ark., 2001; Hugas ve ark., 2003; Sanchez ve ark., 2009; Carlos ve ark., 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Enterokoklar

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD ve İNTERMAK A.Ş. laboratuarından temin edilen, identifye 40 enterokok suşu kullanılmıştır. Kültürler –20 °C'de, % 20 gliserol içeren M17 (Merck, 115029) besiyerinde muhafaza edilmiştir.

3.1.2. İndikatör bakteriler

Konya İl Kontrol Laboratuvarından temin edilen *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Esherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49642 patojenler indikatör olarak kullanılmıştır. Kültürler - 20°C'de, % 20 gliserol içeren Brain-Heart Infusion (BHI-Merck, 113825) besiyerinde muhafaza edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan besiyerleri ve diğer kimyasallar

Enterokokların stoklanması, aktivasyonu ve antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde M17 (Merck, 115029); indikatör bakterilerin stoklanması ve aktivasyonunda BHI (Merck, 113825) besiyerleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde modifiye agar-sandviç metodunda % 1 (w/v) Agar-Agar (Merck) ve Mueller Hinton (Merck, 110293) besiyeri kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivitenin karakterizasyonunda tripsin (Sigma-Aldrich), α – kimotripsin (Sigma-Aldrich), proteinaz-K (Sigma-Aldrich) enzimleri ve bu enzim çözeltilerinin hazırlanmasında fosfat tamponu kullanılmıştır. Besiyerlerinin pH'larının ayarlanmasında 1 M NaOH ve 1M HCl kullanılmıştır.

Modifiye agar-sandviç metodunda ise pH indikatörü olarak Bromocresol Purple (BCP-Merck, 103025) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakterilerin hazırlanması

Çalışmada kullanılan bakteriler -20 °C'de % 20 gliserol içeren besiyerlerinde muhafaza edildiğinden analiz öncesinde oda sıcaklığında bekletilerek hazır hale getirilmiştir. Daha sonra *Enterococcus* spp izolatları M17 brothda 37 °C'de 48 saat inkube edilmiştir. Patojen mikroorganizmalar ise BHI brothda uygun gelişme sıcaklıklarında 24 saat inkubasyona bırakılmıştır.

3.2.2. Antimikrobiyal aktivitenin tayini

3.2.2.1. Disk-difüzyon yöntemi

Enterokokların belirlenen patojen indikatörler üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde birkaç modifikasyon ile disk difüzyon yöntemi takip edilmiştir (Bhunia ve ark., 1988). Aktifleştirilen *Enterococcus* spp izolatlarından steril M17 besiyerine % 1 oranında inokülasyon yapılarak 37 °C'de 24 saat inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrasında kültürler +4 °C'de 15.000 rpm de 15 dk santrifüj edilerek süpernatantları ayrılmıştır. Bakterilerden uzaklaştırılan süpernatantlar 0.22 μm (Millipore- SLGV 033RS) lik filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir.

Aktifleştirildikten sonra, BHI brothda 16 saat inkube edilen indikatör bakteri kültürleri +4 °C'de 15.000 rpm de 15 dk santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler iki kez steril fizyolojik tuz solüsyonu ile yıkanmıştır (Kıvanç, 1990).

Yıkanan indikatör bakteriler BHI plakaları üzerine yayılarak ekilmiştir. Steril süpernatantlar 6 mm çapında hazırlanan disklere (Whatman No 42) emdirilerek indikatör bakterilerin ekildiği plakalar üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra plakalar her bir patojenin gelişim sıcaklığına uygun olarak 24 saat boyunca inkubasyona bırakılmıştır. Süre sonunda oluşan zonların çapları ölçülmüştür (Bhuinia ve ark., 1988; Çadirci ve Çitak, 2005).

3.2.2.2. Spot-on-lawn yöntemi

Enterokokların belirlenen patojen indikatörler üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde spot-on-lawn yöntemi kullanılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkube edilerek aktifleştirilen *Enterococcus* spp kültürlerinden alınarak M17 agar plakaları üzerine nokta ekim yapılmıştır. Daha sonra bu plakalar 16 saat 37 °C'de inkubasyona bırakılmıştır.

Aktifleştirilen indikatör bakteri kültürleri, BHI brothda 16 saat inkube edilmiş ve sonra +4 °C'de 15.000 rpm de 15 dk santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler iki kez steril fizyolojik tuz solüsyonu ile yıkanmıştır (Kıvanç, 1990). Yıkanan indikatör bakteri hücreleri 7 ml (% 0.8 agar) BHI yumuşak agarla karıştırılarak M17 agar plakaları üzerine transfer edilmiştir. Daha sonra plakalar 37 °C'de 24 saat inkubasyona bırakılmış ve zon çapları ölçülmüştür (Schillinger ve Lücke, 1989). Kontrol olarak M17 broth kullanılmıştır.

3.2.2.3 Agar kuyu-difüzyon yöntemi

Enterokokların belirlenen patojen indikatörler üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde agar kuyu-difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Schillinger ve Lücke, 1989). Aktifleştirilen *Enterococcus* spp izolatlarından steril M17 besiyerine % 1 oranında inokülasyon yapılarak 37 °C'de 24 saat inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrasında kültürler +4 °C'de 10.000 rpm de 15 dk santrifüj edilerek süpernatantları ayrılmıştır. Bakterilerden uzaklaştırılan süpernatantlar 0.22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir.

İndikatör bakterilerin ekildiği BHI plakaları üzerinde 6mm çaplı kuyucuklar açılarak, bu kuyucuklara 50'er µl elde edilen steril süpernatanlardan ilave edilmiştir. Daha sonra plakalar her bir patojenin gelişim sıcaklığına uygun olarak 24 saat boyunca inkubasyona bırakılmıştır. Süre sonunda oluşan zonların çapları ölçülmüştür.

3.2.2.4. Modifiye agar-sandviç yöntemi

Enterokokların belirlenen patojen indikatörler üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde son olarak modifiye agar-sandviç yöntemi kullanılmıştır.

Aktifleştirilen *Enterococcus* spp izolatlarından 1 µl alınarak M17 plakalarının üzerine nokta ekim yapılmış ve 37 °C'de 16 saat inkubasyona bırakılmıştır.

37 °C'de bir gecelik taze kültürleri hazırlanarak aktifleştirilen indikatör bakterilerden, içerisinde 10 ml (% 0.8 agar) BHI yumuşak agar bulunan falkon tüplere % 1'lik ekim yapılmıştır. Bu aşamada pH indikatörü olan Bromocresol Purple (BCP) ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Bu indikatör pH 5.2'nin altında sarı renk verirken 6.8'in üzerinde mor renk vermektedir.

Daha sonra bu karışım 16 saat inkube edilmiş M17 plakaların üzerine dökülerek, her bir patojenin gelişim sıcaklığına uygun olarak 24 saat boyunca inkubasyona bırakılmıştır. Süre sonunda oluşan zonların çapları ölçülmüştür.

3.2.3. Antimikrobiyal aktivitenin karakterizasyonu

Zon oluşumunun gözlenmesinin ardından, zon oluşumuna sebep olan antimikrobiyal aktivitenin bakteriyosin ya da bakteriyosin benzerinde maddelerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı araştırılmak üzere karakterizasyon işlemine geçilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin kaynağının araştırılmasında proteolitik enzimler (tripsin, α-kimotripsin ve proteinaz-K) ve farklı pH değerlerinin etkisi değerlendirilmiştir.

3.2.3.1. Proteolitik enzimlerin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi

Enterosinler (bakteriyosinler) protein yapısında olan maddelerdir. Buradan hareketle eğer indikatör bakterilere karşın enterokokların oluşturduğu zonların yani antimikrobiyal aktivitenin kaynağı protein yapısında olan bir madde ise, proteolitik enzimlerle muamele sonucunda bu etkinin ortadan kalkması beklenmektedir.

Enterococcus spp izolatlarından daha önce belirtildiği şekilde elde edilen steril kültür süpernatantları, 37 °C'de 1 saat boyunca tripsin (0.05 M sodyum fosfat tamponu, pH 7, α-kimotripsin ve proteinaz-K (0.05 M sodyum fosfat tamponu, pH 7.5) enzimleri ile inkubasyona bırakılmıştır. Enzimlerin son konsantrasyonları 0.4 mg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Enzim solüsyonları 0.22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Ham kültür süpernatantı - fosfat tamponu (enzim yok), enzim – fosfat tamponu, ve sadece fosfat tamponu kontrol olarak alınmıştır. Kalan bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri madde(ler) aktivitesi yukarıda belirtildiği gibi değerlendirilmiştir. Enzimler ile muamele edilmiş süpernatantlar inkübasyondan sonra kalan antimikrobiyal

aktivite modifiye agar-sandviç yöntemiyle belirlenmiş ve zon çapları ölçülmüştür (Xiraphi ve ark., 2008).

3.2.3.2. Farklı pH değerlerinin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi

Farklı pH değerlerinin bakteriyosin benzeri madde aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla, M17 agarın pH ı 1 M NAOH ve 1 M HCl kullanılarak 4.5, 5.5, 6.5 ve 7.5 e ayarlanmıştır. *Enterococcus* spp izplatları nokta ekim ile farklı pH değerlerine sahip M17 plakalarına ekilmiştir. 37 °C'de 16 saat inkübe edilen M17 plakaların üzerine, % 1 (w/v) agar ile hazırlanmış BHI (yumuşak agar) ve patojen bakteri karışımı yavaşça dökülmüştür. 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında zon çapları ölçülmüştür.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Bakteriyosin Benzeri Madde Üreten *Enterococcus* Suşlarının Belirlenmesi

Enterococcus spp izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amacıyla dört farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerin tekrarlanabilirliği karşılaştırılmış ve en uygun yöntem olarak modifiye agar-sandviç yöntemi seçilmiştir. Daha sonraki tüm aşamalarda bu yöntem kullanılmıştır. Yöntemlerin test edilmesi amacıyla 21 adet *Enterococcus* spp belirlenmiştir. *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Esherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49642 indikatör olarak kullanılmıştır.

4.1.1. Disk-difüzyon yöntemi

Enterococcus spp izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi amacıyla ilk olarak disk-difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin uygunluğunun belirlenmesi amacıyla 21 adet *Enterococcus* suşu kullanılmıştır. Analizler iki paralelli gerçekleştirilmiştir. Deney sonunda suşların hiçbirinde indikatör mikroorganizmalara karşı zon oluşumu gözlenmediğinden çalışmanın devamında bu yöntem kullanılmamıştır.

4.1.2. Spot-on-lawn yöntemi

Enterococcus spp izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan yöntemlerden diğeri spot-on-lawn yöntemidir. Bu yöntemde, seçilen izolatlardan ikisinde *Enterococcus faecalis'*e karşın, diğer ikisinde *Listeria monocytogenes'*e karşın ve üçünde de *Staphylococcus aureus'* a karşın herhangi bir zon oluşumu gözlenmezken, diğer indikatörlere karşın hepsinin zon oluşturdukları tespit edilmiştir. Çalışma iki paralel ile gerçekleştirilmiştir. Bulguların doğrulanabilirliği modifiye agar-sandviç yöntemiyle karşılaştırılmış ve bu yöntem daha sonraki aşamalarda kullanılmamıştır.

4.1.3. Agar kuyu-difüzyon yöntemi

Enterococcus spp izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan diğer bir yöntem agar kuyu-difüzyon yöntemidir. Seçilen izolatlardan bazılarında *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus'*a karşın zon oluşumları gözlenmiştir. *Enterococcus faecalis*'e karşı ise zon oluşumunun aksine, seçilen izolatlar etrafında daha yoğun gelişim gözlenmiştir. Çalışma iki paralelli yapılmış ve elde edilen sonuçların tutarsız olması sebebiyle bu yöntem de çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılmak üzere tercih edilmemiştir.

4.1.4. Modifiye Agar-sandviç yöntemi

Enterococcus spp izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi amacıyla son olarak modifiye agar-sandviç yöntemi kullanılmıştır. Diğer yöntemlerde de kullanılmış olan 21 adet seçilmiş *Enterococcus* spp izolatları ve indikatör bakteriler kullanılmıştır. *Enterococcus* spp izolatlarının indikatör bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktiviteye ait zon çapı değerleri Çizelge 4.1.' de verilmiştir.

Antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi dört farklı metot denenmiştir. Disk-difüzyon ve agar kuyu-difüzyon yöntemlerinin her ikisinde de *Enterococcus* spp kültürlerinden elde edilen süpernatantlar kullanılmış ancak elde edilen sonuçlar her iki yöntem için de farklı olmuştur. Gerçekleştirilen diğer çalışmalar incelendiğinde benzer sonuçlarla karşılaşılmıştır. Schillinger ve Lucke (1989) yaptıkları çalışmada bakteriyosin üretiminin katı ve sıvı ortamlarda farklı olabileceğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Ammor ve arkadaşları (2006) kültür süpernatantlarıyla gerçekleştirilen denemelerin başarısız olduğunu belirtmiş ve bakteriyosin benzeri maddelerin etki şekillerini karakterize etme yoluna girerek iki farklı hipotez öne sürmüşlerdir. İlki, bakteriyosin / bakteriyosin benzeri maddelerin protein yapısında olmalarından ötürü hidrofilik bir N-terminal ve hidrofobik bir C-terminal uçlarından teşekkül olduğu dolayısıyla hidrofobik ucun, kullanılan filtrenin hidrofilik özelliğinden ötürü adsorbe edilebileceğidir. Filtreden geçirilen süpernatanta kritik oranda seyreltilmiş broth ilavesinin ardından bir değişiklik görülmediği için daha sonra bu hipotezden vazgeçilmiştir. İkinci hipotezleri ise, bakteriyosin / bakteriyosin benzeri maddelerin hücre duvarına tutunmuş olabileceği bu sebeple, indikatör mikroorganizmaların bakteriyosin üreten bakterilerle doğrudan temas halinde olduğu yöntemlerle

karşılaştırıldığında inhibisyonun görülemeyebileceğidir. Bu hipotez yıkanan hücrelerin indikatörler üzerinde inhibisyon aktivitesi göstermesi nedeniyle geçerliliğini korumaktadır. Villani ve ark. (1997), Barefoot ve Klaenhammer (1983), Lyon ve Glatz (1991) benzer sonuçlara ulaşmıştır. Spot-on-lawn yönteminde ise daha iyi sonuçlar elde edilmiş ancak antimikrobiyal aktivitenin laktik asit, asetik asit, diasetil, bakteriyosin vb diğer tüm metabolitlerden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır (Çon ve Gökalp, 2000). Spot-on-lawn yöntemi ile elde edien sonuçların daha sonra disk-difüzyon yöntemi ile kontrol edilmesinin daha doğru olacağı kanısına varılmıştır. Elde edilen veriler ışığında uygulamadaki kolaylık, sonuçların tutarlılığı ve tekrarlanabilirliği dikkate alındığında modifiye agar-sandviç yönteminin kullanılması uygun görülmüştür.

Mevcut olan 40 adet *Enterococcus* spp izolatının hepsi indikatör bakterilere karşın zon oluşturma potansiyellerine göre incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında kuvvetli zon oluşturan izolatlardan 15 tanesi seçilerek çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. *Enterococcus* spp izolatlarının indikatör bakterilere karşı oluşturdukları zon çapları (zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

	Bacillus cereus	*Salmonella typhimurium*	*Listeria monocytogenes*	*Pseudomonas flourescens*	*Escherichia coli*	*Klebsiella monocytogenes*	*Enterococcus faecalis*	*Staphylococcus aureus*
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	7.3	-	-	-	-	-	-	-
3	6.5	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	6.6	-	13.7	10.7	12.6	-	-	-
7	6.0	-	-	-	6.4	-	-	-
8	7.9	-	-	-	-	-	-	-
9	8.5	-	-	-	6.3	-	-	-
10	5.2	-	-	-	-	-	-	-
11	-	10.7	7.0	-	-	-	-	-
12	6.1	7.6	6.6	-	5.6	-	-	-
13	-	8.3	7.0	-	6.0	-	-	-
14	6.3	7.0	7.2	-	-	-	-	-
15	7.3	6.6	-	-	-	-	-	-

4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Karakterizasyonu

4.2.1. Proteolitik enzimlerin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisinin değerlendirilmesi

Enterococcus spp izolatlarının çoğunda (3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 ve 15 nolu izolatlar) proteolitik enzim uygulamasının ardından indikatör bakterilere karşı zon oluşturmadıkları gözlenmiştir. Tripsin, α-kimotripsin ve proteinaz-K enzimleri ile muamele edilen *Enterococcus* spp izolatlarının oluşturdukları zon çapları Çizelge 4.2.' de verilmiştir. Elde edilen veriler, antimikrobiyal aktivitenin bakteriyosin üretiminden kaynaklanabileceği sonucunu kuvvetlendirmektedir.

Bacillus cereus; 2 nolu izolat tripsin ile 5.4 mm, α-kimotripsin ile 5.2 mm, proteinaz-K ile muamele sonrasında ise 4.7 mm zon oluşturmuştur. 4 nolu izolat tripsin ile 12.8 mm, α-kimotripsin ile 8.3 mm, proteinaz-K ile muamele sonrasında ise 3.7 mm zon oluşturmuştur. 11 nolu izolat α-kimotripsin ile 3.8 mm, proteinaz-K ile muamele sonrasında 4.3 mm zon oluşturmuştur. 12 nolu izolat tripsin ile 5.2 mm, α-kimotripsin ile 4.3 mm, proteinaz-K ile muamele sonrasında 4.7 mm zon oluşturmuştur. 2, 4, 11 ve 12 nolu izolatlar haricinde diğer izolatlların *Bacillus cereus'*a karşın zon oluşturmadıkları gözlenmiştir.

Listeria monocytogenes; 2 nolu izolat tripsin ile 5.3 mm, α-kimotripsin ile 4.8 mm, proteinaz-K ile muamele sonrasında 5.1 mm zon oluşturmuştur. 12 nolu izolat tripsin ile 5.2 mm, α-kimotripsin ile 5.9 mm, proteinaz-K ile muamele sonrasında 5.7 mm zon oluşturmuştur. 13 nolu izolat proteinaz-K ile 5.8 mm zon oluşturmuştur. 2, 12 ve 13 nolu izolatlar haricinde diğer izolatların hiçbiri *Listeria monocytogenes'*e karşın zon oluşturmamıştır.

Klebsiella pneumoniae; 2 nolu izolat proteinaz-K ile muamele sonrasında 5.3 mm zon oluşturmuştur. 12 nolu izolat proteinaz-K ile muamele sonrasında 5.2 mm zon oluşturmuştur. 2 ve 12 nolu izolatlar haricinde diğer izolatların hiçbiri *Klebsiella pneumoniae'*e karşın zon oluşturmamıştır.

Salmonella typhimurium; 2 nolu izolat tripsin ile 12.8 mm, α-kimotripsin ile muamele sonrasında 8.0 mm zon oluşturmuştur. 2 nolu izolat haricinde diğer izolatların hiçbiri *Salmonella typhimurium'*a karşın zon oluşturmamıştır.

Enterococcus faecalis; 2 nolu izolat tripsin ile 6.1 mm, α-kimotripsin ile muamele sonrasında 7.2 mm zon oluşturmuştur. 3 nolu α-kimotripsin ile 5.2 mm,

proteinaz-K ile muamele sonrasında 6.4 mm zon oluşturmuştur. 4 nolu izolat α-kimotripsin ile muamele sonrasında 5.7 mm zon oluşturmuştur. 11 nolu izolat tripsin ile muamele sonrasında 5.7 mm zon oluşturmuştur. 12 nolu izolat tripsin ile muamele sonrasında 6.8 mm zon oluşturmuştur. 2, 3, 4, 11 ve 12 nolu izolatlar haricinde diğer izolatların hiçbiri *Enterococcus faecalis*'e karşın zon oluşturmamıştır.

Proteolitik enzimlerle muamele sonrasında 15 *Enterococcus* spp izolatının hiçbiri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas flourescens* ve *Escherichia coli*'ye karşın zon oluşturmadığı görülmüştür. Ayrıca 1 nolu izolatın enzim uygulamasının ardından hiçbir indikatöre karşın inhibisyon zonu oluşturmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Proteolitik enzim uygulamasında *Enterococcus* spp izolatlarının indikatör bakterilere karşı oluşturdukları zon çapları (zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

İndikatör	Proteolitik enzim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Bacillus cereus	tripsin	-	5.4	-	12.8	-	-	-	-	-	-	-	5.2	-	-	-
	α-kimotripsin	-	5.2	-	8.3	-	-	-	-	-	-	3.8	4.3	-	-	-
	Proteinaz-K	-	4.7	-	3.7	-	-	-	-	-	-	4.3	4.7	-	-	-
Listeria monocytogenes	tripsin	-	5.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.2	-	-	-
	α-kimotripsin	-	4.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.9	-	-	-
	Proteinaz- K	-	5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.7	5.8	-	-

Klebsiella pneumoniae			*Staphylococcus aureus*		
Proteinaz- K	α-kimotripsin	tripsin	Proteinaz- K	α-kimotripsin	tripsin
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
5.3					
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
5.2					
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-

Salmonella typhimurium	Proteinaz- K α-kimotripsin tripsin	-	-	-	12.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas flourescens	Proteinaz- K α-kimotripsin tripsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Escherichia coli																	
	Proteinaz- K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	α-kimotripsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	tripsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterococcus .faecalis																	
	Proteinaz- K	-	6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	5.7	6.8	-	-	-	
	α-kimotripsin	-	7.2	5.2	5.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	tripsin	-	-	6.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

4.2.2. Farklı pH değerlerinin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisinin değerlendirilmesi

Farklı pH değerlerinin *Enterococcus* spp izolatlarının antimikrobiyal aktivitesindeki değişim incelenmiş, zon çaplarına ait değerler Çizelge 4.3.' de verilmiştir. *Enterococcus* spp izolatlarından hiçbirisi pH 4.5'de antimikrobiyal etki sergilememiştir.

Bacillus cereus'a karşı 4.9 mm ile 15.5 mm arasında değişen zonlar oluşturulmuştur. En geniş inhibisyon zonu pH 5.5' de 7.5 mm ile 4 nolu izolatta, pH 6.5'de 10.2 mm ile 2 nolu izolatta ve pH 7.5'de 9.2 mm ile 13 nolu izolatta görülmüştür.

Staphylococcus aureus'a karşı 4.6 mm ile 5.7 mm arasında değişen zonlar oluşturulmuştur. En geniş inhibisyon zonu pH 5.5' de 5.6 mm ve pH 6.5'de 5.7 mm ile 12 nolu izolatta görülmüş olup, pH 7.5'de zon oluşumu gözlenmemiştir.

Listeria monocytogenes'e karşı 4.1 mm ile 13.1 mm arasında değişen zonlar oluşturulmuştur. En geniş inhibisyon zonu pH 5.5' de 5.4 mm ve pH 6.5'de 10.4 mm ile 6 nolu izolatta ve pH 7.5'de 13.1 mm ile 6 nolu izolatta gözlenmiştir.

Escherichia coli'ye karşı 3.6 mm ile 16.3 mm arasında değişen zonlar oluşturulmuştur. En geniş inhibisyon zonu pH 5.5' de 5.6 mm ile 4 nolu izolatta, pH 6.5'de 7.0 mm ile 6 nolu izolatta ve pH 7.5'de 16.3 mm ile 6 nolu izolatta görülmüştür.

Enterococcus faecalis'e karşı 3.6 mm ile 8.6 mm arasında değişen zonlar oluşturulmuştur. En geniş inhibisyon zonu pH 5.5' de 8.6 mm ile 2 nolu izolatta, pH 6.5'de 5.9 mm ile 12 nolu izolatta ve pH 7.5'de 8.4 mm ile 6 nolu izolatta görülmüştür.

Klebsiella pneumoniae'e karşı 3.5 mm ile 9.6 mm arasında değişen zonlar oluşturulmuştur. En geniş inhibisyon zonu pH 5.5' de 9.6 mm ile 7 nolu izolatta, pH 6.5'de 4.9 mm ile 1 nolu izolatta ve pH 7.5'de 9.1 mm ile 6 nolu izolatta görülmüştür.

Salmonella typhimurium'a karşı 3.3 mm ile 13.4 mm arasında değişen zonlar oluşturulmuştur. En geniş inhibisyon zonu pH 5.5' de 8.2 mm ile 2 nolu izolatta, pH 6.5'de 5.6 mm ile 2 nolu izolatta ve pH 7.5'de 13.4 mm ile 6 nolu izolatta görülmüştür.

Pseudomonas flourescens'e karşı 3.8 mm ile 6.3 mm arasında değişen zonlar oluşturulmuştur. En geniş inhibisyon zonu pH 5.5' de 4.0 mm ile 8 nolu izolatta, pH 6.5'de 4.6 mm ile 12 nolu izolatta ve pH 7.5'de 6.3 mm ile 4 nolu izolatta görülmüştür.

Çizelge 4.3. Farklı pH değerlerinde *Enterococcus* spp izolatlarının indikatör bakterilere karşı oluşturdukları zon çapları (zon çapları mm cinsinden verilmiştir).

	°pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Bacillus cereus	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	-	4.9	7.5	6.3	-	-	5.3	-	-	-	5.7	-	-	-
	6.5	-	10.2	12.0	6.9	-	-	-	15.4	-	6.6	6.5	15.5	-	-	-
	7.5	5.5	5.9	-	-	-	5.2	-	8.3	-	5.5	-	7.6	9.2	9.1	5.9
Staphylococcus aureus	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	4.7	4.9	-	-	-	-	5.1	-	-	-	5.6	-	-	-
	6.5	-	-	4.6	-	-	-	-	5.4	-	-	-	5.7	5.2	-	-
	7.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	5.2	4.2	4.1	4.2	5.4	5.1	4.8	4.6	4.6	5.0	4.9	-	5.2	-
	6.5	-	5.5	5.1	5.4	-	10.4	5.9	5.5	6.1	5.6	-	5.6	5.3	-	-
	7.5	5.7	5.8	6.9	5.2	-	13.1	5.1	5.6	5.3	5.2	5.5	6.8	6.3	5.6	5.8
Escherichia coli	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	4.2	4.7	3.8	5.6	-	4.2	4.8	3.6	-	-	-	4.3	4.2	-	4.4
	6.5	-	-	-	-	-	7.0	-	-	-	-	-	5.9	5.0	-	4.7
	7.5	-	-	-	-	-	16.3	-	7.4	-	-	-	-	-	-	-
Enterococcus faecalis	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	8.6	3.6	4.5	-	-	-	-	-	-	-	4.6	-	-	-
	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.9	-	-	-
	7.5	-	-	-	-	-	8.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	5.2	5.8	5.1	-	-	6.9	9.6	3.5	-	-	7.3	4.8	-	-	-
	6.5	4.9	-	4.7	-	-	-	-	4.4	-	-	-	4.6	-	-	-
	7.5	-	-	-	-	-	9.1	-	-	-	-	5.7	6.3	5.1	-	-

Salmonella typhimurium	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	-	8.2	3.3	6.7	7.2	6.5	5.6	4.0	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	4.5	5.6	4.2	-	-	-	-	4.7	-	-	-	-	-	-	-
	7.5	-	6.0	5.5	5.7	-	13.4	7.6	7.9	7.4	-	6.6	7.3	6.0	7.7	6.4
Pseudomonas flourescens	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	3.9	-	3.8	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	-	-	-	-	-	-	-	3.8	-	-	-	4.6	-	-	-
	7.5	-	5.6	5.5	6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gonzalez ve ark. 2007, peynirlerden tanımladıkları 395 laktik asit bakterisinin *L. monocytogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* suşlarına karşı antimikrobiyal etkisini test etmişlerdir. Etkili olan izolatların kültürlerinin nötürlenmesi sonrasında katalaz enzimi uygulandığında 395 izolattan sadece 24 adedi (*Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Leuc. mesenteroides* ve *Leuc. pseudomesenteroides*) antimikrobiyel etkisini korumuştur.

Ohmomo ve ark. 2000, fermente sebzelerden izole ettikleri *Enterococcus faecium* NIAI 157'nin ürettiği enterosin ON-157'nin proteolitik enzim uygulamalarında özellikle α-kimotripsin ve pepsin etkisiyle tamamen diğer proteolitik enzimlerde ise kısmen aktivitesini yitirdiğini belirtmişlerdir. Aynı bakteriyosin α-amilaz enziminde aktivitesini kaybederken, α-glukozidaz enziminde aktivite göstermiştir. pH 4 değerinde en yüksek aktiviteyi veren bakteriyosin, aynı şartlarda pH 8'de aktivitesini kaybetmiştir.

Campos ve ark. 2006, kalkan balığından izole ettikleri *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus faecium* ve *Lactococcus lactis*'in ürettikleri bakteriyosinlerin proteolitik enzimlere duyarlı olduğunu ve aktivitelerini kaybettiklerini fakat katalazdan etkilenmediklerini bildirmişlerdir.

Schillinger ve Lücke (1989), et ve et ürünlerinden izole ettikleri 221 adet laktik asit bakterisinin 90 adedinin çeşitli gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyel etki gösterdiğini ve bakteriyosin üreten *Lb. sake*'nin et ürünlerinde *L. monocytogenes*'in inhibisyonu için kullanılabileceğini önermişlerdir.

Vignolo ve ark. 1993, fermente sucuklardan izole ettikleri 100 adet *Lactococcus lactis* ve *Lb. plantarum* izolatlarının bakteriyosin ürettiği ve bunların özellikle birçok Gram negatif (*E. coli, Proteus, Serratia, Shigella, Klebsiella, Salmonella, Pseudomonas*) bakteriler ile Gram pozitif (*Bacillus subtilis, L. monocytogenes, S. aureus*) bakteriler üzerinde antimikrobiyel etki gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Nisin ve pediosinin yanı sıra diğer laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri de *Listeria* üremesinin kontrolüne yönelik araştırmalarda denenmiştir. Laukova ve ark., *L. monocytogenes* ile kontamine ettikleri fermente kuru salamlarda enterosin CCM 4231'in etkisini test etmişlerdir. İlave edilen enterosinin *L. monocytogenes* sayısını hızlı bir şekilde 1,7-log10 seviyesine düşürdüğünü belirlemişlerdir (inoküle edilen miktar 10^8 kob/ml). Salamda olgunlaşmanın ilk haftasından sonra kontrol grubunda *L. monocytogenes* sayısı 10^7 kob/g olmasına karşın bakteriyosin ilaveli grupta bu sayı 10^4 kob/g olarak belirlenmiştir. Olgunlaşmanın 2. ve 3. haftalarında da sayılardaki bu farklılık devam etmiştir.

Ohmomo ve ark. 2000, fermente sebzelerden izole ettikleri *Enterococcus faecium* NIAI 157'nin ürettiği enterosin ON-157'nin pH 4 değerinde en yüksek aktiviteyi veren bakteriyosin, aynı şartlarda pH 8'de aktivitesini kaybetmiştir. Albano ve ark. 2007, sucuklardan izole ettikleri *P. acidilactici*'nin ürettiği iki farklı bakteriyosinin (Bacteriosin HA–6111–2 ve Bacteriosin HA–5692–3) pH 10'da aktivitelerinin büyük bir kısmını kaybettiklerini hatta pH 12'de tamamen inaktif olduklarını, 100 °C'de 60 dakikada aktivitelerinin büyük bir kısmını kaybettiklerini 121 °C'de 20 dakikada tamamen inaktif olduklarını belirtmişlerdir.

Peynirden izole edilen *Enterococcus faecium* RZS C5 suşunun pH 6.5 ve 20-35 °C inkubasyon sıcaklığında maksimum düzeyde bakteriyosin ürettiği ve bu bakteriyosinin *Listeria*' ya karşı aktif olduğu belirlenmiştir (Leroy ve De Vuyst, 2002).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Peynirlerden izole edilen farklı *Enterococcus* türlerinin bazı patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerinin ve bakteriyosin üretme yeteneklerinin belirlenmesini amaçlayan çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

Enterococcus spp izolatları proteolitik enzimlerle muamele edilerek indikatör bakterilere karşı tekrar denenmiş ve antimikrobiyal aktivitenin kaynağı araştırılmıştır.

Modifiye agar-sandviç yöntemi sonuçlarına göre; 3 nolu izolat *Bacillus cereus*' a karşı 6.5 mm zon oluşturmuş, proteolitik enzimlerle muamele sonrasında zon oluşumu gözlenmemiştir. 6 nolu izolat *Bacillus cereus*'a karşı 6.6 mm, *Listeria monocytogenes*'e karşı 13.7 mm, *Pseudomonas flourescens*'e karşı 10.7 mm ve *E. coli*'ye karşı 12.6 mm zon oluşturmuştur. Proteolitik enzimlerle muamele sonrasında bu patojenlere karşı zon oluşumu gözlenmemiştir. 7 nolu izolat *Bacillus cereus*'a karşı 6.0 mm ve *E. coli*'ye karşı 6.4 mm zon oluştururken proteolitik enzimlerle muamele sonrasında zon oluşumu gözlenmemiştir. 8 ve 10 nolu izolatlarda proteolitik enzim uygulaması öncesinde *Bacillus cereus*'a karşı sırasıyla 7.9 mm ve 5.2 mm inhibisyon zonu oluştururlarken, sonrasında zon oluşumu gözlenmemiştir. 9 nolu izolat *Bacillus cereus*'a karşı 8.5 mm ve *E. coli*'ye karşı 6.3 mm zon oluştururken proteolitik enzimlerle muamele sonrasında zon oluşumu gözlenmemiştir. 11 nolu izolat *Salmonella typhimurium*'a karşı 10.7 mm, *Listeria monocytogenes*'e karşı 7.0 mm zon oluşturmuş, proteolitik enzimlerle muamele sonrasında zon oluşumu gözlenmemiştir. 14 nolu izolat *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı sırasıyla 6.3 mm, 7.0 mm ve 7.2 mm zon oluşturmuştur. Proteolitik enzimlerle muamele sonrasında zon oluşumu gözlenmemiştir. 15 nolu izolat *Bacillus cereus*'a karşı 7.3 mm ve *Salmonella typhimurium*'a karşı 6.6 mm zon oluşturmuş, proteolitik enzimlerle muamele sonrasında zon oluşumu gözlenmemiştir.

Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 ve 15 numaralı izolatların enzim uygulamasından önce inhibisyon aktivitesi gösterdikleri patojenlere karşı proteolitik enzim ile muamele sonrasında hiç birinin zon oluşturmadığı görülmüştür. Bu durum bahsi geçen izolatların antimikrobiyal aktivitelerinin sebebinin bakteriyosin üretmelerinden kaynaklandığı düşüncesini kuvvetlendirmiştir. *Enterococcus* spp. izolatlarının ürettiği bakteriyosin benzeri maddelere en duyarlı indikatörler *Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes* olarak, en dirençli indikatör bakteri ise *Staphylococcus aureus* olarak belirlenmiştir.

Farklı pH değerlerinin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisine bakıldığında *Enterococcus* spp izolatlarından hiçbirisinin pH 4.5'de antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir. Genel olarak bakıldığında pH 6.5 ve pH 7.5 değerlerinde daha geniş inhibisyon zon çapları gözlenmiştir.

Sonuç olarak uygun pH değerlerinde enterokok izolatlarının indikatör bakterilerin gelişimini inhibe edici etkileri olduğu saptanmıştır. Proteolitik enzimler ile muamele sonrasında bazı izolatların antimikrobiyal etkilerinin devam etmesi bu suşların, bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri madde ürettiği düşüncesini oluşturmaktadır. Ancak antimikrobiyal aktivitenin kaynağının kesin olarak doğrulanmasında daha ileri analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Günümüze kadar bakterilere karşı etkili çok sayıda antibiyotik ve kimyasal ajan geliştirilmiştir. Ancak son yıllarda bakterilerin kullanılan antibiyotiklere karşı hızla dirençlilik kazanması, yeni antimikrobiyel bileşiklerin araştırılmasını ve geliştirilmesini hedefleyen çalışmaları ön plana çıkartmıştır. Diğer taraftan gıdaların korunması amacıyla kullanılan koruyucuların insan sağlığını tehdit edici boyutlarının bulunması ve çeşitli alerjik reaksiyonlara neden olması, tüketici tercihlerini daha güvenli ve doğal antimikrobiyel ajanların kullanılması yönünde değiştirmiştir. Bu doğrultuda laktik asit bakterileri gibi insan tüketimi açısından güvenli bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, mikroorganizmalarla mücadelede yeni nesil antimikrobiyel ajanlar olarak ortaya çıkmıştır.

Gıdaların doğal florasında bulunmasının yanında sahip oldukları fonksiyonel özelliklerden dolayı gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olan enterokoklar insanlarda bakteriyemi, endokarditis, üriner sistemde ve diğer dokularda enfeksiyonlara yol açabilmekte ve taşıyabilecekleri virülens genleri ve antibiyotik dirençlilik özelliklerinden dolayı enterokokların probiyotik olarak kullanımı tartışma yaratmaktadır. Bu nedenle gıdalarda kullanılan yardımcı kültür, starter ve probiyotik özellikteki enterokok kültürlerinin suş spesifikliği göz önüne alınarak antibiyotik dirençliliği ve virülens genlerini taşıma potansiyeli yönünden güvenli olup olmadığı kontrol edilmelidir.

KAYNAKLAR

Albano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T., Teixeira, P. 2007, Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from "Alheiras" (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays Meat Sci., 76 (4): 796–800.

Alison, G.E., Fremaux, C.and Klaenhammer, T.R. 1994, Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptites encoded within the lactacin F operon. J Bacteriol, 176; 2235-2241.

Alvarez-Cisneros YM, Fernandez FJ, Wacher-Rodarte C, Aguilar MB, del Rosario Sainz Espunes T, Ponce-Alquicira E. 2010, Biochemical characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by Enterococcus faecium MXVK29, isolated from Mexican traditional sausage. J Sci Food Agric, 90, 2475–2481.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I. 2006, Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control 17, 454–461

Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Galvez, A., et al. 2005, Control of Listeria monocytogenes in model sausages by enterocin AS-48. Intl J Food Microbiol, 103(2), 179–190.

Arlindo, S., Calo, P., Franco, C., Prado, M., Cepeda, A., & Barros-Velazquez, J. 2006, Single nucleotide polymorphism analysis of the enterocin P structural gene of Enterococcus faecium strains isolated from nonfermented animal foods. Mol. Nutr. Food Res, 50, 1229–1238.

Ayhan K, Durlu-Özkaya F. 2007, Biogenic amines in foods. In: Metabolism and Applications of Lactic acid Bacteria. Barbaros Özer (chef ed), Research Signpost, 37/661 (2), Kerela, India. 27p.

Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M., Nes, I.F., 1996, Biochemical and genetic characterization of enterocin A from Enterococcus faecium, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol 62, 1676– 1682.

Aymerich, M.T., Garriga, M., Costa, S., Monfort, J.M., Hugas, M., 2002a, Prevention of ropiness in cooked pork by bacteriocinogenic cultures. Int. Dairy J. 12, 239–246.

Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M., Hugas, M., 2000b, Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. J.Food Prot. 63, 721– 726.

Axelsson, L., 1998, Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects, Eds. Salminen, S., Wright, A., Marcel Decker, Inc. New York, Bassel, Hong Kong, pp. 1-72.

Balla, E., Dicks, L.M.T., Du Toit, M., Van Der Merwe, M.J.and Holzapfel, W.H. 2000, Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B two antimicrobial peptites produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. Appl. Environ. Microbiol., 66; 1298-1304.

Banwart GJ., 1989, Basic Food Microbiology. p. 773. AVI Book, Published by Von Nosrand Reinhold, New York.

Barefoot SF, Klaenhammer TR. 1983, Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus. Appl Environ Microbiol. Jun;45(6):1808–1815.

Bellomo G, Mangiagle A, Nicastro L, Frigerio G. 1980, A controlled doubl e-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. Curr. Ther. Res. 28:927–936.

Bennik, M.H.J., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L.G.M., Smid, E.J., 1998, A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated Enterococcus mundtii: full characterization and interaction with target organisms. Biochimica et Biophysica Acta 1373, 47–58.

Bhardwaj A, Gupta H, Kapila S, Kaur G, Vij S, Malik RK. 2010, Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic Enterococcus faecium KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. Int J Food Microbiol, 141, 156–164.

Bhunia, A.K., M.C. Johnson and B. Ray, 1988, Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by Pediococcus acidilactici. J. Appl. Bacteriol., 65: 261-268.

Bjorkroth, J., Ristiniemi, M., Vandamme, P., Korkeala, H. 2005, *Enterococcus* species dominating in fresh modified-atmospherepackaged, marinated broiler legs are overgrown by Carnobacterium and Lactobacillus species during storage at 6°C. International J. Food Microbiol. 97(3), 267–276.

Buydens P, Debeuckelaere S.1996, Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. Scandinavian J. Gastroenterology 31:887–89.

Callewaert, R., Holo, H., Devreese, B., Beeumen, J.V. and Vuyst, L.D. 1999, Characterization and production amylovorin amylovorus DCE 471 by a novel three-step method. Microbiology, 145; 2559-2568.

Callewaert, R., Hugas, M., De Vuyst, L., 2000, Competitiveness and bacteriocin production of enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. Int. J. Food Microbiol. 57, 33–42.

Campos, C., Rodriguez, O., Calo-Mata, P., Prado, M., & Barros-Velazquez, J. 2006, Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (Psetta maxima). Food Res. Int. 39, 356–364.

Canzek Majhenic A, Rogelj I, Perko B. 2005, *Enterococci* from Tolminc cheese: Population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. Short communication. Int J Food Microbiol, 102, 239-244.

Carlos AR, Semedo-Lemsaddek T, Barreto-Crespo MT, Tenreiro R. 2010, Transcriptional analysis of virulence-related genes in *enterococci* from distinct origins. J Appl Microbiol, 108, 1563–1575.

Caseus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E. and Holo, H. 1997, Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiol. 143; 2287- 2294.

Cintas, L.M., Rodriguez, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes, I.F, Hernandez, P.E. and Holo, H. 1995, Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. Appl. Environ. Microbiol. 61; 2643-2648.

Cintas, L. M., Casaus, P., Havarstein, L. S., Hernandez, P. E., & Nes, I. F. 1997, Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl. Environ. Microbiol. 63(11), 4321–4330.

Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., and Haverstein, L.S. 1998, Enterocins L5OA and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysis. J. Bacteriol. 180; 1988-1994.

Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., Havarstein, L.S., 1998b, Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. J. Bacteriol. 180, 1988– 1994.

Cintas, L.M., Casaus, P., Herraz, C., Haverstein, L.S., Helge, H., Harnandez, P. and Nes, I.F. 2000, Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N- terminal extension termed enterocin Q. J. Bacteriol. 182; 6806-6814.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. ve Chikindas, M.L., 2001, Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbiol, 71, 1–20.

Coşansu S, Geornaras I, Ayhan K, Sofos JN. 2009, Control of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat turkey breast slices by bacteriocin. TUBITAK-MAM 3rd Int. Congr Food Nutr, 22-25 April, Antalya, Turkey, p. 76.

Cuozzo, S.A., Sesma, F., Palacios, J.M., de Ruiz Holgado, A.P.and Raya, R.R. 2000, Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705 atwo peptite bactericin from *Lactobacillus casei* CRL 705. FEMS Microbiol Lett, 185; 157-161.

Çadırcı B.H. and Çitak S. 2005, A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. Pak J Nutr, 4 (4): 237-241.

Çon, A.H. and Gökalp, H.Y. 2000, "Production of Bacteriocin-Like Metabolites By Lactic Acid Cultures Isolated From Sucuk Samples" Meat Sci, 55 (2000) 89-96 (2000).

Daeschel, M. A. 1989, Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43: 91-94.

Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P., & Leisner, J. J. 2003, Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0°C and 25°C. J Appl Microbiol, 94(1), 80–89.

Davidson PM, Hoover DG. 1993, Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. "Salminen, S. and von Wright, a. (ed): Lactic Acid Bacteria" p. 127, Marcel Dekker Inc. New York.

De Martinis, E.C.P., Alves, V.F. and Franco, B.D.G.M. 2002, Fundamentals and perspectives for use of bacterocins produced by lactic acid bacteria in meat products. Food Rev Int, 18(2-3); 191-208.

del Campo, R., Tenorio, C., Jimenez-Diaz, R., Rubio, C., Gomez-Lus, R., Baquero, F., Torres, C., 2001, Bacteriocin production in vancomycin- resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. Antimicrob Agents and Chemother, 45, 905–912.

Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. ve Torriani, S., 1992, The genus Leuconostoc. In: The Genera of Lactic Acid Baceteria, Eds: Wood, B.J.B. ve Holzapfel, W.H., Blackie Acedemic and Professional, London. pp.235-275.

Delves-Broughton J, Nisin and its use as a food preservative. 1990, Food Technol. 44: 100.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J. 1996, Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie van Leeuwenhoek, 69; 193-202.

De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. 1994, Bacteriocins of lactic acid bacteria. London, England: Blackie Academie & Professional.

Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi, S.-H., Doi, K., Ohmomo, S., Ogata, S., 2001, Isolation and characterization of enterocin SE-K4

produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. Biosci, Biotechnol Biochem. 65, 247– 253.

Eklund T, Organic Acids and Esters. "Gould, J.W. (ed). 1989, Mechanism of Action of Food Preservation Procedures. p. 161, Elsevier applied Science New York.

Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O., Hasselmann, C., 1998, Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by Enterococcus faecium WHE 81 isolated from cheese. J. Appl. Bacteriol. 85, 521– 526.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000, Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol Rev, 24; 85-106.

Erginkaya Z, Yurdakul NE, Karakaş A. 2007. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*'in starter ve probiyotik kültür özellikleri. GIDA, 32(3), 137-142.

Farias, M.E., Farias, R.N., de Ruiz Holgado, A.P., Sesma, F., 1996, Purification and N-terminal amino acid sequence of enterocin CRL 35, a Fpediocin-like_bacteriocin produced by Enterococcus faecium CRL 35. Lett in Appl Microbiol, 22, 417– 419.

Farias, M.E., Nunez de Kairuz, M., Sesma, F., Palacios, J., de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G., 1999, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin enterocin CRL35 during goat cheese making. Milchwis-senschaft 54, 30– 32.

Fimland, G. I., Blingsmo, O. R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I. F. and Nissen-Meyer, J. 1996, New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin like bacteriocin the C-terminal region is important for determing specificity. Appl Environ Microbiol, 62; 3313-3318.

Floriano, B., Ruiz-Barba, J.L. and Jimenez-Diaz, R. 1998, Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. Appl Environ Microbiol, 64; 4883-4890.

Flynn, S., van Sinderen, D., Thornton, G.M., Holo, H., Nes, I.F., Collins, J.K. 2002, Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118 anovel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. Microbiol, 148; 973-984.

Foulquie Moreno, M.R., Rea, M., Cogan, T., De Vuyst, L., 2003b, Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. Int J Food Microbiol, 81, 73– 84.

Foulquie Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. 2006, The role and application of enterococci in food and health. Int J Food Microbiol, 106,1–24.

Franz, C.M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel,W.H., 1996, Production and characterisation of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. Int. J. Food Microbiol. 29, 255–270.

Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. 1999, *Eterococci* at the crossroads of food safety. Review. Int J Food Microbiol, 47, 1–24.

Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. 2001, Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. Appl Environ Microbiol, 67(9), 4385–4389.

Franz, C.M., Grube, A., Herrmann, A., Abriouel, H., Starke, J., Lombardi, A., Tauscher, B., Holzapfel, W.H., 2002, Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. Appl Environ Microbiol, 68, 2550–2554.

Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. 2003, *Enterococci* in foods a conundrum for food safety. Review article. Int J Food Microbiol, 88, 105– 122.

Frazzon APG, Gama BA, Hermes V, Bierhals CG, Pereira RI, Guedes AG, d'Azevedo PA, Frazzon J. 2010, Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. World J Microbiol Biotechnol, 26, 365–370.

Galvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Mendez, E., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M., 1998, Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. Arch Microbiol, 171, 59–65.

Garde, S., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M., 1997, Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. Biotechnol Lett, 19, 1011– 1014.

Gardiner GE, Ross RP, Wallace JM, Scanlan, FP, Jagers PPJM, Fitzgerald GF, Collins, JK, Stanton, C.1999, Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of Cheddar cheese. J. Agric Food Chem, 47: 4907–4916.

Garver, K. I., & Muriana, P. M. 1993, Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. Int J Food Microbiol, 19(4), 241–258.

Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, Ch.P., Hall, L.R., Clewell, D.B., 1994, Genetic structure of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. J Bacteriol, 176, 7335– 7344.

Giraffa, G., Picchioni, N., Neviani, E., Carminati, D., 1995, Production and stability of an *Enterococcus* faecium bacteriocin during cheese Taleggio cheese making and ripening. Food Microbiol. 12, 301– 307.

Giraffa, G., Picchioni, N., Neviani, E., Carminati, D., 1995b, Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during Taleggio cheese-making and ripening. Food Microbiol 12, 301– 307.

Gilliland S E. 1986, Role of Starter Culture Bacteria in Food Preservation. "Gilliland, S.E. (ed): Bacterial Starter Cultures for Foods." p. 175 CRC Press, Inc. Boca Raton Florido.

Gonzalez, L., Sandoval, H., Sacristan, N., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. 2007, Identification of lactic acid bacteria isolated from Genesto cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. Food Control, 18, 716–722.

Güngör M. 1982, Anseptik ve Dezenfektan Maddelerin Genel Kimyasal ve Farmakolojik Özellikleri. "E. Çetin (ed) Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizasyon işlemleri ve Hastanede Uygulanışları" s. 246, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Rektörlük No: 2919, Fakülte No: 137, İstanbul Tıp Fak. Yayını.

Gürses M, Erdogan A. 2006, Identification of lactic acid bacteria isolated from Tulum cheese during ripening period. Int J Food Prop, 9, 551–557.

Hajikhani R, Beyatlı Y, Aslım B. 2007, Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. Int J Dairy Technol, 60(2), 105-108.

Hammes, W.P. ve Vogel, R.F., 1992, The genus Lactobacillus. In: The Genera of Lactic Acid Baceteria, Eds: Wood, B.J.B., ve Holzapfel, W.H., Blackie Acedemic and Professional, London. pp.19-54.

Hardie, J.M. ve Whiley, R.A., 1992, The genus *Streptococcus*. In: The Genera of Lactic Acid Baceteria, Eds: Wood, B.J.B., ve Holzapfel, W.H., Blackie cedemic and Professional, London. p.114.

Hauge, H.H., Mantzilas, D., Eijsink V.G.H. and Nissen-Meyer J. 1999, Membran – mimicking entities induce structuring of the two peptite bacteriocins plantaricin E/F and J/K. J Bacteriol, 181; 740-747.

Herranz, C., Mukhopadhyay, S., Casaus, P., Martınez, J. M., Rodrıguez, J. M., Nes, I. F., et al. 1999, Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two Enterococcus faecium-like strains isolated from fermented sausages. Curr Microbiol, 39, 282–290.

Hoffman ME, Meneghini R: 1979, Action of Hidrogen Peroxide on Human Fibroblast in Culture. "Alıntı: Banwart, G.J: Basic Food microbiology" p. 773, AVI Book, Publihed by Von Nosran reinhold, New York (1989).

Holzapfel, W. ve Stiles, M.E., 1997, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol, 36, 1-29.

Holzapfel WH, Haberer P, Snel, J, Schillinger U, Veld JHJ.1998, Overview of gut flora and probiotics. Int J Food Microbiol, 41: 85–101.

Hoover, D.G. and Steenson, L.R. 1993, Bacterocins of lactic acid bacteria. Academic Press Inc, San Diego, CA.

Hugas M, Pagés F, Garriga M, Monfort JM. 1998, Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of Listeria in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. Food Microbiol 15:639-50.

Hugas M, Garriga M, Aymerich MT. 2003, Functionality of enterococci in meat products. Int J Food Microbiol, 88, 223-233.

İşleroğlu H, Yıldırım Z, Demirpençe Y, Yıldırım M. 2008, Enterokoklar: Biyokimyasal, fizyolojik ve fonksiyonel özellikleri ile patojenitesi. Derleme makale. Akademik Gıda, 6(3), 16-26.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995, Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiol Rev, 59; 171-200.

Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. and Wollman, E. 1953, Définition de quelques termes relatifs a la lysogénie. Annales De l' Institut pasteur, 84; 222-224.

Jay J M. 1982, Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Environ. Microbiol. 44:525.

Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L. and Cathcart, D.P. 1995, Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptites. Appl Environ Microbiol, 61; 4459–4463.

Jones MV. 1989, Modified Atmospheres. "Gould, J.W. (ed): Mechanism of Action of Food Preservation Procedures".p.247, elsevier Applied Science, New York.

Joosten, H.M.L.J., Gaya, P., Nunez, M., 1995, Isolation of tyrosine decarboxylaseless mutants of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* strain and their application in cheese. J Food Prot, 58, 1222– 1226.

Juven BJ, Meinersmann RJ, Stern NJ. 1991, Antagonistic effects of Lactobacilli and Pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry, J.Appl. Bact. 70:95.

Juven BJ, Schved F, Lindner P. 1992, Antagonistic compounds produced by a chicken interstinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. J Food Protect. 55: 157.

Kato, T., Matsuda, T. and Ogawa, E. 1994, Plantaricin 149, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. J Ferment Bioeng, 77; 277–282.

Khan H, Flint S, Yu PL. 2010, Enterocins in food preservation. Int J Food Microbiol, 141, 1–10.

Kivanç, M., 1990, Antagonistic action of lactic cultures toward spoilage and pathogenic microorganisms in food. Die Nahrung, 34: 273-277

Klaenhammer TR. 1988, Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70:337.

Klaenhammer, T.R. 1993, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiol Rev, 12; 39-86.

Klein G. 2003, Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. Review. Int J Food Microbiol, 88, 123-131.

Koluman A, Akan LS, Cakiroglu FP. 2009, Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. Food Control, 20, 281–283.

Laukova, A. and Czikkova, S. 1998, Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. Lett Appl Microbiol, 26; 215-218.

Laukova, A., Czikkova, S., 1999, The use of enterocin CCM 4231 in soymilk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiol. 87, 182–186.

Laukova, A., Czikkova, S., Laczkova, S., & Turek, P. 1999, Use of enterocin CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented Hornad salami. Int J Food Microbiol, 52(1–2), 115–119.

Laukova, A., Czikkova, S., 2001, Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on ‘‘bryndza’’, a traditional Slovak dairy product from sheep milk. Microbiol Res, 156, 31– 34.

Laukova, A., Vlaemynick, G., Czikkova, S., 2001, Effect of enterocin CCM 4231 on *Listeria monocytogenes* in Saint-Paulin cheese. Folia Microbiologica 46, 157–160.

Leroy, F. and De Vuyst, L., 2002, Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. Int J Food Microbiol, 72, 158-164.

Linnett PE, Strominger JL. 1973, Addtional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 4: 231.

Lueck E: Antimicrobial food addtives. 1980, Springer-Verlag. Berlin.

Lyon W. J., Glatz B. A. 1991, Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. Appl. Environ. Microbiol. **57**:701–706.

Maisnier-Patin, S., Forni, E., Richard, J., 1996, Purification, partial characterisation and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. Int. J. Food Microbiol. 30,255– 270.

Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M.C., Mollet, B. and Poolman, B. 1997, Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin that functions wihtout a receptor. J Biol Chem, 272; 14277-14284.

Marshall R.T., 1992, Standart Methods for The Examination of Dairy Products, 16th ed., APHA, Washington, 532-539.

Martinez-Bueno, M., Maqueda, M., Galvez, A., Samyn, B., van Beeumen, J., Coyette, J., 1994, Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. J Bacteriol, 176, 6334– 6339.

McCormick, J.K., Poon, A., Sailer, M., Gao, Y., Roy, K.L., Mc-Mullen, L.M., Vederas, J.C., Stiles, M.E. and van Belkum, M.J. 1998, Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C an antibotulinal two peptite bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATTC 43754. Appl Environ Microbiol, 64; 4757-4766.

Muguerza B, Ramos M, Sanchez E, Manso MA, Miguel M, Aleizandre A, Delgado MA, Recio I. 2006, Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus* faecalis strains isolates from raw milk. Int Dairy J,16:61-69.

Naidu, A.S., Unal, R. ve Tulpinski J., 2006, Bacteriocins: Antimicrobial Activity nd Applications. In: Food Biotechnology, Eds. Shetty K., Paliyath, G., Levin, R.A.P.E. Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996, Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70; 113-128.

Nes, I.F. and Holo, H. 2000, Class II antimicrobial peptites from lactic acid bacteria. Biopolymers, 55; 50-61.

Nickerson jT, Sinskey AJ. 1972, Microbiology of Food and Food Processing. p. 234, American elsevier Publishing Company, New york.

Nieto-Arribas P, Seseña S, Poveda JM, Chicón R, Cabezas L, Palop L. 2011, *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. Food Microbiol, 28, 891-899.

Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H., 2003, Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Appl Environ Microbiol, 69, 2975–2984.

Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K. and Nes, I.F. 1992, A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptites. J Bacteriol, 174; 5686-5692.

Nunez, M., Rodriguez, J.L., Garcia, E., Gaya, P., Medina, M., 1997, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. J. Appl. Microbiol. 83, 671– 677.

Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M. and Nakanishi, K. 2000, Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. J Appl Microbiol, 88; 81-89.

Oscariz, J.C. and Pisabarro, A. 2001, Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Review Article. Springer-Verlag and a system for enumerating models (SEM), 12; 123-127.

O'Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002a, Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie, 84; 593-604.

Oumer, B.A., Gaya, P., Fernandez-Garcia, E., Marciaca, R., Garde, S., Medina, M., Nunez, M., 2001, Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. J Dairy Res, 68, 117–129.

Özdemir N. 1982, Kimyasal Dezenfektanlar. "E. Çetin (ed) Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizasyon işlemleri ve Hastanede Uygulanışları" s. 246, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Rektörlük No: 2919, Fakülte No: 137, İstanbul Tıp Fak. Yayını.

Özmen Toğay S, Çelebi Keskin A, Açık L, Temiz A. 2010, Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of Enterococcus faecalis and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. J Appl Microbiol, 109, 1084–1092.

Parente, E. and Hill C. 1992, Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. J Food Prot, 55; 497-502.

Parente, E. and Ricciardi, A. 1999, Production recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl Microbiol Biotechnol, 52; 628-638.

Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. 1993, Microbiology Concepts and Applications. p. 896, International Edition, McGraw-Hill, Inc. New York .

Piard, J.-C. and Desmazeaud, M. 1991, Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. Lait. 71: 525-541.

Piard, J-C, Muriana PM, Desmazeaud MJ and Klaenhammer TR. 1992, Purification and partial characterisation of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin

produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. Appl. Environ. Microbiol. 58: 279–284.

Qi, F., Chen, P. and Caufield, P.W. 2001, The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lanthibiotic mutacin I and a nonlanthibiotic bacteriocin, mutacin IV. Appl Environ Microbiol, 67; 15-21.

Ramseier HR. 1960, The action of nisin on *Clostridium butyricum*. Arch. Microbiol. 37: 57.

Ray, B. and Daeschel, M.A. 1992a, Food biopreservatives of microbial origin. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Ray, B. 1992b, The need for biopreservatives. In food biopreservatives of microbial orijin. 1-23, Boca Raton, FL.

Ray, B., 2001, Fundamental Food Microbiology. CRC Press Boca Raton. pp.201-210.

Richelsen B, Kristensen K, Pedersen SB. 1996, Long-term (6 months) effect of a new ferment ed milk product on the level of plasma lipoproteins: a placebo-controlled and double blind study. European Journal of Clinical Nutrition 50,:811– 815.

Rodriguez, E., Arques, J.L., Gaya, P., Nunez, M., Medina, M., 2001, Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. J Dairy Res 68, 131– 137.

Rodriguez, O. 2006, Aplicación de nuevas tecnologías de conservación basadas en el hielo líquido en la mejora de la calidad microbiológica de los productos marinos. PhD Thesis. Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P. de Vos, W.M. and Siezen, R.J. 1995, Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptite nisin by protein engineering. Appl Environ Microbiol, 61; 2873-2878.

Rosenkranz HS: 1973, Sodium Hypochlorite and Sodium Perborate, Preferentical Inhibitors of DNA Polymerase-Deficent Bacteri. "Alıntı: Banwart, G.J: Basic Food Microbiology" p. 773, AVI Book, Von Nosrand Reinhold, New York (1989).

Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, Pei YC, Valdez GF. 1999, Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. European Food Research and Technology 209:305–307.

Rousis, I.G., 1994, Dairy lactic acid bacteria physiology and growth. Chimica chronica, 23, 137-153.

Sabia, C., de Niederhausern, S., Messi, P., Manicardi, G., Bondi, M., 2003, Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control

of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages (‘‘cacciatore’’). Int J Food Microbiol, 87, 173–179.

Sağduyu H. 1982, Dezenfektan Maddelerin Genel Kullanımı Özellileri. “E. Çetin (ed): Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizas yon işlemlerive Hastanede Uygulanışları” s. 246, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Rektörlük No: 2919, Fakülte No: 137, İstanbul Tıp Fak. Yayını.

Sanchez-Hidalgo, M., Maqueda, M., Galvez, A., Abriouel, H., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M. 2003, The genes coding for enterocin EJ97 are located on a conjugative plasmid. Appl Environ Microbiol, 69, 1633–1641.

Sánchez Valenzuela A, Ben Omar N, Abriouel H, López RL, Veljovic K, Cañamero MM, Milan Topisirovic KL, Gálvez A. 2009, Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. Food Control, 20, 381–385.

Sarantinoupoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2002b, Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. Int. J. Food Microbiol. 72, 125– 136.

Schillinger, U. and F.K. Lucke, 1989, Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol., 55: 1901-1906.

Schillinger, U. 1990, Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biotechnology and food Safety. eds. Bills, D.D. and Kung, S., Butterworth-Heinemann, 55-74, Boston.

Schlegen HG. 1986, General Microbiology. p. 587, Cambri University Press, Cambridge.

Shapero M, Nelson DA, Labuza TP. 1978, Ethanol inhibition of *Stayhylococcus aureus* at limited water Activity. J. Food Sci. 43: 1467.

Shelef AA. 1994, Antimicrobial Effects of Lactates: A Review, J Food Protect.57: 445.

Sırıken B, Ozdemir M, Yavuz H, Pamuk S. 2006, The microbiological quality and residual nitrate/nitrite levels in Turkish sausage (soudjouck) produced in Afyon Province, Turkey. Food Control, 17, 923–928.

Siegers, K., Heinzmann, S. and Entian, K.D. 1996, Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modification of its prepeptite occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. J Biol Chem, 271; 12294-12301.

Simonetta, A.C., Moragues de Velasco, L.G., Frison, L.N., 1997, Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. Lett. Appl. Microbiol. 24, 139–143.

Steel, L.J., 1998, Genetics and Metablism of Starter Cultures. In: Applied Dairy Microbiology. Eds. Marth, E.H., ve Steel, J.L., Marcel Dekker, Inc. pp.173-177.

Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. 1997, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol, 36,1–29.

Sulzer, G., Busse, M., 1991, Growth inhibition of Listeria spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. Int J Food Microbiol 14, 287– 296.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976, Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriology Rev, 40; 722-756.

Tan KH, Gill CO. 1982, Physiological basis of CO2 inhibition of meat spoilage bacterium, Pseudomonas fluorescens. Meat Science 7:9.

Teuber, M., 1992, The genus Lactococcus. In: The Genera of Lactic Acid Baceteria, Eds. Wood, B.J.B., ve Holzapfel, W.H., Blackie Acedemic and Professional, London. pp.174-234.

Toit, M.Du., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T. and Holzapfel, W.H. 2000, Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. J Appl Microbiol, 88; 482-494.

Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y., 1996, Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative element pYI17. J Bacteriol, 178, 3585– 3593.

Trotter, M., McAuliffe, O.E., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Ross, R.P. and Coffey, A. 2004, Variable bacteriocin production in the commercial starter *Lactococcus lactis* DPC4275 is liked to the formation of the cointegrate plasmid pMRC02. Appl Environ Microbiol, 70; 34-42.

Tuncer Y. 2009, Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. Afr J Biotechnol, 8(24), 7008-7016.

Tümbay E. 1982, Dezenfektanların ve Antiseptiklerin Bakterisit Etkileri ve Etki Mekanizmaları. "E. Çetin (ed) : Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizasyon işlemleri ve Hastanede Uygulanışları" s. 246, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Rektörlük No: 2919, Fakülte No: 137,İstanbul Tıp Fak. Yayını.

Tunail N. 1999, Microflora of the Intestine/Biology of the Enterococcus spp. in; Encyclopedia of Food Microbiology. Robinson RK (chief ed), Academic Press, UK, pp 1365-1373.

Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B. and Hill, C. 2002, Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications. eds. Sizezen, R.J., Kok, J., Abee, T. and Schaafsma, G., Kluwer Academic Publishers, 165-185, Dordrecht.

Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G. 1989, Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. Appl Environ Microbiol, 55; 1187-1191.

Vignolo, G.M., Suriani, F., Holgado, A.P.R., Oliver, G. 1993, Antibacterial activity of Lactobacillus strains isolated from dry fermented sausages. J. Appl. Bacteriol., 75, 34–349.

Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P., Coppola, S., 1993, Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. J Appl Bacteriol, 74, 380– 387.

Volk WA, Wheeler M F. 1973, Basic Microbiology. p. 592, J.B. Lippincott Company. Philadelphia-Toronto .

von Wright A, Bruce A. 2003, Genetically modified microorganisms and their potential effects on human health and nutrition. Trends Food Sci Tech, 14, 264-276.

Xiraphi N, Georgalaki M, *et al.* 2008, Purification and characterization of a bacteriocin produced by Leuconostoc mesenteroides E131. Meat Sci. 80 (2): 194-203.

Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M., Okazaki, M., 2003, Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. Appl Environ Microbiol, 69, 5746– 5753.

Zajdel JK, Ceglowski P, Dobrzanski WT. 1985, Mechanism of action of Lactostrepcin 5, a bacteriocin Produced by *Streptococcus cremoris* 202. Appl. Environ. Microbiol. 49: 969 (1985).

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zeynep NALVURAN
Uyruğu : TC
Doğum Yeri ve Tarihi : Konya-1988
Telefon :
Faks :
e-mail :

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**Karatay SDMP Anadolu Lisesi**	**2006**
Üniversite	:	**Selçuk Üniversitesi**	**2010**
Yüksek Lisans	:		
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR