

## 1. GİRİŞ

Günümüzde tüketicilerin minimum miktarda işlenmiş gıdalara yönelik tercihlerinin artması kimyasal koruyucuların gıdalarda kullanımlarını kısıtlamaya başlamıştır. Bu nedenle gıdalarda biyokoruyucuların kullanım oranları gün geçtikçe artmaktadır. Biyokoruma yöntemleriyle hem gıdanın depolama ömrü hem de güvenirliliği artmaktadır. Biyokoruma yöntemlerinden birisi laktik asit bakterilerini starter kültür olarak kullanmaktır.

Gıdalarda sadece gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etmek ve/veya raf ömrünü uzatmak için kullanılan ve gıdanın duyuşal özelliklerinde değişime sebep olmayan antogonistik kültürle koruyucu kültürler denir. Laktik asit bakterilerinin antogonizması diğer mikroorganizmalarla besin öğeleri için yarışarak ya da organik asitler (asetik, propiyonik ve laktik asit gibi), hidrojen peroksit, antimikrobiyal enzimler, diasetil ve bakteriyosinler gibi bir veya daha fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşikler üretmelerinden kaynaklanmaktadır (Devlieghere et al., 2004).

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen protein yapısında antimikrobiyal bileşikler olup duyarlı bakterilere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik etki göstermektedirler (Jack et al., 1995). Bunlar doğal antibiyotik olarak nitelenmekle birlikte, klasik antibiyotiklerden farklı olarak mide ve ince bağırsaklardan geçerken proteazlar tarafından aminoasitlere parçalanmaktadırlar. Bu nedenle vücutta absorbe edilmezler ve kalın bağırsak florasına ulaşamazlar. Doğal kaynaklı olmaları, insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve korunacak gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etme özellikleri ile bakteriyosinler son yıllarda üzerinde çok fazla çalışılan bir konu haline gelmiştir (Banwart, 1981; Geinsen et al., 1992; Howard et al., 1993).

Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak tercih edilmeleri sonucunda süt ürünleri, et ürünleri, konserve gibi birçok gıdanın biyolojik olarak

korunması da sağlanabilmektedir. Özellikle patojen ve bozulma etkeni mikroorganizmalar üzerine etkili olan bakteriyosinler daha fazla uygulama alanı bulmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin starter kültürler olarak fermente gıdaların muhafazasında kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır (Lucke and Earnshaw, 1991; Geisen et al., 1992).

Kullanımına yasal açıdan bir gıda katkı maddesi olarak izin verilen ilk bakteriyosin *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisindir (FDA 1988). Nisin ilk kez İngiltere’de bir gıda koruyucusu olarak kabul edilmiş ve krem peynirlerde kullanımına izin verilmiştir. Bugün yaklaşık 50 ülkede sağlık açısından güvenli bir gıda koruyucusu olarak kabul edilmiş ve birçok gıda çeşidinde kullanılmaktadır (Hoover, 1993).

Bu çalışmada yöresel beyaz peynirden farklı bazı bakteriler üzerine inhibör etkisi olduğu belirlenen bir bakteri izole edilmiştir. Araştırmanın amaçları (i) izole edilen bakterinin tanısının yapılması, (ii) izolatin ürettiği inhibitör maddenin fiziko-kimyasal özelliklerinin (pH’ya, ısıl işleme, enzimlere, depolama koşullarına, bazı organik çözücülere, deterjanlara ve kimyasallara karşı duyarlılığı), (iii) antimikrobiyal spektrumunun ve (iv) üretimini etkileyen faktörlerin (besiyerinin başlangıç pH’sı, inokülüm miktarı, inkübasyon sıcaklığı, gelişme fazı, besiyeri bileşimi) belirlenmesi ve (v) tuzla çöktürme işleminden sonra trisin-SDS-PAGE ile molekül ağırlığının saptanmasıdır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2. 1. BAKTERİYOSİNLERİN TARİHÇESİ VE TANIMI

Pasteur ve Joubert (1877) farklı bakteriler arasında antagonistik ilişkileri ilk kez, idrarda bulunan bazı bakterilerin *Bacillus anthracis*'e karşı inhibitör etkiye sahip olduklarını ortaya koyarak belirlemişlerdir. Gratia (1925), *E. coli* (deneysel infeksiyonlarda virülant suş V)'nin sıvı besiyerinde diyaliz edilebilen, ısıya dayanıklı ve yüksek dilüsyonlarda *E. coli*'nin gelişimini inhibe eden bir antibiyotik madde ürettiğini bildirmişlerdir. Daha sonra bu maddeye kolisin V denilmiştir. Laktik asit bakterileri (LAB) arasında antagonistik ilişkiler ise ilk kez Whitehead (1933) tarafından peynir üretimi sırasında belirli sütlerde bazı laktik kültürlerin neden normal olarak gelişemediği araştırılırken, diğer çoğu LAB gelişimini inhibe eden bir Gram pozitif Streptococcus suşunun izole edilmesi ile belirlenmiştir.

Bakteriyosin tanımı ilk kez Jakob et al. tarafından 1953 yılında yapılmıştır. Bu tanım farklı türler arası antagonistik ilişkiler ve kolisin proteinlerini kapsamaktaydı. Daha sonra yapılan çalışmalarla buna benzer çok fazla madde bulununca terimin kapsamı da genişletilmiştir (Eckner, 1992).

Tagg et al. (1976)'un yaptıkları tanıma göre bakteriyosinler, protein tabiatında antagonistik maddeler olup sınırlı sayıda bakteriye, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip bileşiklerdir.

## 2. 2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ VE BAKTERİYOSİNLERİ

### 2. 2. 1. Laktik Asit Bakterileri

Gıdalarla laktik asit bakterilerinin (LAB) ilişkileri bilim adamlarının dikkatini çekmiş ve 1857’de Pastör tarafından laktik asit fermantasyonunu gerçekleştirdikleri ortaya konmuştur. Peynir ve ekşi süt üretimi için starter kültürlerin kullanımı 1890’da Weigmann ve Storch tarafından eşzamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu keşifle birlikte gıda fermantasyonlarının endüstrileşmesinin yolu açılmıştır (Stiles et al., 1997).

Bir grup olarak LAB’nin ilk tanımı, koliform bakterileri de kapsayan, sütü fermente ve koagüle etme yeteneklerine dayandırılmıştır. Beijerinck tarafından 1901 yılında koliformlar bu grup içerisinde çıkarılmıştır (Stiles et al., 1997). Daha sonra Orla-Jensen (1919) “gerçek laktik asit bakterileri”nin gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, çubuk ve koklar şeklinde, karbonhidratları ve yüksek alkollerini fermente ederek genellikle laktik asit oluşturan doğal bir grup olduklarını ifade etmişlerdir.

Bakteriyal taksonomiye klasik yaklaşım morfolojik ve fizyolojik özelliklere dayanır. Bu yaklaşım hücre duvarı kompozisyonu, hücresel yağ asitleri, isoprenoid quinonlar ve hücrelerin diğer karakteristikleri ile genişletilmiştir. DNA’nın % G+C miktarı, gen ürünlerinin elektroforetik özellikleri, DNA:DNA hibridizasyon çalışmaları, ribozomal RNA (rRNA)’nın sekansı gibi moleküler karakteristikler önemli taksonomik araçlar haline gelmiştir. Bu teknikler LAB’nin taksonomisinde çarpıcı değişikliklere neden olmuştur.

Günümüzde gıda ile ilişkisi bulunan LAB, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* gibi cinslerin türlerini kapsamaktadır (Stiles et al., 1997).

LAB “food-grade” organizmalar olarak kabul edilirler ve koruyucu kültürlerin özelliklerini taşırlar. Organik asitler, hidrojen peroksit, antimikrobiyal enzimler ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal olarak aktif metabolitlerin biri veya birkaçının üretimi ile diğer mikroorganizmaları inhibe ederek antagonistik etki gösterirler (Työppönen et al., 2003; Devlieghere et al., 2004) (Tablo 2. 1.).

Tablo 2.1. LAB'nin geniş inhibitör spektrumlu antimikrobiyal ürünleri (Työppönen et al., 2003)

Ürün	Üretici
Laktik asit	Tüm LAB
Asetik asit	Heterofermantatif LAB
Hidrojen peroksit	Tüm LAB
Alkoller	Heterofermantatif LAB
Karbondioksit	Heterofermantatif LAB
Diğer düşük moleküler ağırlıklı bileşikler	
Diasetil	<i>Lactococcus</i> spp.
Reuterin	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Bakteriyosinler	
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>
Sakasin P	<i>Lactobacillus sake</i>
Sakasin K	<i>Lactobacillus sake</i>
Kurvasin A/sakasin A	<i>Lactobacillus curvatus</i>
Karnobakteriyosin A	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Pediosin AcH/PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	<i>Pediococcus parvulus</i>
Leukosin A/B-Talla	<i>Leuconostoc gelidum</i>
	<i>Leuconostoc carnosum</i>
Mesenterisin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Enterosin A	<i>Enterococcus faecium</i>
Enterosin P	<i>Enterococcus faecium</i>
Enterosin B	<i>Enterococcus faecium</i>

## 2. 2. 2. LAB Bakteriyosinleri

### 2.2.2.1. Sınıflandırılmaları

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, doğal olarak mikroorganizmalar tarafından üretilen ve ribozomal olarak sentezlenen, küçük katyonik amfifilik, antimikrobiyal peptidlerdir. Spektrum ve aktivite mekanizması, moleküler yapı ve kütle, termostabilite, aktivitenin pH aralığı ve genetik determinantlar açısından farklılık gösteren geniş grup içinde yer alırlar.

Yapısal, fizikokimyasal ve moleküler özellikler temelinde LAB bakteriyosinleri 3 ana gruba ayrılır (O'Sullivan et al., 2002; Bauer and Dicks, 2005).

Sınıf I bakteriyosinleri (lantibiyotikler), küçük moleküler ağırlıklı (<5 kDa) membran aktif peptitler olup anormal aminoasitler olan lanthionin ve dehidre olmuş amino asitler içermektedirler (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1993).

Lantibiyotikler tip A ve tip B olmak üzere iki alt grupta incelenmektedir. Tip A lantibiyotikler esnek, lineer, uzun ve net bir pozitif yüke sahiptirler. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin bu grubun en belirgin örneğidir. Grubun diğer üyeleri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 tarafından üretilen nisin benzeri peptit subtilin ve *Staphylococcus epidermidis* tarafından üretilen epidermin, Pep5 ve epilansin K7'dir. Rijit ve globüler olan tip B lantibiyotikleri yaklaşık 20 amino asit içerirler ve yüksüz ya da negatif yüklüdürler. Tip B lantibiyotiklere sinnamisin, mersasidin, aktagardin örnek olarak verilebilir (Bauer and Dicks, 2005).

Sınıf II bakteriyosinleri, küçük moleküler ağırlıklı olmalarına karşın lantibiyotikler içermemekte ve 3 alt grup altında toplanmaktadırlar: (i) grup IIa listeria'ya karşı aktif ve N-terminalinde Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys amino asit dizisini içermektedir. Lantiyonin içermeyen diğer bakteriyosinler ya sadece 1 ya da hiç sistein kalıntısı

içermezken IIa bakteriyosinleri disülfid köprüleriyle bağlı en az 2 sisteine sahip sistibiyotiklerdir. Disülfid bağları bu bakteriyosinlerin aktivitesi için çok önemlidir. Örnek olarak pediosin PA-1, pediosin AcH, sakasin A, mesenterisin Y105, diversin V41 ve leusin A verilebilir. Grup IIb bakteriyosinlerinin aktivite gösterebilmeleri için genellikle iki farklı peptit gerekmektedir. Grup IIc bakteriyosinlerine thiol'la aktif edilen peptitler denilmektedir (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1993; Ennahar et al., 1999, 2000; İşleroğlu ve ark., 2005).

Sınıf III bakteriyosinleri büyük molekülü (>30 kDa), ısıya dayanıksız proteinlerdir. Helvetisin J, helvetisin V-1829, asidophilus A, laktosin A ve B bu grup içerisinde yer almaktadır (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1993; Jack et al., 1995; Montville and Chen, 1998). Tablo 2.2'de farklı sınıflara ait bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar verilmiştir (Chen and Hoover, 2003).

Tüm bu sınıflara ait bakteriyosinler genellikle tek aktif peptitler şeklinde bulunurlar. Fakat aktivitenin tamamı için gerekli olan iki peptit sistemleri de gittikçe gelişmektedir. İki peptit sistemlerinde bir veya her iki peptit de tek başına inaktif iken kombinasyonları durumunda antimikrobiyal etkinin arttığı gözlenmiştir. Bu iki peptitli bakteriyosinlerde aynı operon üzerinde yer alan ve iki peptiti de kodlayan "open reading frame" (ORF) için sadece bir immünite proteinine ihtiyaç duyulur. Tablo 2.3'de farklı sınıflara dahil olan iki peptitli bakteriyosinler gösterilmiştir (Garneau et al., 2002).

#### **2.2.2.2. Biyosentezleri**

Bakteriyosin üretimi ve immüniteyi kodlayan genler, plazmid, kromozom ve her ikisi veya transposon üzerinde bulunabilmektedir. Bakteriyosin üretiminin plazmid tarafından gerçekleştiğini göstermek için fenotipik delil, fiziksel delil ve genetik olarak ispat edilmesi gerekmektedir (Montville and Winkowski, 1997). Tablo 2.4'de plazmid ve kromozom üzerinde kodlanan bakteriyosinlere bazı örnekler verilmiştir (Klaenhammer, 1993; Nettles and Barefoot, 1993; Jack et al., 1995).

Tablo 2.2. Bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar (Chen and Hoover, 2003)

Bakteriyosin	Üretici Mikroorganizma
<b>Sınıf I</b>	
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>
Lactosin S	<i>Lactobacillus sake</i>
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Laktisin 481	<i>Lactococcus lactis</i>
Mersasidin	<i>Bacillus subtilis</i>
Sinnamisin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Ankovenin	<i>Streptomyces spp.</i>
Duramisin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
<b>Sınıf II</b>	
Pediosin PA-1/AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Sakasin A	<i>Lactobacillus sake</i>
Leukosin A-UAL 187	<i>Leuconostoc gelidum</i>
Mesenterisin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Enterosin A	<i>Enterococcus faecium</i>
Diversin V41	<i>Carnobacterium divergens</i>
Laktokoksin G	<i>Lactococcus lactis</i>
Laktasin F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Plantarisin A	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Asidosin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Karnobakteriosin	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Enterosin P	<i>Enterococcus faecium</i>
Enterosin B	<i>Enterococcus faecium</i>
<b>Sınıf III</b>	
Helvetisin J	<i>Lactobacillus helveticus</i>

Tablo 2.3. Lantibiyotik ve lantibiyotik olmayan iki peptidli amino asitler (Garneau et al., 2002)

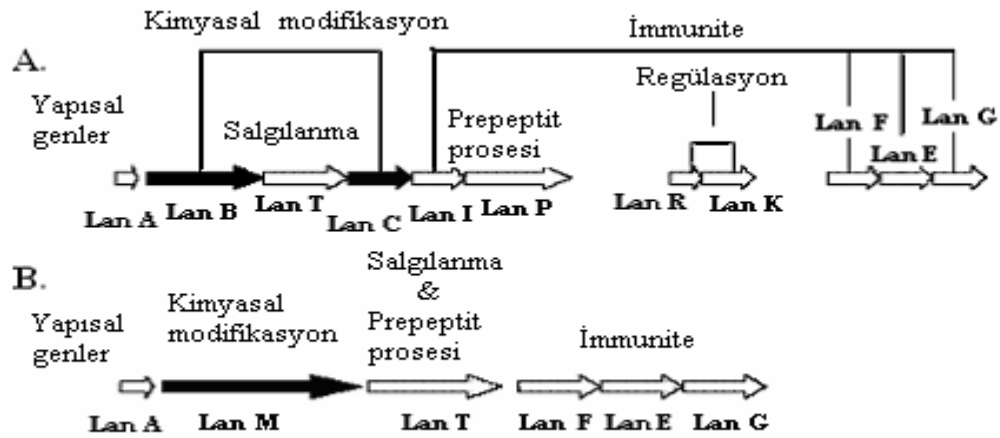
Bakteriyosin	Üretici suş
Lantibiyotik olanlar	
Sitolisin	<i>Enterococcus faecalis</i>
Laktisin 3147	<i>Lc. lactis</i> DPC3147
Plantarisin W	<i>Lb. plantarum</i> LMG 2379
Stafilokoksin C55	<i>Staphylococcus aureus</i> C55
Lantibiyotik olmayanlar	
ABP-118	<i>Lb. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> UCC118
Brokhosin-C	<i>Bacillus campestris</i> ATCC 43754
Enterosin 1071	<i>Enterococcus faecalis</i> BFE 1071
Enterosin L50	<i>Enterococcus faecium</i> L50
Laktasin F	<i>Lb. johnsonii</i> VPI11088
Laktosin 705	<i>Lb. casei</i> CRL 505
Laktokoksin G	<i>Lc. lactis</i> LMG 2081
Laktokoksin MN	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4
Leukosin H	<i>Leuconostoc</i> MF215B
Mutasin IV	<i>Streptococcus mutans</i> UA 140
Plantarisin EF	<i>Lb. plantarum</i> C-11
Plantarisin JK	<i>Lb. plantarum</i> C-11
Plantarisin S	<i>Lb. plantarum</i> LPCO10
Termofilin 13	<i>Streptococcus thermophilus</i> SFi13

Tablo 2.4. Plazmid ve kromozom üzerinde kodlanan bazı bakteriyosinler

Plazmid	Kromozom
Laktokoksin	Nisin
Diplokoksin	Helvetisin J
Pediosin A	Laktasin B
Pediosin PA-1	Plantarisin A
Pediosin Ach	Sakasin 674
Karnobakteriyosin A ve B	
Pediosin SJ-1	
Sakasin A	
Laktisin 3147	
Enterosin 226 NWC	

Çoğu bakteriyosinin yapısal genleri operona benzer bir yapı gösterir (Klaenhammer, 1993). Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin üretiminin gerçekleştirilebilmesi için dört farklı gene ihtiyaç vardır: (i) prepeptiti kodlayan bir yapısal gen, (ii) immünite geni, (iii) ABC-taşıyıcısını kodlayan gen ve (iv) bakteriyosinin dışarı taşınmasında gerekli olan aksesuar proteinini kodlayan gen (Garneu et al., 2002). Bütün operonlar bütün genleri içermediği gibi her bir operonda genlerin organizasyonu da aynı değildir. Fakat birçok benzerlikleri taşımaktadırlar (Montville and Winkowski, 1997).

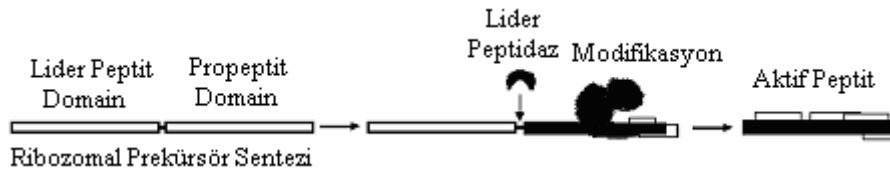
Bir lantibiyotik biyosentezi prelantibiyotik oluşumu, dehidrasyon ve çapraz bağlanma (kimyasal modifikasyon), lider peptidin parçalanması ve salgılanmasını içermektedir. Lantibiyotiklerde 2 tür genetik organizasyon belirlenmiştir (Şekil 2.1). Nisin, epidermin, subtilin ve Pep 5 lantibiyotikleri LanB ve LanC enzimleri tarafından modifiye edilirken, laktisin 481, laktosin S, sitolisin ve mersasidin, LanM enzimi tarafından modifiye edilmektedir (Kopenon, 2004). Şekilde de görüldüğü üzere generik isimlendirme bütün lantibiyotikler için kullanılmaktadır. Bunlar prekürsör peptit LanA, spesifik modifikasyonları gerçekleştiren LanB, C ve M enzimleri, lider peptidin uzaklaştırılmasından sorumlu olan LanP proteazı, ABC sistemle peptidin taşınmasını sağlayan LanT, biyosentezi regüle eden LanR ve K proteinleri ve bağışıklık sağlayan LanI ve LanFEG'dir (Sahl et al., 1995; Kopenon, 2004; Erinç ve ark., 2005; Takala, 2005).



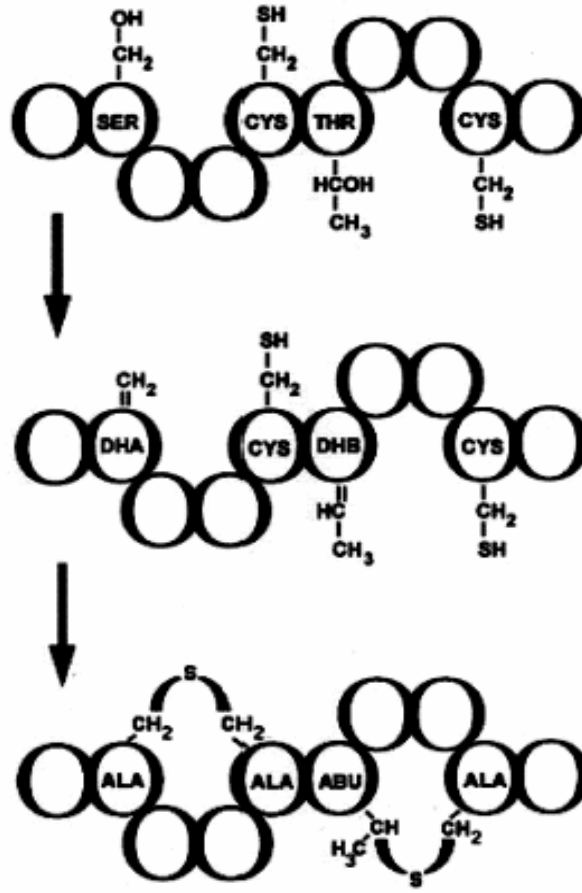
Şekil 2.1. Lantibiyotiklerin gen organizasyonu

Prelantibiyotikler biyolojik olarak inaktif olup N-terminalinde lider peptit ve C-terminalinde propeptit içermektedirler. Propeptit domain lider peptidin proteolitik parçalanmasından sonra aktifleşmekte ve bunu takiben modifikasyona uğrayarak olgun lantibiyotiğe dönüşmektedir (Kaiser et al., 1998) (Şekil 2.2). Lantibiyotiklerde propeptit sistein açısından oldukça zengin olmasına karşın lider peptit sistein içermemektedir. 23–30 amino asit kalıntısından oluşan lider peptit genellikle net negatif yüke ve şu fonksiyonlara sahiptir: (i) Üretici bakteriyi yüksek konsantrasyondaki intraselüler bakteriyosine karşı korumak, (ii) biyosentezde propeptidin olgunlaşma ve taşıma proteinlerine yönelmesini ve (iii) propeptidin domaini ile reaksiyona girerek enzim-substrat interaksiyonu için uygun konformasyonun oluşmasını sağlamaktır (Sahl et al., 1995; McAuliffe et al., 2001).

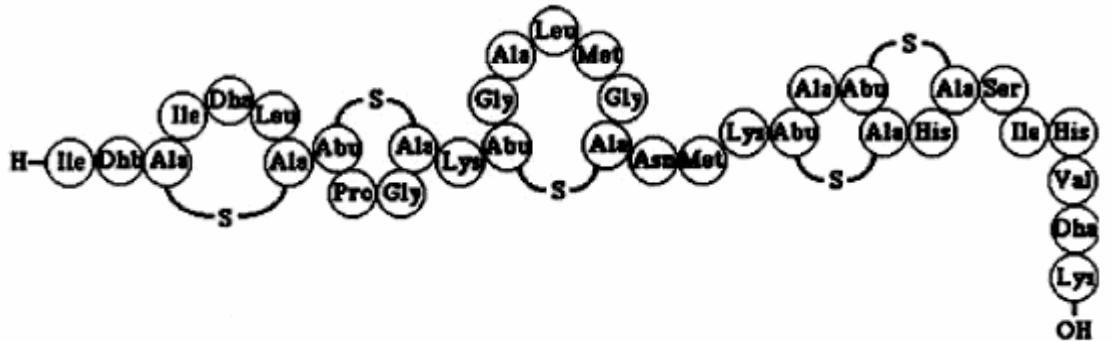
*lanB*, *lanC* ve *lanM* genlerinin ürünleri olan enzimler prelantibiyotiklerin post-translasyonel modifikasyonunda rol oynamaktadırlar. Propeptit spesifik hidroksil amino asitlerin (serin ve treonin) dehidrasyonu ve bu dehidrasyon sonucunda oluşan dehidroalanin (Dha) ve dehidrobütirin (Dhb) arasında oluşan tiyoeter köprü oluşumunu içeren post-translasyonel modifikasyona girmektedir (Guder, 2000; McAuliffe et al., 2001). Dha yer aldığı zaman oluşan anormal çoklu amino asit kompleksi lantiyonin, Dhb türevli olanlar ise  $\beta$ -metil-lantiyonin olarak adlandırılır (Şekil 2.3). Nisinin modifikasyona uğradıktan sonraki yapısı Şekil 2.4'te gösterilmiştir (Bauer and Dicks, 2005).



Şekil 2.2. Lantibiyotiklerin biyosentezi

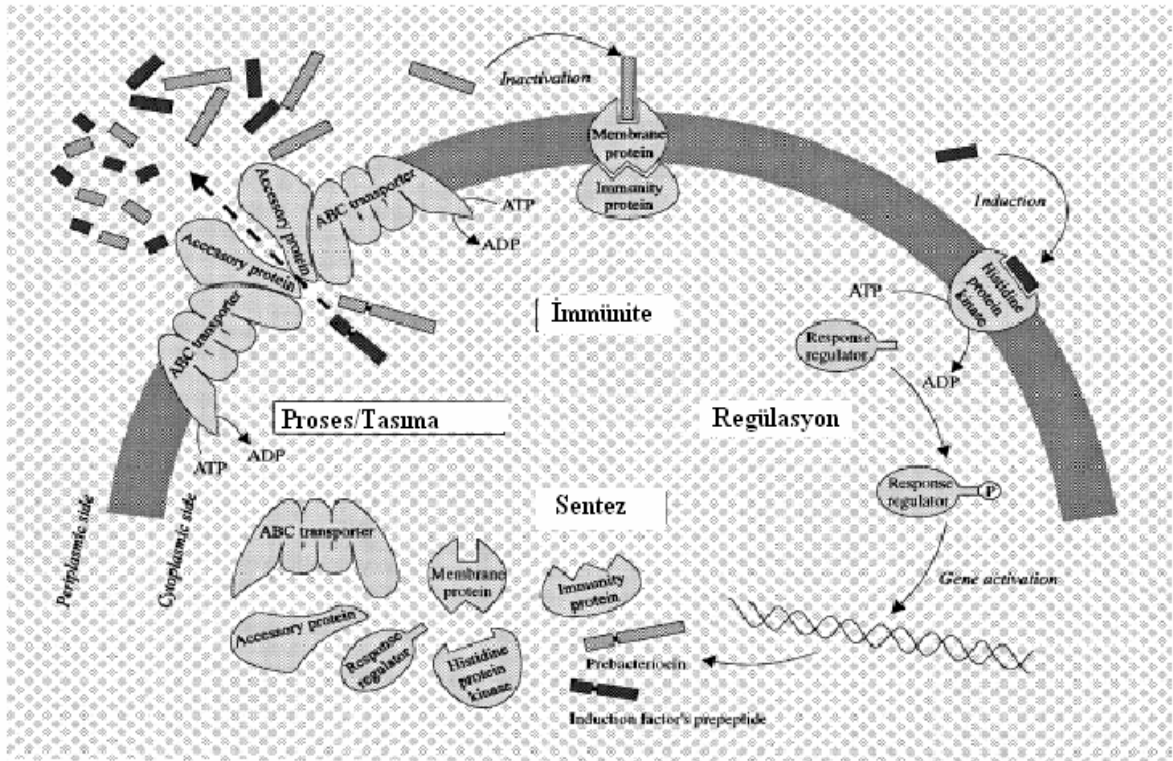


Şekil 2.3. Lantibiyotik prekürsör peptidlerinin enzimatik modifikasyonu



Şekil 2.4. Nisinin yapısı. Abu, 2-aminobütirik asit; Dha, dehidroalanin; Dhb, dehidrobütirin

Sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin biyosentezi de sınıf I bakteriyosinlere benzemektedir. Aralarındaki tek farklılık sınıf II ve sınıf III bakteriyosinleri kimyasal modifikasyona uğramamakta ve bunun sonucu anormal aminoasitler içermemekteler. Şekil 2.5'te sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin biyosentezi verilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere bakteriyosinlerin üç bileşenli regülatör sistemi tipik olarak histidin protein kinaz (HPK) enzimini, respons regülatörünü (RR) ve induksiyon faktörünü (IF) içermektedir. IF membranda bulunan HPK enzimini uyarır. Bunu takiben HPK enzimi sitoplazmada bulunan RR'yi fosforilize ederek bu uyarıyı hücreye iletir ve biyosentezin başlamasını sağlar (Montville and Winskowski, 1997; Ennahar et al., 1999, 2000; İşleroğlu ve ark., 2005) (Şekil 2.5). HPK (*lanK*) ve RR (*lanR*)'yi kodlayan genler nisin, subtilin ve mersasidinin gen kümesinde de teşhis edilmiştir (McAuliffe et al., 2001).



Şekil 2.5. Bakteriyosinlerin regülasyon ve biyosentezleri

Bakteriyosinlerin hücre dışına taşınması membrana bağlı olan iki protein ABC-transporter ve aksesuar proteini tarafından gerçekleştirilir. ABC-taşıyıcılarının N-terminal ve C-terminal bölgeleri yapısal olarak farklı olup C-terminal kısmı ATP-bağlama bölgesini içermektedir. N-terminal bölgesi hidrofobik olup C-terminalindeki çift glisin motifinden ön peptidi parçalayarak lider peptidi uzaklaştırmaktadır (Klaenhammer, 1993; Montville and Winkowski, 1997; Ennahar et al., 1999, 2000). ABC-taşıyıcının proteolitik kısmı muhtemelen ön-peptidin lider dizisine bağlanıp ATP hidrolizine ve taşıyıcıda konformasyonel değişimlere neden olmaktadır. Sonuçta lider peptit uzaklaşmakta ve olgun bakteriyosin sitoplazmik membrandan dışarıya taşınmaktadır. Bakteriyosinlerin taşınmasında rol oynayan aksesuar proteinleri büyük hidrofilik C-terminal bölgesi ile membranda bulunan hidrofobik N-terminal kısımdan oluşmaktadır. Aksesuar proteinlerinin membran translokasyonunu teşvik ettiği ve lider peptidin prosesinde rol oynadığı belirtilmektedir (Havarstein et al., 1995; Ennahar et al., 1999, 2000; Rodriguez et al., 2003).

Bazı bakteriyosinler ise genel salgılanma yolu ile salgılanmaktadırlar. Genel salgılanma yolu ile açığa çıkan proteinler sinyal peptit olarak adlandırılan bir N-terminal lider dizisi içermektedir. Bu N-terminal lider dizisi, pozitif yüklü N-terminal ucu, hidrofobik bir merkez ve bir parçalanma bölgelerinden oluşmaktadır. Parçalanma bölgesi proteinlerin stoplazmik membrandan çıkmasını sağlar ve membrandan taşınması sırasında bir sinyal peptidaz tarafından parçalanır. Divergesin A, bakteriyosin 31 ve enterosin P genel salgılanma yolu ile salgılanan bakteriyosinlerdir (Pugsley, 1993; Tomita et al., 1996, Cintas et al., 1997).

İmmünite proteinlerini kodlayan genler diğer bakteriyosin yapı ve işleme genleriyle genetik yakınlık içindedir. Yapısal bakteriyosin geni ve immünite geninin aynı operonda bulunması ve genellikle bir diğerinden sonra olması yaygındır. Lantibiyotiklerin immünite genlerinin ilk önce bir immünite geninden kaynaklandığı düşünülmüştür (örneğin nisin için *nisI*, subtilin için *spaI*). Fakat diğer genlerin silinmesinin konukçu immünetisini değiştirdiği görüldüğünden beri bu bakteriyosinlerin immünetesinin birçok proteinin

etkisinin bir sonucu olduğu düşünölmüştür. Örneğin nisin üretmeyen nisin dirençli *Lactococcus lactis* suşlarının NisI proteinini kodlayan genetik elementleri yoktur. Fakat nisF, nisE ve nisG'ye benzer dizileri vardır. Bunların da bu suşların nisine direncine yardım ettiği kabul edilmektedir. *nisG*'nin silinmesi hücreleri nisine karşı daha az dirençli hale getirmektedir (Cleveland et al., 2001).

Lantibiyotik olmayan bakteriyosinlerin immünitesi ise daha basittir. İmmünite proteinini bir gen kodlamaktadır (Cleveland et al., 2001). İmmünite proteinleri üretici bakteriyi kendi bakteriyosinine karşı tamamen, diğer bakteriyosinlere karşı kısmen korumaktadır. İmmünite proteinleri arasında amino asit dizi benzerliği düşük olmasına karşın ortak bazı özellikler taşımaktadırlar. Bunlar katyonik ve hidrofobik moleküller olup  $\alpha$ -heliks yapısına sahiptirler. Transmembran bölmelerine (hidrofobik) sahip olmamaları bunların hem hücre dışına salgılanabildiklerini hem de hücre içinde kalabildiklerini göstermektedir (Jack et al., 1995; Montville and Winskowski, 1997; Ennahar et al., 1999, 2000).

Nisin gibi por oluşturan bakteriyosinlere karşı immünite birkaç değişik yolla sağlanabilir. Bakteriyosinin membrana adsorpsiyonu önlenebilir, membrana adsorbe olan bakteriyosin dış ortama geri gönderilir veya hücre içine alınarak parçalanır (Erinç ve ark., 2006).

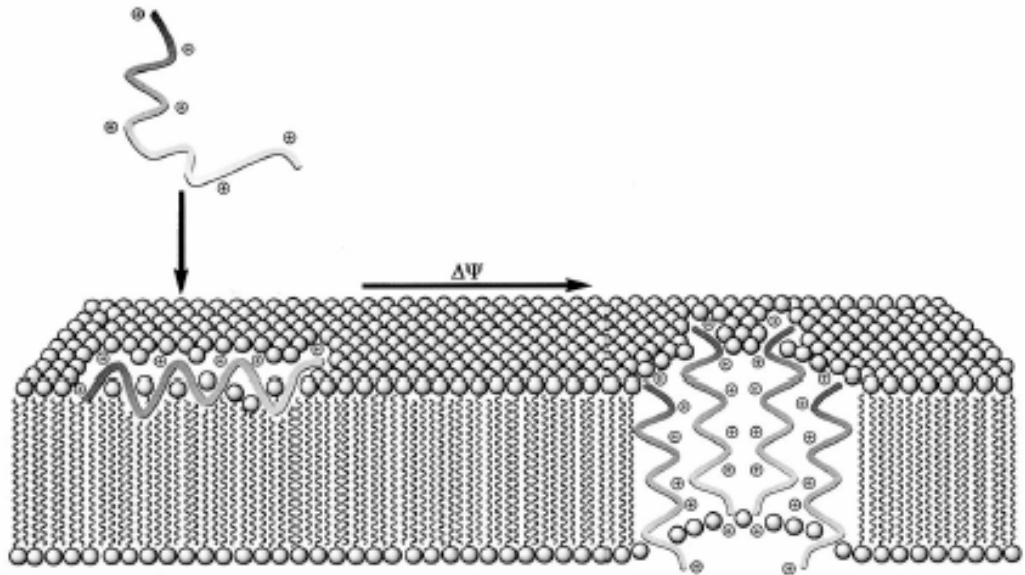
### **2.2.2.3. Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları**

LAB bakteriyosinleri duyarlı bakterilerin membranlarını destabilize ederek etki gösteren peptidlerdir. Duyarlı bakterilerin membranlarında gözenekler oluşturarak potasyum ve inorganik fosfat sızmasına ve buna paralel olarak membran iyonik dengesinin bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda transmembran potansiyeli ( $\Delta\psi$ ) ve/veya pH gradientinin ( $\Delta\text{pH}$ ) kısmen veya tamamen yok olması nedeniyle proton itici güç (PMF) ortadan kalkmaktadır. PMF, hücre içinde iyonların ve metabolitlerin birikmesi

ile ATP sentezi gibi sitoplazmik membranda enerjiye bağılı birçok hayati işlemleri yürütmektedir. PMF'nin yok olması veya bozulması direk olarak hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Bruno and Montville, 1993).

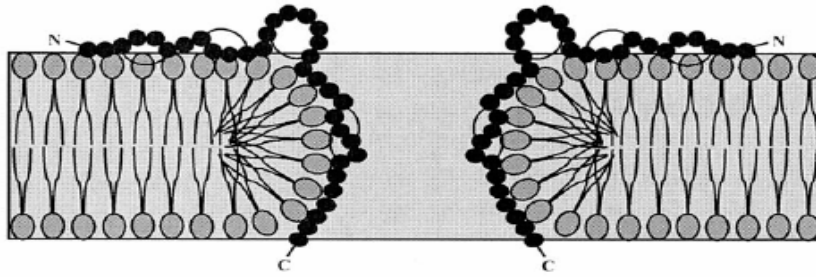
Lantibiyotiklerin duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranda por oluşturmalarıyla ilgili olarak öne sürülen modeller "Barrel-Stack", "Wedge-Model" ve "Lipid II Model"dir.

Barrel-stack mekanizması ile por oluşumunda bakteriyosinlerin katyonik yük taşıyan C-terminali fosfolipitlerin baş grupları ile elektrostatik interaksyona girerek bu bölgede membranın incelmesine neden olurlar (Şekil 2.6). Membran potansiyeli varlığında membran içine girip oligomerize olmakta ve böylece membranda iyonik por oluşturmaktadırlar. Peptitler merkezi kanalın etrafında dizilmekte ve hidrofobik yüzeyler membrana doğru, hidrofilik yüzeyler ise por'un merkezine doğru yönelmektedir (McAuliffe et al., 2001; Garneau et al., 2002; Kopenon, 2004).



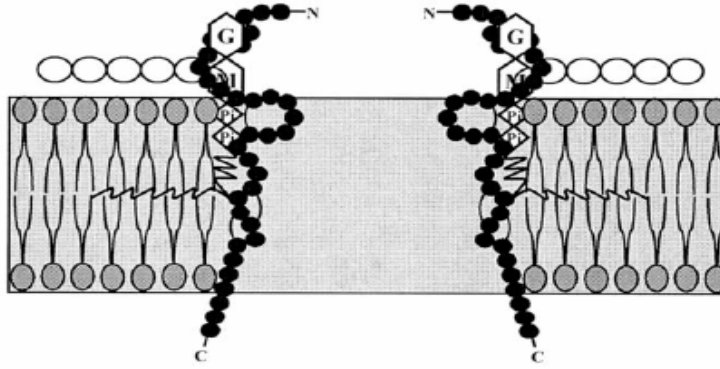
Şekil 2.6. Barrel-stack mekanizması ile por oluşumu

Wedge-model’inde lantibiyotiklerin pozitif yüklü C-terminali anyonik fosfolipitlerle iyonik interaksiyona girip membran yüzeyine sıkıca tutunmakta ve lipit dinamiğinin bozulmasına neden olmaktadır (Şekil 2.7). Yeterli miktarda potansiyel varlığında (-100 mV), bakteriyosin molekülleri fosfolipitlerle olan interaksiyonlarını kaybetmeksizin membran içine girip membranda bükülmelere veya kıvrımlara ve dolayısıyla porların oluşmasına neden olmaktadır (Brötz and Sahl, 2000; Kopenon, 2004; Bauer and Dicks, 2005).



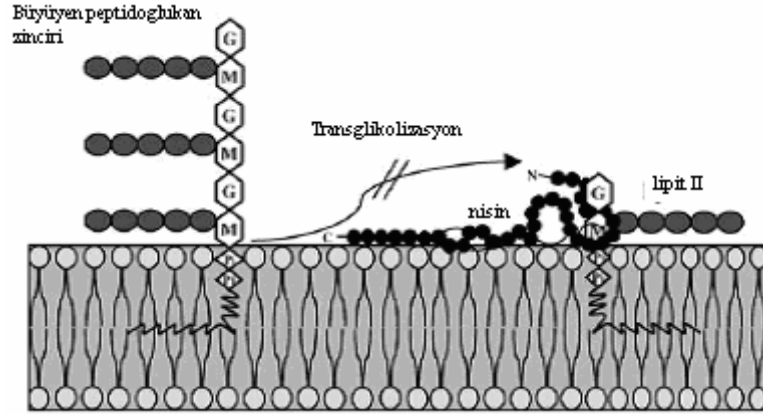
Şekil 2.7. Wedge model ile por oluşumu

Lipit II modelle lantibiyotiklerin por oluşturmada lipit bağlı peptidoglukan prekürsörü olan lipit II önemli bir faktör olarak rol oynamaktadır. Bu mekanizmada lantibiyotik (örneğin; nisin, epidermin) 1:1 oranında ilk önce lipit II’nin karbonhidrat kısmına bağlanmaktadır (Şekil 2.8). Bu bağlanmada lantibiyotiğin N-terminali rol oynamakta ve negatif bir yüzey gerekmemektedir. Lantibiyotiğin C-terminali membran içine girip membranın karşı tarafına geçmektedir. Por oluşumu için birkaç lantibiyotik/lipit II kompleksi gereklidir. Ayrıca por oluşum prosesi voltaja bağlı değildir. Tip A lantibiyotikler tarafından por oluşum mekanizmaları içinde lipit II modeli en yeni ve en iyi modeldir. Lipit II peptitlerin membran yüzeyine bağlanmasında aracı bir molekül olarak rol oynamasının yanı sıra porun doğru pozisyonda oluşumu ve açılımlında ve hatta por’un bir parçası olarak görev yapmaktadır. Lipit II yokluğunda porlar anyonlara çok geçirgen olduğu halde lipit II varlığında por’un böyle bir iyon seçiciliğine sahip olmadığı belirtilmektedir (Brötz and Sahl, 2000; Kopenon, 2004; Bauer and Dicks, 2005; Erinç ve ark., 2005). Şekil 2.9’da nisinin etki mekanizması gösterilmiştir (Hoffmann et al., 2001).



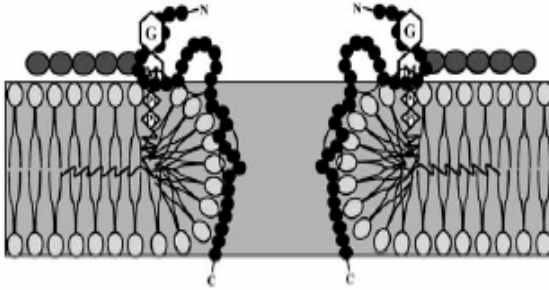
Şekil 2.8. Lipit II model mekanizması ile por oluşumu

(a)

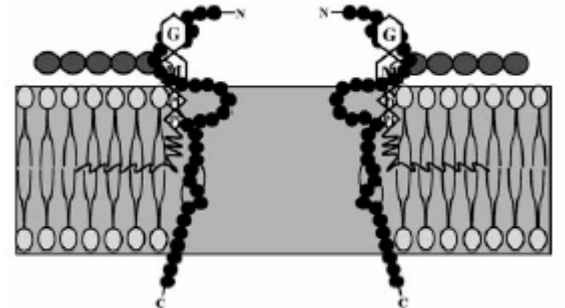


Lipit II'ye bağlanma ve por oluşumu

(b)



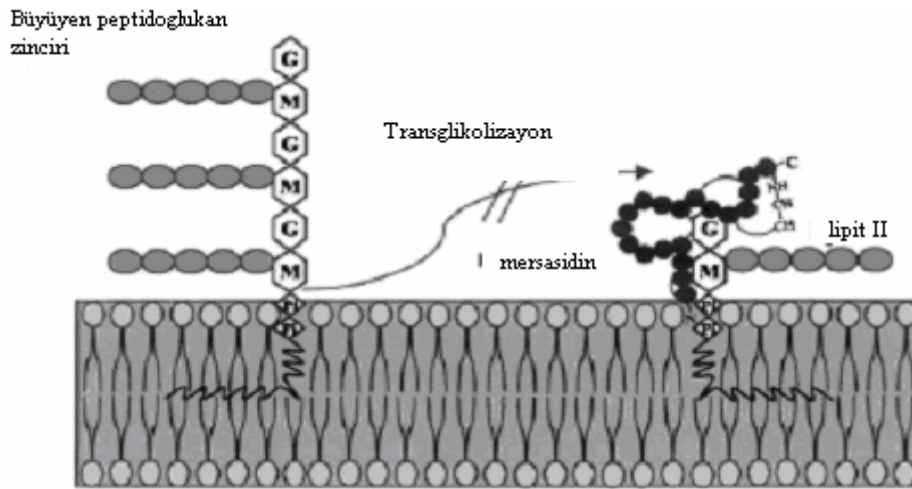
(c)



Şekil 2.9. Nisinin hedef hücrenin sitoplazmik membranında por oluşturma mekanizmaları (a), nisinin lipit II'ye bağlanması; (b), Wedge modeline göre por oluşumu; (c), Barrel-stave modeline göre por oluşumu

Tip B lantibiyotikler membranda por oluşturmamaktadırlar. Bu peptitler etki mekanizmasını metabolizmada önemli rol oynayan enzimlerin aktivitesini engelleyerek göstermektedirler. Tip B lantibiyotiklerden mersasidin ve aktagardin peptidoglukan sentezini inhibe etmektedirler. Peptidoglukan sentezi önlendiği zaman hücre duvarı kalınlığında önemli derecede bir azalma görülür ve bunu takiben hücre lize olur. Mersasidin ve aktagardin peptidoglukanın şeker zincirlerinin polimerizasyon enzim reaksiyonu olan transglikosilasyonu önlemektedirler (Şekil 2.10). Bu inhibisyonu söz konusu lantibiyotikler transglikosilaz enziminin substratı olan lipit II ile kompleks oluşturarak gerçekleştirmektedirler. Mersasidin ve aktagardinin yapısı lipit II ile bağlanmalarına olanak vermesine karşın por oluşumu için gerekli kısma sahip olmadıkları için tip A lantibiyotikler gibi membranda por oluşturmamaktadırlar (Brötz and Sahl, 2000; Hoffmann et al., 2001; McAuliffe et al., 2001).

Hem  $\Delta\psi$  hem de  $\Delta\text{pH}$ 'yı tamamen yok eden lantibiyotiklerden farklı olarak sınıf II bakteriyosinleri,  $\Delta\text{pH}$ 'nın tamamen,  $\Delta\psi$ 'nin ise kısmen yok olmasına yol açarlar (Ennahar et al., 1999). PMF'nin direkt olarak yok olması sonucunda görülen düşük intraselüler ATP düzeyi, besin maddelerinin aktif transportla taşınamamasına,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Mg}^{2+}$  gibi kofaktörlerin



Şekil 2.10. Lantibiyotik mersasidin tarafından peptidoglukan sentezinin inhibisyonu

hücre dışına sızmasına, hücrelerin inhibisyonuna ve ölümlerine sebep olmaktadır. Lantibiyotiklerden farklı olarak bu bakteriyosinler membranda daha küçük porlar oluşturdukları için ATP sızıntısına neden olmamaktadırlar. İntraselüler ATP miktarının azalmasının nedeni PMF'yi korumak için hızlı ATP tüketimi ve/veya fosfat sızıntısından dolayı hücrenin ATP üretememesinden kaynaklanmaktadır (Bruno and Montville, 1993; Ennahar et al., 1999, 2000). Tablo 2.5'te sınıf II bakteriyosinlerin etki mekanizması verilmiştir.

Tablo 2.5. Sınıf II bakteriyosinlerin etki mekanizması

	Etki mekanizması	$\Delta\text{pH}$	$\Delta\psi$	ATP	Sızıntı
<i>Sınıf IIa</i>					
Bavaricin MN	Por oluşumu	Dağılma	Dağılma	ND	CF
Enterosin P	$\text{K}^+$ porları	Etki yok	Dağılma	İntraselüler ATP'nin azalması	$\text{K}^+$ , CF
Mesenterisin Y105	Por oluşumu	ND	Dağılma	ND	Amino asitler
Pediosin PA-1	Por oluşumu	Dağılma	Dağılma	İntraselüler ATP'nin azalması	Amino asitler $\text{K}^+$
<i>Sınıf IIb</i>					
Laktasin F	Por oluşumu	ND	Dağılma	İntraselüler ATP'nin azalması	$\text{K}^+$ ve Pi
Laktokoksin G	Katyon porları	Etki yok	Dağılma	İntraselüler ATP'nin azalması	Amino asitler
Plantarisin EF	Katyon porları	Dağılma	Dağılma	ND	Katyonlar
Plantarisin JK	Anyon porları	Dağılma	Dağılma	ND	Anyonlar
<i>Sınıf IIc</i>					
Laktokoksin A	Por oluşumu	ND	Dağılma	ND	Amino asitler
Plantarisin A	Por oluşumu	Dağılma	Dağılma	ND	ND

ND: belirlenemeyen; CF: karboksifluorescein

### 2.2.2.3. Antimikrobiyal Etki Spektrumları

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler genellikle Gram pozitif bakterilere ve Gram negatif bakterilere karşı inhibitör aktivite gösterirler (Jack et al., 1995). Nisinin çok sayıda Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi olmasına rağmen Gram negatif bakterilere karşı etkisi genellikle düşüktür. *E. coli* O157: H7 ve *Salmonella* gibi patojenlerin gelişimini EDTA gibi metal şelatlaştırıcıların nisin ile kombinasyonunun kullanıldığında veya sıcaklık şoku uygulandığında önlendiği görülmüştür. EDTA, dış membranı tahrip eder ve nisinin penetrasyonuna izin verir (Cleveland et al., 2001).

Gıdalardan izole edilen LAB'nin bakteriyosinleri ile ilgili bir çalışmada *Lactobacillus*, *Carnobacterium* ve *Lactococcus* cinslerine ait bakteriyosinlerin antimikrobiyal etki spektrumları belirlenmiştir. *Lc. crispatus* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen bakteriyosinler nisine benzer şekilde geniş aktivite spektrumu göstermişlerdir. *Lc. curvatus* ve *Lb. plantarum* tarafından üretilen bakteriyosinler *Br. thermosphacta*, *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Listeria* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Carnobacterium* sp. ve *Streptococcus thermophilus*'u kapsayan farklı çeşitlilikte aktivite spektrumları gösterirken, *Carnobacterium divergens* tarafından üretilen bakteriyosin *Lc. curvatus*, *Listeria* sp., *Enterococcus* sp. ve *S. tehrmophilus*'u kapsayan sınırlı çeşitlilikte aktivite spektrumu göstermiştir. İncelenen hiçbir bakteriyosin Gram negatif bakteriler ya da mayalara karşı aktivite göstermemiştir (Coventry et al., 1997).

Yapılan bir çalışmada enterosin L50, pediosin PA-1, nisin A ve laktosin S'nin bazı bozulma etmeni ve gıda kaynaklı patojenlere karşı aktiviteleri incelenmiştir. Enterosin L50 ve pediosin PA-1 *L. monocytogenes*'e karşı fazlaca aktif olmalarına rağmen nisin A ve laktosin S inhibitör aktivite göstermemişlerdir. Enterosin L50 ayrıca *S. aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Clostridium botulinum*'a karşı da antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu patojenler diğer bakteriyosinlerden zayıfça etkilenmiş ya da etkilenmemiştir. *B. cereus* ATCC9139'un saf enterosin L50 ve nisin A ekstraktlarına duyarlı olduğu görülmüştür (Cintas et al., 1998).

*E. faecalis* A-48-32 ve *E. faecium* S-32-81 tarafından üretilen enterosin AS-48 (Ananou et al., 2005), *E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97 (Garcia et al., 2004), *E. casseliflavus* IM 416K1 ve *E. faecalis* IM 388C tarafından üretilen enterosinlerin (Sabia et al., 2004) gıda kaynaklı bir patojen olan *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör etkileri farklı çalışmalarda belirlenmiştir.

*E. faecalis* suşlarının genellikle enterokok türlerine karşı etkili olduğu, *E. faecium* suşlarının ise, *Propionibacterium* spp., *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *Clostridium sporogenes* ve *Clostridium tyrobutyricum*'u kapsayan geniş inhibitör aktivite spektrumuna sahip olduğu görülmüştür (Toit et al., 2000).

Süt ürünlerinde yapılan bir çalışmada enterokokal bir bakteriyosin olan enterosin CCM 4231'in *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Laukova et al., 1999).

*E. mundtii* ST15 tarafından üretilen bakteriyosinin *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Propionibacterium* sp., *Clostridium tyrobutyricum*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus caprinus*'un gelişimlerini inhibe ettiği görülmüştür (De Kwaadsteniet et al., 2005).

*E. faecalis* A-48-32 tarafından üretilen enterosin AS-48'in sosislerde *S. aureus* gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir (Ananou et al., 2005b).

*E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97'nin *Bacillus macroides* ve *Bacillus maroccanus*'un gelişimi inhibe ettiği belirlenmiştir (Garcia et al., 2004). Aynı bakteriyosinin *Bacillus coagulans* üzerine bakterisidal etkisi de saptanmıştır (Garcia et al., 2003).

Meyve sularında bozulma etmeni olan *Alicyclobacillus acidoterrestris*'in

*E. faecalis* A-48-32 tarafından üretilen enterosin AS-48 ile inhibe edildiği belirlenmiştir (Grande et al., 2005).

#### **2.2.2.4. Üretimleri, Antimikrobiyal Aktiviteleri ve Stabilitelerini Etkileyen Faktörler**

Bakteriyosin üretimi ve aktivitesi besiyerinin bileşimi, gelişme fazı, pH, inkübasyon koşullarına bağlıdır (Yıldırım ve Yıldırım, 2000). Basit bir besiyerinde bakteriyosin üretimi, optimum pH ve tür veya suş için spesifik besin öğelerinin ilavesi ile artırılabilir. Genellikle yüksek hücre yoğunluğunu sağlayan koşullar yüksek bakteriyosin üretimini de sağlar (Yang and Ray, 1994).

*Leu. mesenteroides* E131 gelişimi için optimum sıcaklık (25-30°C) ile maksimum bakteriyosin aktivitesinin görüldüğü sıcaklık (25°C) birbirine yakındır. Bu suş için en iyi hücre gelişimi pH 6,5 iken maksimum bakteriyosin aktivitesi pH 5,5'tir (Drosinos et al., 2006).

*Lc. lactis* subsp. *lactis* A164 tarafından üretilen nisin benzeri bakteriyosinin üretiminin karbon ve azot kaynaklarından fazlaca etkilendiği görülmüştür. A164 suşunun M17 besiyerinde diğer karbon kaynakları yerine laktoz kullanıldığında 4 kat daha fazla bakteriyosin ürettiği gözlenmiştir. % 3 düzeyinde maya ekstraktı ilavesi optimum azot kaynağı olarak bulunmuştur. Söz konusu bakterinin optimum gelişme sıcaklığı 37°C iken maksimum düzeyde bakteriyosin üretimi için gerekli sıcaklığın 30°C olduğu gözlenmiştir. Gelişme için optimum pH aralığının 5,5-6,5 arasında değişirken bakteriyosin üretimi için optimum pH'nın 6,0 olduğu belirlenmiştir. Maksimum aktivite M17L broth (% 3 laktoz), 30°C ve pH 6,0'da erken durgun gelişme fazında gözlemiştir (Cheigh et al., 2002).

*Lactococcus* sp. GM005 inkübasyon koşulları 30°C ve pH 6,0'da sabit tutularak geliştirildiğinde ürettiği bakteriyosinin aktivitesinin, kontrolsüz pH koşullarına göre 8 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (Onda et al., 2003).

*P. acidilactici* NRRL B-5627'nin ürettiği pediosinin aktivitesini tripsin, papain, subtilisin ve pepsin ile 15 dakika muamele sonucunda kaybettiği görülmüştür. *Lc. lactis* subsp. *lactis* CECT 539 tarafından üretilen nisin tripsin, subtilisin ve pepsin ile muamele edildiğinde aktivitesini kaybettiği, papain ile muamele edildiğinde ise aktivitesini % 50 oranında kaybettiği belirlenmiştir. Pediosin ve nisin asidik pH'lar ile kısa sürelerde en yüksek ısı stabilesi göstermişlerdir (Guerra et al., 2001).

*Lc. lactis* ssp. *lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46 ve *E. mundtii* USC-51 tarafından maksimum bakteriyosin üretiminin gelişmelerinin durgun fazında olduğu belirlenmiştir. Tüm bakteriyosinler proteinaz K ile inaktive olmuştur. Tüm bakteriyosinlerin 100°C'de 60 dakika veya 121°C'de 15 dakika ısı işleme dayanıklı olduğu görülmüştür. *L. monocytogenes*'e karşı olan aktiviteleri suşa bağlı olarak pH 3,5-5,5 veya 3,5-6,5 aralığında devam etmiştir (Campos et al., 2006).

*Lb. pentosus* B96'nın 30°C, nötral pH ve NaCl yokluğunda iyi geliştiği bilinmektedir. Fakat bir suboptimal sıcaklık (22°C) ve makul bir NaCl stresinin (0,65 mol l<sup>-1</sup>) bakteriyosin üretimini stimüle ettiği belirlenmiştir (Delgado et al., 2005).

*Micrococcus* sp. tarafından üretilen mikrokoksın GO5 için optimum başlangıç pH'sı 7,0-9,0 ve sıcaklık 37°C'dir. Maksimum mikrokoksın GO5 aktivitesi glukoz yerine laktoz veya sukroz kullanılan modifiye MRS'de sağlanmıştır. MRS'de bulunan diğer azot kaynakları yerine, % 0,5 tripton ve % 1 maya ekstraktı içeren modifiye MRS'de maksimum bakteriyosin aktivitesi elde edilmiştir (Kim et al., 2006).

*Lb. amylovorus* DCE 471 tarafından üretilen amylovorin L471 üretiminin artan tuz konsantrasyonlarında azaldığı görülmüştür. Maksimum spesifik gelişme oranı 5 g/L NaCl varlığında gerçekleşirken maksimum bakteriyosin aktivitesi 10 g/L ilavesinden sonra belirlenmiştir (Neysens et al., 2003).

*Lactobacillus buchneri* LB tarafından üretilen buchnericin LB'nin ısıya dayanıklı,  $\alpha$ -kimotripsin, tripsin, papain, proteinaz K ve pepsin ile hidroliz olduğu fakat katalaz, peroksidaz, lipaz, amilaz ve organik çözücülere karşı dayanıklı olduğu görülmüştür (Yildirim and Yildirim, 2001).

Yapılan bir çalışmada kullanılan bakteriyosinler (nisin, sakasin P, kurvasin A) üzerine farklı maddelerin etkisi incelenmiş ve lesitin, kazein ile divalent katyonların bu bakteriyosinlerin antagonistleri oldukları görülmüştür. Düşük pH, EDTA, propil-paraben veya NaCl'nin tüm bakteriyosinlerin aktivitesini artırdığı gözlenmiştir (Ganzle et al., 1999).

*Lb. plantarum* LC74 tarafından üretilen plantarisin LC74'in hekzan, asetonitril, etanol, aseton ve kloroformdan etkilenmediği görülmüştür (Rekhif et al., 1994). Lee and Paik (2001) *Lactococcus lactis* NK24 tarafından üretilen bakteriyosinin etanol, metanol, aseton, toluen, isopropanol ve kloroformdan etkilenmediğini belirlemişlerdir.

Campos et al. (2006) tarafından yapılan çalışmada *Lc. lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46, *E. mundtii* USC-51'in maksimum miktarda bakteriyosin üretimlerinin bakterilerin gelişimlerinin durgun fazında olduğu belirlenmiştir. Tüm bakteriyosinlerin aktivitelerini proteinaz K enzimi ile kaybettikleri, 100°C'de 60 dk veya 121°C'de 15 dk ısı işleme ise dayanıklı oldukları görülmüştür.

Domuz dışkılarından izole edilen bazı *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin karakterizasyonunu yapılmıştır. Enterosin üretimi erken logaritmik gelişme fazında başlamış ve maksimum miktarda üretim durgun fazın başlangıcında sağlanmıştır. *E. faecalis* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin *E. faecium* suşlarının bakteriyosinleri ile karşılaştırıldığında daha dar bir inhibitör aktivite spektrumuna sahip oldukları belirlenmiştir. Test edilen tüm *Enterococcus* suşlarının bakteriyosinleri  $\alpha$ -kimotripsin, proteinaz K, tripsin, pronaz, pepsin ve papain ile inaktive olmuş fakat lipaz, lizozim ve katalazdan etkilenmemiştir. Üretilen bakteriyosinlerin ısıya

dayanıklı olduğu ve nötral pH'larda maksimum aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Toit et al., 2000).

*E. casseliflavus* ve *E. faecalis* tarafından üretilen iki bakteriyosin ile yapılan bir çalışmada her iki bakteriyosinin de kullanılan proteolitik enzimlere duyarlı oldukları ve aktivitelerini geniş pH aralığında ve buzdolabı koşullarında 6 ay depolama süresince sürdürdükleri belirlenmiştir. Isı uygulamaları sonucunda *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosinin ısıya duyarlı olduğu, *E. casseliflavus* tarafından üretilenin ise otoklavlama işleminden sonra bile antimikrobiyal aktivitesini koruduğu görülmüştür (Sabia et al., 2002, 2004).

*E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97'nin karakterizasyonun yapıldığı bir çalışmada bakteriyosinin hafif ısı işlem koşullarına dayanıklı olduğu, proteolitik enzimlere ise duyarlı olduğu, SDS, tween 80, EDTA ve  $\beta$ -merkaptetanolden ise etkilenmediği gösterilmiştir (Galvez et al., 1998). *E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97'nin, *Bacillus coagulans* CECT 12'nin vejetatif hücrelerine karşı konsantrasyona bağlı olarak bakterisidal etki gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek aktivite 37°C ve 15°C'de elde edilmiş, 4°C'de inkübasyon sonunda aktivite belirlenmemiştir. İndikatör bakteriye karşı maksimum aktivite pH 7,0'de gözlenmiştir. pH 5,0'de aktivitede küçük bir düşüş görülürken, pH 9,0'da yapılan inkübasyon sonucunda çok düşük bir aktivite elde edilmiştir (Garcia et al., 2003). Enterosin EJ97 ile yapılan bir başka çalışmada enterosin aktivitesini etkileyen faktörler ve kimyasal gıda koruyucuları ile ilişkisi incelenmiştir. *L. monocytogenes*'in enterosin EJ97 tarafından inhibisyonu için yüksek bakteriyosin konsantrasyonuna gerek olduğu bulunmuştur. Organik asit tuzları ve bakteriyosin arasındaki interaksyon nötral pH'larda çalışılmış ve sodyum asetat ile sodyum benzoatın bakteriyosin aktivitesine etkisi olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca nötral pH'larda enterosin EJ97'nin aktivitesinin inorganik tuzlar, NaCl ve sodyum tripolifosfat tarafından inhibe edilmediği belirlenmiştir. Enterosin EJ97'nin *L. monocytogenes* üzerine aktivitesi nitrat ve nitrit tuzlarının kullanımı ile önemli ölçüde artırılmıştır (Garcia et al., 2004).

De Kwaadsteniet et al. (2005) *E. mundtii* ST15 tarafından üretilen bakteriyosinin proteinaz K, pronaz, pepsin, proteaz ve Triton X-114 ile inaktive olduğunu fakat katalaz,  $\alpha$ -amilaz, Triton X-100, SDS, Tween 20, Tween 80, üre ve EDTA'dan etkilenmediğini belirlemişlerdir.

Peynirden izole edilen *E. faecium* RZS C5 suşunun listeria'ya karşı aktif bir bakteriyosin ürettiği belirlenmiştir. Bakteriyosin pH 6,5 ve 20-35°C arasında yüksek aktivite göstermiştir (Leroy and Vuyst, 2002).

*E. faecium* N15 tarafından üretilen bakteriyosinin  $\alpha$ -kimotripsin, proteinaz K, tripsin ve pepsin gibi proteazlar ile  $\alpha$ -amilaza karşı duyarlı, lipaz enzimine ise dayanıklı olduğu görülmüştür. Bakteriyosin, 100°C'de 2 saat ısıtılma dayanıklı olduğu halde 121°C'de 15 dakika otoklavlama koşullarında aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Bakteriyosin N15 geniş pH aralığında (2-10) aktivite gösterebilmektedir (Losteinkit et al., 2001).

Agar plate model sisteminde indikatör hücre sayısı, pH, NaCl, agar ve soya yağı konsantrasyonunun pediosin PA-1, pissikolin 61, sakasin P, nisin ve sakasin A bakteriyosinlerinin difüzyonları üzerine etkisinin incelendiği bir araştırmada bazı bakteriyosinlerin difüzyon alanları, faktörler düşük miktarlardan yükseğe doğru çıktıkça değiştiği görülmüştür. Her bakteriyosinin profilini etkileyen bir karakteristik iç faktörünün olduğu fakat pH ve indikatör hücrelerin yoğunluğu tüm bakteriyosinleri etkilediği belirlenmiştir (Blom et al., 1997).

#### **2.2.2.5. Uygulama Alanları**

Bakteriyosinler, gıdalarda bozulmaya ve hastalıklara neden olan organizmaları öldürmek için direkt olarak gıdalara ilave edilebilecekleri gibi üretici suşlar kullanılarak da bu etki sağlanabilir. Bakteriyosinlerin bir diğer uygulama şekli ise ambalaj metaryallerine ilavesidir. Bakteriyosinler ve bakteriyosin üreten LAB, fermente gıdaların kalitesini

iyileştirmek için de kullanılmaktadırlar. Fermente et ve sebzelerde bakteriyosin üreten starter kültürler mikroorganizmaların inhibe veya inaktif edilmesinde kullanılmaktadır (Daeschel, 1990; Muriana and Luchansky, 1993; Montville and Winskowski, 1997).

Nisin, gıda prosesi ve fermantasyonlarda ticari olarak kullanılan ilk laktik asit bakterisi bakteriyosinidir. Ayrıca, GRAS olarak kabul edilen ilk bakteriyosindir. Nisin düşük pH'ya dayanıklı ve vejetatif hücrelerin yanı sıra bakteriyel endosporlara karşı da etkilidir. Nisin birçok Avrupa ülkesinde ve Orta Doğu ülkelerinde başta peynir olmak üzere süt ve konserve gıdalar gibi çeşitli gıdalarda güvenli bir şekilde kullanılmaktadır. 1988 yılından beri FDA tarafından pastörize işlem görmüş peynirlerde *Clostridium botulinum* sporlarının gelişmesini ve toksin oluşumunu önlemek amacıyla GRAS olarak kullanımına izin verilmiştir. AB ülkelerinde ise irmik, puding, olgunlaştırılmış ve işlem görmüş peynirler ile ekşitilmiş kremada nisin (E 234) kullanımına izin verilmektedir. Nisin biyolojik koruyucu olarak salam, peynir gibi fermente edilmiş düşük pH'lı gıdalarda ve konserve balıklarda, hazır etlerde ve çeşitli kozmetik ürünlerinde özellikle depo ömrünü arttırıcı olarak kullanılmaktadır (Daeschel, 1989; Delves-Broughton, 1990; Roller and Lusengo, 1997). Ülkemizde de halen AB ülkelerinde geçerli olan gıdalarda kullanılmaktadır (Anonim, 1997). Nisin sütlü tatlılar, yoğurt, alkollü içecekler, kürlenmiş etler, balık, sıvı yumurta ve ekmek gibi çeşitli gıdalarda kullanılmaya başlanmıştır (Delves-Broughton, 1990).

Tablo 2.6 ve Tablo 2.7'de bazı LAB bakteriyosinlerinin süt ve et ürünlerinde uygulama alanları ile Tablo 2.8'de bazı bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımına örnekler verilmiştir (Cleveland et al., 2001; O'Sullivan et al., 2002; Garneau et al., 2002).

Tablo 2.6. Bakteriyosin üreten LAB'nin peynir ve süt ürünlerinde uygulamalarına örnekler (O'Sullivan et al., 2002)

Bakteriyosin	Uygulama	Sonuç
Pediosin PA-1 (AcH)	Cheddar üretiminde bir pediosin üreten <i>L. lactis</i> 'in starter olarak kullanılması	<i>L. monocytogenes</i> sayısının 1 haftada $10^2$ cfu/g' a düştüğü bulunmuştur.
	Bir pediosin üreten <i>Lb. plantarum</i> 'un Munster peynirinin yüzeyinde spreyci olarak kullanılması	Olgunlaşmanın 11. gününde <i>L. monocytogenes</i> gelişimini durdurduğu ve 21. günde tamamen öldürdüğü belirlenmiştir.
Pediosin 5	Pediosin 5 üreten <i>P. acidilactici</i> 'nin süte katılması	<i>L. monocytogenes</i> sayısının geçerli miktarda azalttığı ispat edilmiştir.
Enterosin	Taleggio peyniri üretiminde enterosin üreten <i>Enterococci</i> kullanılması	<i>L. innocua</i> 'nın inhibe olduğu tespit edilmiştir.
	Manchego peyniri üretimi için enterosin üreten <i>E. faecalis</i> 'in starter olarak kullanılması	<i>L. monocytogenes</i> Ohio'nun inhibe olduğu görülmüştür.
Nisin	Guarg tatlısının hazırlanmasında nisin üreten <i>L. lactis</i> 'in kullanımı	4 ve 20°C'de depolama süresince spor oluşturan bakterilerin sayısının azaldığı belirlenmiştir.
Laktisin 3147	Cottage peynirinin üretiminde laktisin 3147 üreten <i>L. lactis</i> 'in kullanımı	5 gün ve 4°C'de <i>L. monocytogenes</i> Scott A sayısının %99,9 azaldığı gözlenmiştir.

Tablo 2.7. Bakteriyosin üreten LAB'nin et ürünlerinde uygulamalarına örnekler (O'Sullivan et al., 2002)

Bakteriyosin	Uygulama	Sonuç
Pediosin	Baharatlı sosis üretiminde pediosin üreten <i>P. acidilactici</i> 'nin katılması	15°C'de anaerobik koşullarda 15 güne kadar <i>L. monocytogenes</i> gelişiminin kontrol edildiği saptanmıştır.
	Hindi sosislerine <i>P. acidilactici</i> 'nin katılması	<i>L. monocytogenes</i> sayısının 3,4 log azaldığı tespit edilmiştir.
	Fermente sosis üretiminde starter olarak <i>P. acidilactici</i> 'nin kullanılması	Pediosin ve pH'nın sinerjistik etkisiyle <i>L. monocytogenes</i> 'in inhibe olduğu görülmüştür.
	Tavuk sosisinin hazırlanmasında pediosin üreten <i>P. acidilactici</i> 'nin kullanılması	<i>L. monocytogenes</i> sayısının 2,6 log azaldığı belirlenmiştir.
Leukosin A	<i>Leu. gelidum</i> UAL 187'nin sığır etinin bozulmasının kontrolünde kullanılması	<i>Lb. sake</i> bozulmasının 6 haftaya kadar geciktiği gözlenmiştir.
Laktosin 705	Laktosin üreten <i>Lb. casei</i> 'in, öğütülmüş sığır etine <i>L. monocytogenes</i> kontrolünde kullanılması	<i>L. monocytogenes</i> gelişiminin inhibe olduğu saptanmıştır.
Sakasin A	Sakasin A üreten <i>Lb. sake</i> 'nin kıyma ve çiğ domuz etine katılması	<i>L. monocytogene</i> 'in etkili bir şekilde inhibe olduğu görülmüştür.

Tablo 2.8. Bazı bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımlarına örnekler (Cleveland et al., 2001; Garneau et al., 2002)

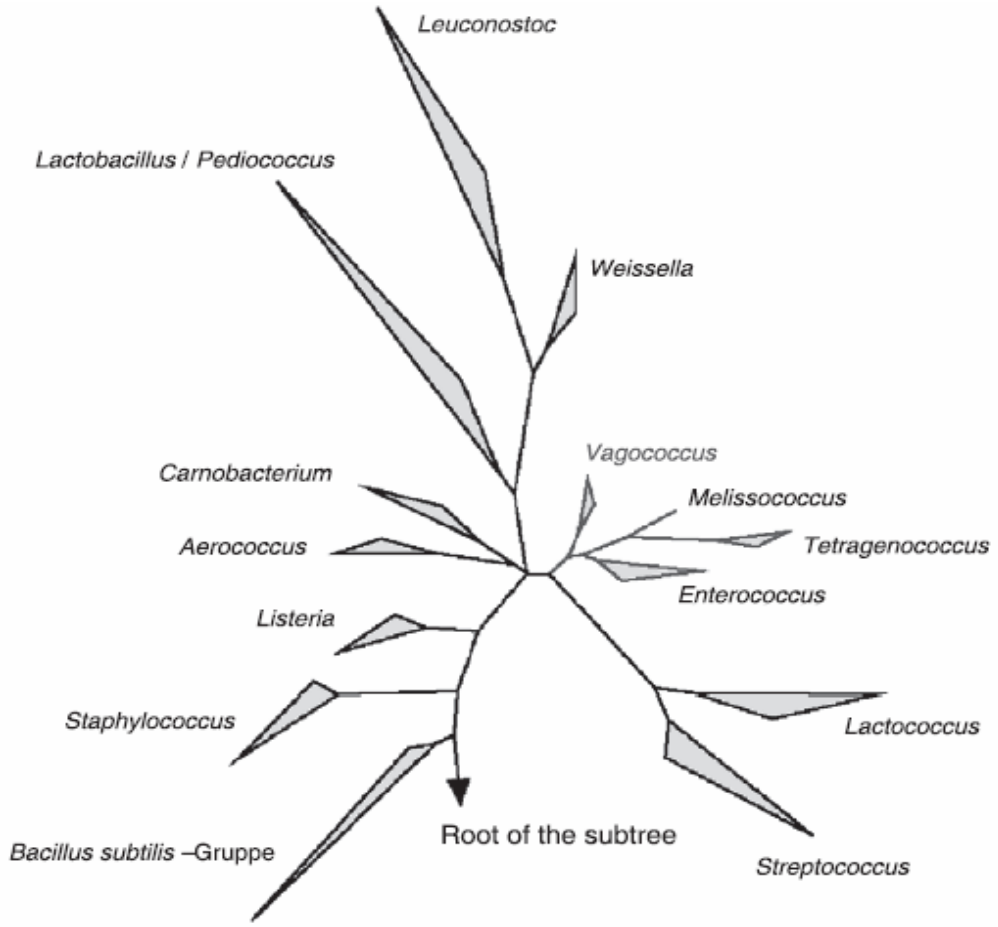
Bakteriyosin	Uygulama	Sonuç
Enterosin	Enterosinin tavuk göğsü, jambon, domuz eti ve sosise katılması	<i>L. monocytogenes</i> gelişimin birçok koşul altında kontrol edildiği görülmüştür.
Laktisin 3147	Laktisin 3147'nin toz preparatı cottage peyniri yoğurt ve toz haldeki çorbalara katılması	<i>L. monocytogenes</i> ve <i>B.cereus</i> 'un bu ürünlerdeki gelişiminin kontrol edildiği görülmüştür.
Laktosin 705	Laktosin 705'in kıymada <i>L. monocytogenes</i> gelişimini düşürmesi için kullanılması	Laktosin 705'in kıymada <i>L.monocytogenes</i> gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir.
Pediosin AcH	Pediosin preparasyonunun çiğ tavuğa katılması	<i>L. monocytogenes</i> inhibisyonunun 5°C'de ve 28 günde gelişiminin kontrol edildiği görülmüştür.
Nisin A	Nisinin ricotta peynirinde <i>L. monocytogenes</i> gelişiminin kontrol edilmesi için kullanılması	Nisinin 8 haftada <i>L. monocytogenes</i> 'i etkili bi şekilde inhibe ettiği görülmüştür.

## 2. 3. ENTEROKOKLAR VE ÜRETTİKLERİ BAKTERİYOSİNLER

### 2.3. 1. Filogeni-Taksonomi

Streptokokların üyeleri önceden “fokal streptokoklar” veya “Lancefield’in grup D streptokokları” daha sonra yapılan taksonomik çalışmalarla *Enterococcus* cinsi adı altında farklı bir cins olarak ayrılmışlardır. Diğer bir ifade ile modern sınıflandırma teknikleri ve serolojik çalışmalar temel alındığında, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde, bazı fermente gıdalarda ve birçok başka habitatlarda bulunan “fokal streptokoklar” yeni *Enterococcus* cinsini oluşturmuştur.

Enterokoklar, *Melissococcus*, *Tetragenococcus* ve *Vagococcus* cinsleri ile birlikte *Enterococcaceae* familyası içinde bulunurlar (Şekil 2.11). *Enterococcus* cinsi içindeki farklı türlerin filogenik ilişkileri bunların 16S rRNA genlerinin karşılaştırmalı dizi analizleri ile belirlenir (Şekil 2.12). 20’den fazla *Enterococcus* türü şu an belirlenmiş olmasına rağmen *E. faecium* ve *E. faecalis* göze çarpan iki tür olmayı sürdürmektedir.

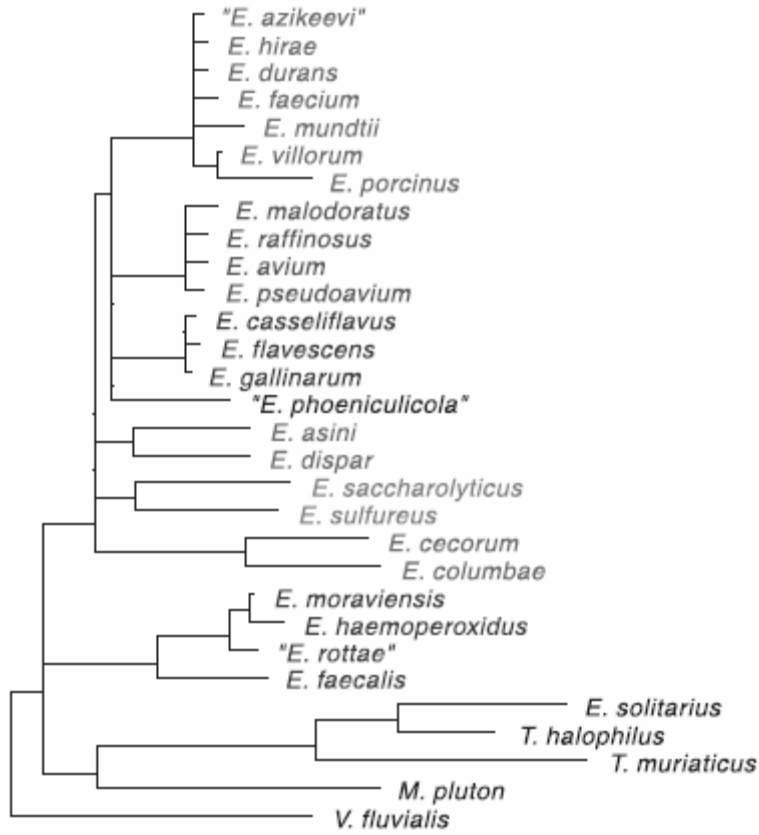


Şekil 2.11. *Enterococcus* cinsinin filogenik pozisyonu

İnsan hastalıklarında, fermente gıdalarda ve probiyotik olarak bu organizmaların içinde en önemli rolü oynamaktadırlar.

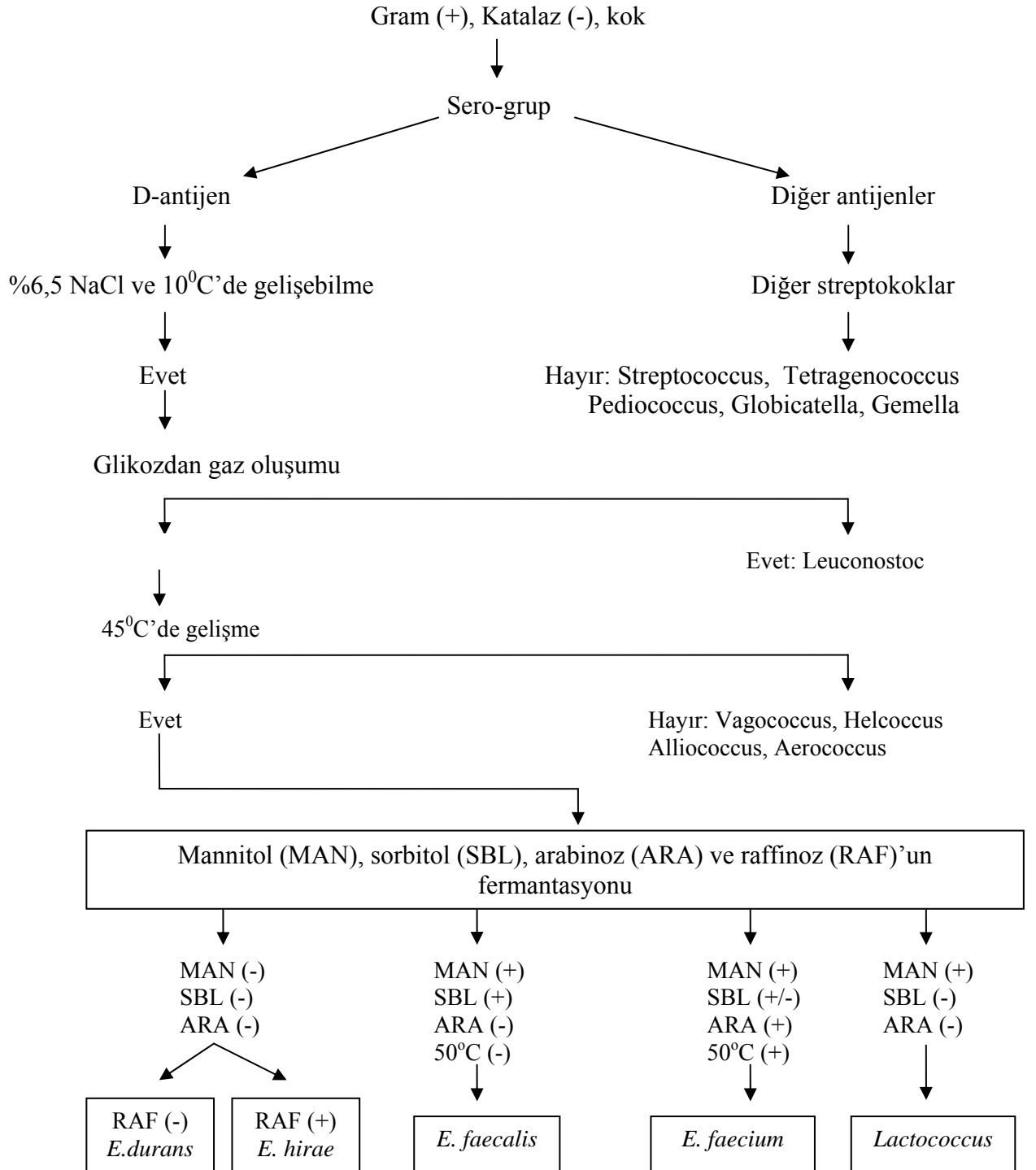
### 2.3.2. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

*Enterococcus* cinsinin üyeleri *Streptococcus* ve *Lactococcus* cinsleri gibi, Gram pozitif, katalaz negatif, çiftler ya da kısa zincirler halinde bulunan fakültatif anaerob koklardır. Bunlar kemoorganotrofikler ve homofermentatif laktik asit fermentasyonu ile heksozlardan L-laktik asit oluştururlar. Tipik enterokoklar olan *E. durans*, *E. faecalis*,



Şekil 2.12. Enterokok türleri arasındaki ilişkileri gösteren 16S rRNA'ya dayanan soy ağacı

*E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hiraе* ve *E. mundtii*, 10 ve 45 °C'de, % 6,5 NaCl, % 40 safra varlığında ve pH 9,6'da gelişebilmeleri ile streptokok ve laktokoklar gibi diğer Gram (+) ve katalaz (-) homofermentatif koklardan kolaylıkla ayrılabilirler (Şekil 2.13). Ayrıca eskulini hidrolize edebilir ve % 0,04 Na-azid bulunan ortamda gelişebilirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 35°C'dir. Termodurik bakteriler olup 60°C'de 30 dakika canlılıklarını sürdürebilirler. İstisnalar 45°C'de gelişmeyen *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. malodoratus* ve *E. moraviensis*, 10°C'de gelişmeyen *E. cecorum* ve *E. columbae* ile % 6,5 NaCl varlığında az gelişen veya gelişemeyen *E. avium*, *E. saccharaminimus*, *E. cecorum* ve *E. columbae*'dir. *E. mundtii* ve *E. casseliflavus* sarı pigmentli ve *E. gallinarum* ile *E. casseliflavus* hareketlidir (Stiles et al., 1997; Franz et al., 1999, 2003; Klein, 2003; Moreno et al., 2006).



Şekil 2.13. Enterokokların diğer Gram (+), katalaz (-) koklardan ayrımı

Son zamanlarda tanımlanan enterokokal türlerin çoğu fizyolojik özellikleri bakımından tipik enterokoklardan farklılık gösterirler. Grup D antiserumu ile reaksiyon vermeyen bazı türler (*E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus* ve *E. sulfureus*) mevcuttur (Tablo 2.9).

Belirli sıcaklıklarda gelişme yanında karbonhidrat fermantasyon yolları da önemli fenotipik ve fizyolojik karakterlerdir. *E. faecium* ve *E. faecalis* için elektif ya da selektif besiyerlerinde gelişme karakteristikleri de kullanılabilir. *E. faecalis* trifenil-tetrazolium-klorit (TTC)'i indirgemesine karşın *E. faecium* indirgeyemez veya zayıfça indirgemektedir. TTC bulunan spesifik besiyerinde *E. faecalis* koyu kırmızı koloniler, *E. faecium* ise soluk pembe koloniler oluşturur (Klein, 2003).

16S rRNA dizisi analizleri karşılaştırıldığında *Enterococcus* cinsinin % G+C oranı düşük olup % 50'nin altındadır (Tablo 2.10) (Franz, 2003; Klein, 2003).

### 2. 3. 3. Ekoloji

Enterokoklar ve grup D streptokoklar insan ve hayvanların yerli mikroflorasının önemli bir bölümünü oluştururlar. Prensip olarak da insan ve hayvan gastrointestinal sistemleri habitatlarıdır. Bazı bireylerde ve bazı ülkelerde *E. faecium*, *E. faecalis*'ten sayıca fazla olmasına rağmen, *E. faecalis* genellikle insan bağırsaklarında bulunan *Enterococcus* türleri arasında baskın olandır (Stiles et al., 1997; Klein, 2003). Fakat Mundt (1986) çoğu gıdada bulunan *E. faecalis*'in her zaman direkt olarak fekal kontaminasyon kaynaklı olmadığını belirlemiştir. 1992'de Avrupa Birliği koliformlar ve *E. coli*'nin varlığı için bir maksimum değer belirlemiş, enterokoklar içinse bir limit belirlememiştir. Endüstriyel olarak işlenmiş gıdalarda enterokoklar hijyen indikatörü olarak çok az bir değere sahiptir.

Tablo 2.9. Enterokok türlerinin karakteristik fizyolojik özellikleri

Tür	10°C	45°C	pH 9,6	%6,5 NaCl	%40 Safra	%0,04 Na-azid	Eskulin hidrolizi	Grup D antijeni
<i>E. asini</i>	(+)	+	nd	-	+	nd	+	+
<i>E. avium</i>	(+)	+	+	V	V/+	nd	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	V	-	+	V/+	+	+	+	+
<i>E. cecorum</i>	+	+	(+)	-	+	-	+	-
<i>E. columbae</i>	-	nd	nd	-	(+)	-	+	-
<i>E. dispar</i>	+	-	nd	+/-	+	-	+	-
<i>E. durans</i>	+	+	+	+	+	+	+	(+)
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. flavescens</i>	V/-	V/+	nd	+	+	+	+	+
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. haemoperoxidus</i>	+	-	nd	+	+	+	+	+
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. malodoratus</i>	+	-	+	+	+	nd	+	+
<i>E. moraviensis</i>	+	-	nd	+	+	+	+	+
<i>E. mundtii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. porcinus</i>	+	+	nd	+	nd	nd	+	+
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	+	+/-	V/+	nd	+	-
<i>E. raffinosus</i>	(+)	+	+	+	V/+	nd	+	nd
<i>E. ratti</i>	+	+	nd	+	nd	nd	+	(+)
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	nd	(+)	+	nd	+	-
<i>E. solitarius</i>	+	+	nd	+	+	nd	+	+
<i>E. sulfureus</i>	+	-	nd	+	+	nd	+	-
<i>E. villorum</i>	nd	nd	nd	+	+	+	+	nd

nd: belirlenmeyen; (+): zayıf pozitif; V: değişken; +/-; literatürdeki verilerde farklı olanlar

Tablo 2.10. DNA'da % G+C içeriğine göre LAB'nin sınıflandırılması

Düşük G+C oranı (< % 50)	
<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Weissella</i>	<i>Carnobacterium</i>
<i>Tetragenococcus</i>	
Yüksek G+C oranı (> %50)	
<i>Bifidobacterium</i>	

*E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* insan feçeslerinden sıklıkla izole edilmesine rağmen, domuz, sığır ve koyun gibi çiftlik hayvanlarında daha az yaygındırlar (Tablo 2.11) (Klein, 2003). Enterokoklar sadece sıcakkanlı hayvanlarla ilişkili değil aynı zamanda toprak, yüzey suları, bitkiler, sebzeler ve haşereler üzerinde de bulunurlar.

Enterokokların pastörizasyon sıcaklıklarına direnci ve farklı substrat ile düşük ve yüksek sıcaklık, ekstrem pH ve tuz konsantrasyonları gibi gelişme koşullarına adapte olma yetenekleri bunların süt ve et gibi çiğ metaryallerden üretilen gıda ürünleri ile ısıtma işlemi uygulanan gıda ürünlerinde de bulunabileceği anlamına gelir. Bu durum enterokokların gıda üretiminin olağan koşullarına dirençli oldukları anlamındadır (Franz, 1999, 2003; Giraffa 2003; Moreno et al., 2006). Bununla birlikte enterokoklar proses boyunca son ürünü de kontamine edebilirler. Bu nedenle, enterokoklar özellikle fermente peynir ve etlerde, fermente gıda mikrobiyolojisinin önemli bir bölümünü oluştururlar. Enterokokların fermente gıda ürünlerinin organoleptik özelliklerine katkısı ve bakteriyosin (enterosin) üretme kabiliyetleri, bunların gıda teknolojisinde uygulamaları için önemli karakteristikleridir (Franz, 1999, 2003; Giraffa 2003; Hugas et al., 2003; Sarantinopoulos, 2001; Moreno et al., 2006).

Tablo 2.11. Gıdalarda enterokokların ekolojisi

Tür	Peynir	Balık	Et	Domuz Karkası	Taze Sosis	Kıyılmış Sığır Eti
<i>E. faecalis</i>	(+)	+	+	++	++	++
<i>E. faecium</i>	++	(+)	++	(+)	-	(+)
<i>E. durans/hirae</i>	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>E. gallinarum</i>	-	(+)	(+)	ND	ND	(+)
<i>E. casseliflavus</i>	-	-	(+)	ND	ND	-
<i>E. mundtii</i>	-	(+)	(+)	ND	ND	ND
<i>E. avium</i>	ND	ND	ND	ND	ND	-
<i>E. malodoratus</i>	ND	ND	ND	(+)	(+)	ND
<i>E. pseudoavium</i>	ND	ND	ND	(+)	-	ND
<i>E. raffinosus</i>	ND	ND	ND	(+)	-	ND

++: olağan; +: sık sık; (+): arasıra; -: bahsedilmemiş; ND: belirlenmemiş

### 2. 3. 4. Enterokoklar Tarafından Bakteriyosin Üretimi

Grup D streptokokların bakteriyosin benzeri madde ürettikleri ilk kez 1955'te bildirilmiş ve bu tarihten itibaren çok sayıda enterosin bulunmuştur (Haveraar et al., 1992). Bugüne kadar tespit edilen enterosinlerin sınıf I, sınıf II (a ve c grubu) ve sınıf III bakteriyosinlerinin özelliklerini taşıdığı belirlenmiştir. *E. faecalis*'in ürettiği iki bileşenli sitolisin sınıf I; *E. faecium* tarafından üretilen enterosin A, enterosin P ve enterosin CRL35; *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosin 31 ve *E. mundtii* tarafından üretilen mundtis sınıf IIa'ya ve *E. faecalis*'in ürettiği enterosin AS-48, enterosin 1071A ve 1071B, *E. faecium*'un ürettiği enterosin B, enterosin L50A ve L50B ve enterosin Q sınıf IIc'ye örnek olarak verilebilir (Moreno et al., 2003). Sınıf I, sınıf IIa, sınıf IIc ve sınıf III bakteriyosinleri içinde yer alan enterosinler Tablo 2.12'de gösterilmiştir. Literatürlerde diğer enterosinlerin ilk olarak yeni enterosinler olduğu düşünülmüş fakat varolanlara gerçekten benzedikleri görülmüştür. Bunlar da Tablo 2.13'de listelenmiştir. Ek olarak *E. faecalis* suşları tarafından üretilen bakteriyosinler şunları kapsar:

Tip 1: *E. faecalis* DS16'dan sitolisin (bakteriyosin/hemolizin). Bu 2 bileşenli lantibiyotik, hem hemolisin hem de bakteriyosin aktivitesi gösterir.

Tip 2: *E. faecalis* S-48'den siklik peptid antibiyotik AS-48 (enterosin AS-48). Bu bileşik hem Gram (+) hem de Gram (-) bakterilere karşı etkilidir. Tersine, benzer olarak *E. faecalis* INIA 4 tarafından üretilen enterosin 4 sadece Gram (+) bakterilere etkilidir.

Tip 3: Dar antimikrobiyal spektrum ile *E. faecalis* YI17'den bakteriyosin 31.

Tip 4: *E. faecalis* BEF 1071'den enterosin 1071A ve enterosin 1071B. Bu enterosinler Tip 2'den daha dar bir aktivite spektrumu ve *E. faecalis* tarafından üretilen Tip 3 enterosinlerden de geniş aktivite spektrumu gösterirler.

*Enterococcus* spp. tarafından üretilen bakteriyosinler (enterosinler) izolasyonu ve karakterizasyonu hakkında bir çok çalışma vardır. Enterosinler, gıdalar (peynir, et, balık ve sebzeler), hayvanlar ve insanları kapsayan farklı kaynaklardan izole edilen suşlardan elde edilmişlerdir. Tablo 2.14 farklı kaynaklardan çalışılmış bakteriosinogenik *Enterococcus* suşlarının ( $Bac^+$ ) bir derlemesi verilmiştir (Moreno et al., 2006).

Tablo 2.12. Enterokoklar tarafından üretilen sınıf I, sınıf II ve sınıf III bakteriyosinleri (enterosinler)

Sınıf	Bakteriyosin	Üretici Suş
Sınıf I	Cyl LL Cyl LS	<i>E. faecalis</i> DS16 <i>E. faecalis</i> DS16
Sınıf IIa	Enterosin A Enterosin CRL 35 Bakteriyosin 31 Enterosin P Mundtisin Bakteriyosin RC714 Enterosin SE-K4	<i>E. faecium</i> CTC492 <i>E. faecium</i> CRL 35 <i>E. faecalis</i> Y1717 <i>E. faecium</i> P13 <i>E. mundtii</i> AT06 <i>E. faecium</i> RC714 <i>E. faecalis</i> K-4
Sınıf IIc	Enterosin AS-48 Enterosin B Enterosin L50A Enterosin L50B Enterosin EJ97 Enterosin Q Enterosin 1071A Enterosin 1071B Enterosin RJ-11	<i>E. faecalis</i> S-48 <i>E. faecium</i> T136 <i>E. faecium</i> L50 <i>E. faecium</i> L50 <i>E. faecalis</i> EJ97 <i>E. faecium</i> L50 <i>E. faecalis</i> BEF 1071 <i>E. faecalis</i> BEF 1071 <i>E. faecalis</i> RJ-11
Sınıf III	Enterolisin A	<i>E. faecalis</i> LMG 2333

Tablo 2.13. Varolan enterosinlere benzer literatürde tanımlanan diğer enterosinler

Enterosin	Mevcut enterosin	Üretici Suş
Enterosin 4 Enterokoksin EFS2 Bakteriyosin 21 Enterosin 7C5 Enterosin 900	Enterosin AS-48	<i>E. faecalis</i> INIA 4 <i>E. faecalis</i> EFS2 <i>E. faecalis</i> OG1X <i>E. faecium</i> 7C5 <i>E. faecium</i> BFE 900
Enterosin 1146 Enterosin EFM01 Enterosin P21 Enterosin 81 Enterosin N15 Enterosin BC25 Enterosin CCM 4231 Enterosin 900	Enterosin A	<i>E. faecium</i> DPC1146 <i>E. faecium</i> EFM01 <i>E. faecium</i> P21 <i>E. faecium</i> WHE 81 <i>E. faecium</i> N15 <i>E. faecium</i> BC 25 <i>E. faecium</i> CCM 4231 <i>E. faecium</i> BFE 900
Enterosin P21 Enterosin 81 Enterosin RZS C13 Enterosin RZS C5	Enterosin B	<i>E. faecium</i> P21 <i>E. faecium</i> WHE 81 <i>E. faecium</i> RZS C13 <i>E. faecium</i> RZS C5
Enterosin I Enterosin B2	Enterosin L50	<i>E. faecium</i> 6T1a <i>E. faecium</i> B2
Enterosin AA13 Enterosin G16 Enterosin B1 Enterosin B2	Enterosin P	<i>E. faecium</i> AA13 <i>E. faecium</i> G16 <i>E. faecium</i> B1 <i>E. faecium</i> B2
Enterosin 1071A	Enterosin 1071A	<i>E. faecalis</i> FAIR-E 309
Enterosin 1071B	Enterosin 1071B	<i>E. faecalis</i> FAIR-E 309
Enterosin B2	Enterosin 1071	<i>E. faecium</i> B2

Tablo 2.14. Farklı kaynaklardan izole edilen bakteriyosinogenik enterokok suşları

Kaynak	Suş
Süt Ürünleri	<i>E. faecium</i> DPC1146 <i>E. faecium</i> 7C5 <i>E. faecium</i> RZS C5 <i>E. faecalis</i> INIA 4 <i>E. faecium</i> CRL 35 <i>E. faecium</i> WHE 81 AS-48 üretici suşlar <i>E. faecalis</i> TAB 28 <i>E. faecalis</i> FAIR-E 309 <i>E. faecium</i> FAIR E-198
Fermente sosisler	<i>E. faecium</i> L1 <i>E. faecium</i> CTC492 <i>E. faecalis</i> EFS2 <i>E. faecium</i> T136 <i>E. faecium</i> P13 <i>E. faecium</i> L50 <i>E. faecium</i> AA13 <i>E. faecium</i> G16 <i>E. faecium</i> P21
Diğer fermente gıdalar	<i>E. faecium</i> N15 <i>E. faecium</i> B1 <i>E. faecium</i> B2
Balık Sebzeler	<i>E. faecalis</i> 226 <i>E. faecium</i> BFE 900 <i>E. mundtii</i> ATO6 <i>E. faecium</i> 6T1 a
Silaj	<i>E. faecium</i> suşları <i>E. faecium</i> RZS C13 <i>E. faecium</i> NIAI 157 <i>E. faecalis</i> K-4
Veteriner orijinli	<i>E. faecium</i> CCM 4231 <i>E. faecium</i> BC25 <i>E. faecium</i> J96 <i>E. faecalis</i> BFE 1071 <i>E. gallinarum</i> 012
Su	<i>E. faecalis</i> EJ97
İnsan orijinli	<i>E. faecalis</i> S-48 <i>E. faecium</i> Y1717 <i>E. faecium</i> RC714

Kramer and Brandis (1975), *E. faecium* E1 tarafından üretilen enterosin E1A'nın anti-*Listeria* aktivitesini bildirmişlerdir. Günümüzde enterokokların *Listeria* türlerini, enterokoklar ve listeria arasındaki yakın filogenetik ilişki ile açıklanabilecek inhibe etme kabiliyeti iyi bilinmektedir.

Saflaştırılan ilk enterosin *E. faecalis* S-48 tarafından üretilen ve bir siklik peptid antibiyotik olarak tanımlanan enterosin AS-48'dir. Bundan sonra yeni enterosinlerin karakterizasyonu artmıştır. Fakat bu moleküllerin çoğunun DNA sekansı belirlenmemiştir.

Enterokokal bakteriyosinler genellikle *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *E. coli* ve *Vibrio cholerae* gibi bazı Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı inhibitör aktiviteye sahiptirler (Sarantinopoulos et al., 2001; Moreno et al., 2003). Wachsman et al. (1999) enterosin CRL 35'in antiviral aktivitesini bildirmişlerdir.

Enterosinler, proteinaz K,  $\alpha$ -kimotripsin, tripsin ve pepsin gibi bazı proteolitik enzimlere karşı duyarlıyken lipaz, amilaz ve katalaz enzimlerine karşı dayanıklıdırlar. Geniş pH aralıklarında aktivite gösteren enterosinler, asidik pH'larda daha fazla aktiftirler. Donma ve buzdolabı koşulları ile yüksek sıcaklığa (100°C) dayanıklıdırlar. Liyofilizasyonla kurutmadan sonra uzun süre stabilitelelerini koruyabilmektedirler (Moreno et al., 2003).

### 2.3.5. Gıda Endüstrisinde Enterosin Üreten Enterokokların Kullanımı

Bakteriyosin üreten enterokokların starter kültür, co-kültürler (adjunct kültür) veya koruyucu kültürler olarak kullanılması gıda fermantasyon proseslerinde enterosinlerin direkt eklenmesinin yanında fermantasyon teknolojileri arasında büyük ilgi noktasıdır. Bu enterokok kültürlerinin ve/veya üretilen ilgili enterosinlerin uygulanabilirliği çeşitli fermente gıda ürünlerinin (çoğunlukla peynir ürünleri) küçük pilot-derece koşullarında çalışılmıştır. Fakat büyük endüstriyel gıda üretimi koşullarında bu suşların fonksiyonelliği hala bilinmemektedir.

Giraffa et al. (1994), enterokokların rennet varlığında sütte bakteriyosin üretmeye elverişli olduğunu göstermişlerdir. Nunez et al. (1997) *E. faecalis* INIA 4'ün, Manchego

peynirinin üretimi boyunca kendi enterosinini sütün doğal mikroflorası ile yarışmalı olarak ürettiğini ve ilk hafta boyunca peynirde enterosin aktivitesinde artış olduğunu gözlemişlerdir. Taleggio peynir üretimi ve olgunlaşması boyunca, Giraffa et al. (1995) *E. faecium* 7C5 tarafından bakteriyosin üretiminin serum ayrılması süresince başladığını ve genellikle peynir tuzlamanın hemen ardından maksimum miktara ulaştığını göstermişlerdir. Olgunlaşma boyunca enterosin stabilitesinin etkilenmediğini ve üstelik *E. faecium* 7C5'in Taleggio peynirinin yüzeyinde *L. monocytogenes* gelişmesini inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

*E. faecium* FAIR-E 98, Feta peynirinin üretimine benzeyen koşullar altında iyi gelişebilmesine rağmen enterosin üretiminin düşük veya ihmal edilebilecek düzeyde olduğu bildirilmektedir. Enterosin 1146 ile zıt olarak, Feta peyniri üretiminde aynı suşun bir adjunct starter kültür olarak kullanıldığı zaman enterosin aktivitesi belirlenmemiştir. Buradan sütte enterokokların co-kültürler olarak kullanıldığında enterosin üretiminin saf kültürler olarak kullanıldığı zamandan daha düşük olabileceği olgusu çıkarılabilir. Bir başka açıklama da, bu teknolojinin tüm spesifik koşulları altında enterosin üretilmediği veya üretildiği fakat peynir matriksine adsorbe olması nedeniyle belirlenemediği olabilir. Farias et al. (1999), *Listeria* ile kontamine olmuş keçi peyniri yapımında enterosin CRL 35 kullanmışlar ve araştırmada olgunlaşma boyunca enterosin CRL 35'in aktivitesi belirlenmemesine rağmen, *Listeria*'nın tüm olgunlaşma periyodu boyunca baskılandığını saptamışlardır (Moreno et al., 2006).

Yapılan bir çalışmada, *E. faecalis* A-48-32'den üretilen enterosin AS-48'in meyve sularında bozulma etmeni olan *Alicyclobacillus acidoterrestris*'e karşı etkisi incelenmiş ve bu bakterinin enterosin AS-48 (25µg/ml) tarafından inaktif edildiği ve 14 gün boyunca gelişmediği gözlenmiştir (Grande et al., 2005).

Çeşitli fermente et ürünlerinden birçok bakteriyosin üreten enterokokal suşlar izole edilmesine rağmen, bu suşların et ürünlerinin üretiminde uygulanmasını amaçlayan çok sınırlı sayıda çalışma yürütülmüştür. *E. faecium* suşlarının adjunct starter kültürler veya bunların enterosinlerinin fermente et ürünlerinde kullanımı için bazı girişimler yapılmıştır. *E. faecium* RZS C13 ve *E. faecium* CCM 4231 İspanyol tip kuru fermente sosislerin

üretimi için starter kültür olarak kullanılmışlardır ve *Listeria* spp.'ın gelişimini kuvvetlice inhibe ettikleri belirlenmiştir. Aymerich et al. (2000), farklı et ürünlerine *E. faecium* CTC 492 tarafından üretilen enterosin A ve B'yi yarı-saflaştırılmış gıda katkıları olarak uygulamışlardır. *Listeria*'nın gelişimi üzerine bir inhibitör etki belirlenmiştir. Fakat, üretici süşun tek starter olarak eklenmesi kuru fermente sosislerde, *Listeria*'nın gelişiminin inhibisyonu üzerine etkisinin olmadığı ancak hem *E. faecium* CTC 492 ve hem bunun enterosinlerinin kombinasyonu birlikte kullanıldığında dilimlenmiş pişmiş jambonda yapışkanlığı önlediği tespit edilmiştir.

*E. faecium* CRL 35 tarafından üretilen enterosin CRL35'in antilisteriyal etkisi hem besiyerinde hem de et sisteminde *L. monocytogenes* ve *L. innocua*'ya karşı test edilmiş ve sonuçta her iki *Listeria* türünün sayısının azaldığı belirlenmiştir. Et model sisteminin organoleptik özellikleri olumsuz yönde etkilenmemiştir.

Kuru fermente Hornad salamında *L. monocytogenes* kontaminasyonu kontrolünde enterosin CCM 4231'in etkinliği incelenmiş ve araştırma sonucunda bakteriyosin ilavesinden hemen sonra kontrolle karşılaştırıldığı zaman *L. monocytogenes*'in 1,67 log azaldığı, bir hafta sonra *L. monocytogenes* kontrol örneğinde  $10^7$  kob/g ulaşırken deney örneğinde bu sayının  $10^4$  kob/g'a ulaştığı gözlenmiştir (Moreno et al., 2006).

Model sosis kullanılarak yapılan bir başka çalışmada *E. faecalis* A-48-32 tarafından üretilen enterosin AS-48 düşük konsantrasyonda (112 AU/g) ilave edildiğinde listeria sayısını belirgin şekilde azalttığı, yüksek konsantrasyonda (225 AU/g) katıldığında ise listeria sayısının 3 gün inkübasyonun sonunda belirleme değerinin altında kaldığı saptanmıştır. Fakat 9 gün sonra listeria gelişimi tekrar belirlenmiştir (Ananou et al, 2005a).

Bir başka çalışmada ise enterosin AS-48'in 30 veya 40 µg/g konsantrasyonlarda sosise ilave edildiği zaman *Staphylococcus aureus*'un çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür (Ananou et al., 2005b).

Yapılan çalışmalar, antilisterial ajan olarak bazı enterosinlerin kullanılabilirliğini kısıtlayan faktörler olduğunu göstermiştir. *Listeria*'nın ve diğer gıda kaynaklı patojenlerin veya bozulma etmeni mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmek için bakteriyosinlerin

optimal kullanımı bunların duyarlı suşlara karşı aktivitelerini ve etkinliklerini kısıtlayabilecek faktörlerin detaylı araştırılması gerekir. Bu faktörler, gıdanın yapısı ve kompozisyonu ve bunların bakteriyosin ile ilişkilerinin tam ve eksiksiz ortaya konmasıdır. Sonuç olarak, gıda fermentasyonu boyunca enterosinin miktarının maksimize edilmesi, doğal olarak yüksek bakteriyosin üretme kapasitesindeki enterokokal suşların seçimi ve çok daha önemlisi hangilerinin gıda ortamına daha iyi adapte olduklarının bilinmesi büyük bir ihtiyaçtır (Moreno et al., 2006).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Gıda Örnekleri

Bu çalışmada, Tokat yöresinde üretilen geleneksel gıda ürünlerinden örnekler temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan izolasyon kaynakları peynir (25), çiğ süt (6), tereyağ (3), çökelek (3), kefir (1), kımız (1), çiğ et (2), sucuk (3), buğday (2), arpa (1), mısır (2), turp (3), turşu (3), salatalık (1), soğan (1), sarımsak (1), patates (1), domates (1), kabak (1), patlıcan (1), yeşil fasulye (1), üzüm (1), erik (1), armut (1), muz (1), incir (1) ve ton balığıdır (1). Örnek toplama ve izolasyon işlemleri 6 aylık bir zaman periyoduna yayılmıştır. Örnekler mikroorganizmaların izolasyon işlemleri tamamlanıncaya kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Örnekler temin edildikten hemen sonra izolasyon işlemine geçilmiştir. Araştırma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarında yapılmıştır.

##### 3.1.2. Bakteri Kültürleri ve Besiyerleri

Çalışmanın amaçlarından birisi, izole edilen suşların patojen ve patojen olmayan mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin test edilmesi olduğu için bu suşların bazı indikatör organizmalar üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır. İndikatör test mikroorganizmaları olarak *Lactobacillus plantarum*, *Esheriachia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecalis* kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan indikatör mikroorganizmalar Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü ve Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir. Laktik asit bakterileri % 20 gliserol içeren de Mann Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinde, diğer

bakteriler ise % 20 gliserol içeren Brain Hearth Infusion (BHI) besiyerinde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmişlerdir.

Araştırmada gıda örneklerinden bakterilerin izole edilmesinde Nutrient broth (Tablo 3.1), izole edilen bakteriler ile patojen mikroorganizmaların geliştirilmesinde ise BHI (Tablo 3.2), indikatör bakterilerden laktik asit bakterilerin geliştirilmesinde MRS besiyeri (Tablo 3.3) kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Nutriet broth'un kimyasal bileşimi

Bileşen	Miktar(g/L)
Et Ekstraktı	3,0
Pepton	5,0
Agar	12,0

Tablo 3.2. BHI besiyerinin kimyasal bileşimi

Bileşen	Miktar(g/L)
Brain Hearth İnfusion Ekstraktı	17,5
Triptoz	10,0
Glukoz	2,0
Sodyum klorür	5,0
Disodyumhidrojen fosfat	2,5

Tablo 3.3. MRS besiyerinin kimyasal bileşimi

Bileşen	Miktar(g/L)
Et Ekstraktı	10,0
Maya Ekstraktı	5,0
Pepton	10,0
Agar	12,0
Glukoz	20,0
Potasyum fosfat	2,0
Mağnezyum sülfat	0,2
Manganez sülfat	0,05
Tween 80	1,08
Amonyum sitrat	2,0

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Bakteri Kültürlerinin İzolasyon İçin Hazırlanması**

Gıda örneklerinden steril kabinde steril bıçak, pens ve spatülalar vasıtasıyla 10 gram alınıp 90 ml Nutrient Broth besiyerine aktarılmış ve karıştırılarak homojenize edilmiştir. 1-3 saat 25°C’de bekletildikten sonra  $10^{-6}$ - $10^{-7}$ ,ye kadar bir dizi dilüsyon hazırlanmıştır. Dilüsyon sıvısı 1 gram peptonun 1000 ml hacme destile su ile tamamlanmasıyla hazırlanmıştır.

### **3.2.2. Bakteri Kültürlerinin İzolasyonu**

Gıda örneklerindeki mikroorganizmaların aktifleştirilmesinde Nutrient agar kullanılmıştır. Bölüm 3.2.1’de hazırlanan dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak Nutrient agar’a 2’şer paralelli olacak şekilde aktarılmış ve drigalski spatülü ile petri döndericisi kullanılarak yayma işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

### **3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Testleri**

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde Mayr-Harting et al. (1972) tarafından bildirilen “Sandviç Yöntemi” kullanılmıştır. Laktik asit bakterileri için % 0,8 agarlı MRS, diğer bakteriler için ise % 0,8 agarlı BHI besiyerleri eritilip 35-40°C’ye soğutulduktan sonra üzerine 3.1.2’de belirtilen indikatör mikroorganizmalar ilave edilmiştir. İndikatör mikroorganizmaları içeren yumuşak agarlı besiyerleri 3.2.2.’de izole edilen ve 30-300 arasında koloni bulunan petrilere eklenmiştir. Besiyeri katılaştıktan sonra petrilere indikatör bakterilerin optimum gelişme sıcaklıklarında 32°C ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda 2 mm ve daha büyük inhibisyon zonu gösteren kolonilerin pozitif olduğu kabul edilerek değerlendirilmeye alınmıştır.

### 3.2.4. Bakteriyosin Üreten Bakterinin İzolasyonu ve Tanısı

Sandviç yöntemi ile indikatör mikroorganizmalara karşı inhibitör aktivite gösteren koloniler izole edilip MRS besiyerine öze yardımı ile aktarılmıştır. Genel mikrobiyolojik yöntemlerden Gram boyama, spor boyama, optimum gelişme sıcaklığı ve pH'sı, geliştirdiği NaCl konsantrasyonu, kanlı agardaki aktivitesi, Voges Proskauer testi, indol testi, katalaz testi, jelatin hidroliz testi, sütte asit üretimi, glikoz sıvı besiyerinde (Glikoz Broth) oluşturduğu en son asitlik, karbonhidrat fermantasyon testi (API Strep 50 ve API 50 CHL) ve yağ asidi profili gibi teknikler kullanılarak bakterilerin tanısı yapılmıştır.

#### 3.2.4.1. Gram Boyama

İzolatların 18-24 saatlik genç kültürleri Gram boyama işlemine tabi tutulmuş ve mavi-mor renkli koloniler Gram pozitif, kırmızı-pembe renkli koloniler ise Gram negatif olarak kabul edilmiştir (Temiz, 2000). Kontrol olarak *Lactobacillus plantarum* ve *E. coli* kullanılmıştır.

#### 3.2.4.2. Spor Boyama

İzolatların yaşlı kültürleri spor boyamaya tabi tutulmuş ve hücre içerisine malaşit yeşili boyasını alanlar endospor pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). Kontrol olarak endospor pozitif olan *Bacillus cereus* kullanılmıştır.

#### 3.2.4.3. Voges-Proskauer Testi

Glukoz-fosfat broth sıvı besiyerine bakteri izolatu aşılanmış ve 37°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüplerin üzerine  $\alpha$ -naftol (6 g  $\alpha$ -naftol/100 ml % 95'lik etanol) ve 0,5 ml KOH (16 g KOH/100 ml saf su) çözeltisi ilave edilmiştir.

20 saniye kuvvetlice çalkalanan tüplerde 5 dakika içerisindeki kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). *E. coli* kontrol olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.4.4. İndol Testi**

Trypton water besiyerine bakteri izolatu aşılansmış ve 37°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben kültüre 0,5 ml Kovac's ayıracı aktarılmış ve tüp çalkalanmıştır. Kültür sıvısının üst kısmında kırmızı renkli halkanın oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). *E. coli* biyotip I kontrol olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.4.5. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi**

İzole edilen suşlar MRS sıvı besiyerine % 1 oranında aşılansarak 4, 15, 30, 37, 45, 55 ve 60°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 24, 48, 72 saatlerinde örnek alınarak 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Lambda EZ Perkin Emler, ABD) okuma yapılmıştır. Gelişme gösterenler pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak işaretlenmiştir (Axelsson, 1993). Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır.

#### **3.2.4.6. Farklı pH' larda Gelişme Testi**

İzole edilen mikroorganizmalar 5 M ve 0,01 M fosforik asit ve NaOH ile pH'ları 4,5, 6,0, 8,0, 9,2 ve 9,6' ya ayarlanan MRS sıvı besiyerlerine % 1 oranında ilave edilip 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma yapılmış ve gelişme gösterenler pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Axelsson, 1993). Bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.4.7. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Durumu**

İzole edilen suşlar % 3,0, 4,0, 6,5 ve 10 tuz konsantrasyonu içeren MRS sıvı besiyerine % 1 oranında inoküle edilip 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme gösterenler pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak kabul edilmiştir (Axelsson, 1993). Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır.

#### **3.2.4.8. Hemoliz Testi**

18-24 saatlik bakteriyosin üreten kültürlerden öze yardımı ile örnek alınarak kanlı agar'a sürme yöntemine göre ekim yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kolonilerinin etrafında opak bir zon oluşmuşsa  $\beta$ -hemoliz; bulanık ve yeşilimsi zona  $\alpha$ -hemoliz, zon oluşmamışsa  $\gamma$ -hemoliz olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). Pozitif kontrol olarak *Listeria monocytogenes* kullanılmıştır.

#### **3.2.4.9. Katalaz Testi**

İnhibisyon aktivitesi gösteren bakteri MRS agar'da geliştirilmiş üzerine 1 ml % 3'lük hidrojen peroksit aktarılmıştır. Gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif olarak kabul edilmiştir (Temiz, 2000). Testte pozitif indikatör olarak *S. aureus* kullanılmıştır.

#### **3.2.4.10. Hareketlilik Testi**

MRS broth besiyerinde hazırlanan inhibisyon aktivitesi gösteren bakteri kültüründen yumuşak agarlı (% 0,8) MRS agar besiyerine iğne öze ile saplama ekim yapılmıştır. Diğer bir yumuşak agarlı besiyerine alevde tutularak sterilize edilmiş bir iğne öze ile örnek alınmaksızın saplama ekim yapılmış ve bu tüp de diğeri ile birlikte 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnokülasyonu takiben, inokülasyon hattının yanlarına

doğru yayılmış, bulanıklık şeklinde üreme görölen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir. (Temiz, 2000). Pozitif kontrol için *Proteus mirabilis* kullanılmıştır.

#### **3.2.4.11. Jelatin Hidrolizi Testi**

Bu test için % 10-15 jelatin içerecek şekilde tüpte hazırlanan Nutrient broth besiyeri kullanılmıştır. MRS broth besiyerinde hazırlanan inhibisyon aktivitesi gösteren bakteri kültüründen tüpte hazırlanan bu besiyerine saplama ekim yapılmış ve tüpler 20-25°C’de 10-30 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde sıvılaşıma meydana gelip gelmediği hergün kontrol edilmiştir (Temiz, 2000). Negatif kontrol olarak ekim yapılmamış besiyeri, pozitif kontrol olarak *Bacillus subtilis* kullanılmıştır.

#### **3.2.4.12. Sütte Asit Üretimi**

UHT süte % 1 oranında bakteri ilave edilip 37°C’de inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işleminin belirli aralıklarında (6, 16, 24. saat ve 7. gününde) örnek alınıp pH metre ile pH değeri ölçölmüştür.

#### **3.2.4.13. Glikoz Broth Besiyerinde Oluşturulan En Son Asitlik**

Glikoz Broth besiyerine % 1 oranında izole edilen bakteri inoküle edilmiş ve 32°C’de 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi sonunda kültür ortamının pH değeri belirlenmiştir.

#### **3.2.4.14. Karbonhidrat Fermantasyon Testleri**

İzolatların çeşitli karbonhidrat kaynaklarını kullanım kabiliyetleri API strep 20 ve API 50 CHL fermantasyon testi kullanılarak TÜBİTAK Atal'da yaptırılmıştır.

#### **3.2.4.15. Yağ Asidi Profili Testleri**

İzolatların yağ asidi profilleri Sherlock Tanımlama Sistemi (MIS) kullanılarak Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi laboratuvarlarında belirlenmiştir.

### **3.2.5. Bakteriyosinin Karakterize Edilmesi**

#### **3.2.5.1. Kaba Bakteriyosin Hazırlanması**

İzole edilen bakteri % 0,1 oranında MRS sıvı besiyerine (1 L) inoküle edilip bakterinin geliştiği optimum sıcaklıkta 15-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra bakteri kültürü 4000 x g'de 20 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı toplanmıştır. Toplanan supernatant, 0,45 µm gözenek çaplı membran filtre ile (Milipore) sterilize edildikten sonra dondurulup liyofilizasyon yöntemi ile kurutulmuştur.

#### **3.2.5.2. Bakteriyosinin Antimikrobiyal Aktivitesi ve Spektrumunun Belirlenmesi**

Hazırlanan kaba bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesi ve inhibitör spektrumu Spot-on-lawn yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Mayr-Harting et al., 1972). Aktivite arbitrary ünite (AU) olarak ifade edilmiştir. Arbitrary ünite, inhibisyon aktivitesi gösteren en son dilüsyonun tersi şeklinde tanımlanmaktadır.

Bakteriyosinin preparatları iki kat seyreltilip (1/2, 1/4, 1/8 vs.) her dilüsyondan 20 µl alınmış ve nokta halinde indikatör mikroorganizma *Lb. plantarum* içeren yumuşak agarlı MRS üzerine eklenmiştir. Bu petriler 32°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sonucunda 2 mm veya daha büyük inhibisyon zonları pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Kaba bakteriyosinin antimikrobiyal spektrumunun belirlenmesinde ise iki kat seyreltilen kaba bakteriyosin örneğinden 20 µl alınmış ve nokta halinde indikatör mikroorganizma içeren yumuşak agarlı MRS besiyeri üzerine eklenmiştir. 32-37°C'de 24 saat inkübasyon işleminden sonra 2 mm veya daha büyük inhibisyon zonları pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.5.3. Enzimlerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi**

Proteolitik ve proteolitik olmayan enzimlerin bakteriyosin aktivitesine etkisi Bhunia et al., (1988)'e göre tespit edilmiştir. Enzimler lipaz (Sigma), papain (Merck), pepsin (Merck), pankreatin (Sigma), katalaz (Sigma – Aldrich), tripsin (Sigma), proteaz (Sigma) ve amilaz (Sigma) enzimleri 4 mM (pH 7) fosfat tamponu ile konsantrasyonu 400 µg/ml olacak şekilde çözündürülüp, üzerine bakteriyosin supernatantı eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 37°C'de 1 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sonunda bakteriyosin aktivitesi Agar-Spot yöntemine göre belirlenmiştir. Bakteriyosin + fosfat tamponu, enzim + fosfat tamponu ve fosfat tamponu negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

### **3.2.5.4. Bakteriyosin Aktivitesine Isıl İşlemin Etkisi**

Kaba bakteriyosinin ısı stabilitesini belirlemek amacıyla 2'şer ml'lik kaba bakteriyosin örnekleri 60 ve 70°C'de 15 dk, 80 ve 90°C'de 15 ve 30 dk, 110 ve 121°C'de 15 dk ısı işlemine tabi tutulmuştur. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra bakteriyosin

örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Kontrol örneği olarak ısıtılmış ve soğutulmuş bakteriyosin kullanılmıştır.

### **3.2.5.5. Bakteriyosin Aktivitesine pH'nın Etkisi**

Kaba bakteriyosin örnekleri 4 mM fosfat tamponunda 250 mg/ml konsantrasyonda çözündürülmüş ve son hacimler eşit olacak şekilde pH'ları 2'den 12'ye kadar birer birim artırılarak 5 M NaOH veya 5 M fosforik asit ile ayarlanmıştır. İki saat oda sıcaklığında bekletilen örneklerin pH'sı 6,5'e ayarlandıktan sonra aktiviteleri belirlenmiştir (de Kwaadsteniet et al. 2005).

### **3.2.5.6. Bakteriyosin Aktivitesine Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi**

Depolama sıcaklığının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde bakteriyosin örnekleri 25, 4, -20, ve -80°C'de 6 saat, 2 gün, 1 hafta ve 3 ay süreyle tutulmuştur. Bu sürelerin sonunda örneklerin antimikrobiyal aktivitesi saptanmıştır Ayrıca liyofilizasyon işleminin bakteriyosin aktivitesine etkisi de incelenmiştir. Bunun için filtre sterilize edilmiş supernatantın aktivitesi belirlendikten sonra dondurulup liyofilizasyonla kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra steril fosfat tamponuyla çözündürüp başlangıç hacmine getirilmiş ve aktivitesi saptanmıştır (Yildirim and Johnson, 1998).

### **3.2.5.7. Bazı Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi**

Değişik organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesine etkisi Bhunia et al. (1988), Yildirim and Johnson (1998)'e göre saptanmıştır. Organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinde, formaldehit (% 10), kloroform (% 10), aseton (% 10), propanol (% 10), metanol (% 10), etil alkol (% 25), hekzan (% 25) ve etil eter (% 25) olacak şekilde 250 mg/ml konsantrasyonda çözündürülmüş bakteriyosin preparatına ilave edilmiş ve

25°C'de 1 saat süreyle etüvde inkübe edildikten sonra örneklerin antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Bakteriyosin içermeyen organik çözücüler ve organik çözücü içermeyen bakteriyosin örnekleri kontrol olarak kullanılmıştır.

### **3.2.5.8. Bazı Deterjanların ve Kimyasal Maddelerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi**

Bakteriyosin supernatantlarına sodyum dodesil sülfat (SDS), tween 80, üre ve triton X-100 deterjanları % 1 oranında ilave edildikten sonra 37°C'de 5 saat inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda örneklerin aktivitesine bakılmıştır. Belirtilen deterjanların % 1'lik çözeltileri ve bakteriyosin supernatantı negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Bakteriyosin supernatantında konsantrasyonu 0,1, 2,0 ve 50,0 mM olacak şekilde EDTA (etilen diamin tetra-asetik asit) ilave edilmiş ve 37°C'de 5 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda bakteriyosin aktivitesi belirlenmiştir. Bakteriyosin içermeyen EDTA'nın belirtilen çözeltileri ve bakteriyosin örneği negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

$\beta$ -merkaptöetanolün bakteriyosin aktivitesine etkisini belirlemek için bakteriyosin supernatantına % 10 ve 20 oranında  $\beta$ -merkaptöetanol ilave edilerek 90°C'de 5 dk ısıtma işlemine tabi tutulmuştur. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra bakteriyosin aktivitesi belirlenmiştir. Kontrol olarak ısıtma işlemi uygulanmış ve uygulanmamış bakteriyosin supernatantı, ısıtma işlemi uygulanmış  $\beta$ -merkaptöetanol çözeltisi kullanılmıştır (de Kwaadsteniet et al., 2005).

### **3.2.6. Bakteriyosin Üretimine Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi**

#### **3.2.6.1. Bakterinin Gelişme Sıcaklığının ve Gelişme Fazının Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi**

Bakteriyosinin hangi gelişme sıcaklığı ve hangi gelişme fazında maksimum düzeyde üretildiğini belirlemek amacıyla izole edilen bakteri MRS besiyerine % 0,1 oranında inoküle edilip 25, 32, 37 ve 45°C’de 72 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi sırasında belirli aralıklarla kültür ortamından örnek alınıp bakteriyosin aktivitesi, pH’sı ve 600 nm’deki absorbans değeri spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.

#### **3.2.6.2. Bakteriyosin Üretimine İnokülüm Miktarının Etkisi**

İnokülüm miktarının bakteriyosin üretimine etkisini belirlemek amacıyla % 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 ve 2,5 oranlarında bakteri MRS sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 32°C’de inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi süresince belirli aralıklarla steril koşullarda örnek alınıp bakteriyosin aktivite, pH ve absorbans değeri testlerine tabi tutulmuştur.

#### **3.2.6.3. Başlangıç pH’sının Bakteriyosin Üretimine Etkisi**

Başlangıç pH’sı 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 ve 8,5’e ayarlanan MRS sıvı besiyerine % 0,1 oranında bakteri ilave edilmiş ve 32°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminin 0, 8, 12 ve 24. saatlerinde örnekler alınıp bakteriyosin aktivitesi, pH değeri ve 600 nm’deki absorbans değerleri belirlenmiştir (Todorov and Dicks, 2006).

### 3.2.6.4. Farklı Besiyerlerinin Bakteriyosin Üretimine Etkisi

Farklı besiyerlerinde bakteriyosin üretimini belirlemek amacıyla BHI, PC, NB ve MRS besiyerleri kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerine % 0,1 oranında bakteri ilave edilmiş ve 32°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi süresince belirli periyotlarla örnekler alınarak bakteriyosin aktivitesi, pH değeri ve 600 nm'de absorbans değeri belirlenmiştir.

### 3.2.7. Bakteriyosinin Kısmen Saflaştırılması

MRS besiyerinde geliştirilen kültür 6000 g'de 30 dk santrifüj edilerek hücre uzaklaştırılmıştır. Hücre içermeyen süpernatantın pH'sı 10 N NaOH kullanılarak 6,5'e ayarlandıktan sonra yavaş yavaş % 40 oranında amonyum sülfat ilave edilmiş ve 4°C'de gece boyunca karıştırılmıştır. Karışım santrifüj (4°C'de 8000 g/ 60 dk) edildikten sonra yüzeyde ve altta biriken pelet toplanarak 10 ml sodyum fosfat tamponunda (pH 6,5) çözündürülmüştür. Bunu takiben 15 ml metanol/kloroform karışımı (1:2, v/v) ilave edilerek 4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Örnek santrifüj edildikten sonra pelet liyofilizasyon yöntemiyle kurutularak -80°C'de muhafaza edilmiştir (Moreno et al., 2002).

### 3.2.8. Bakteriyosinin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Bakteriyosinin molekül ağırlığı % 16 trisin-SDS-PAGE (Sodyum dodecil sülfat-Poliakrilamid jel) kullanılarak saptanmıştır (Schagger and Jagov 1987, Bhunia et al. 1991). Elektroforez işleminden sonra jel iki kısma bölünmüştür. Jellerden birisi Coomassie blue G-250 ile 1 saat boyanıp boyayı uzaklaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Antimikrobiyal aktivite testi için diğer jel Coomassie blue G-250 ile 30 dk boyanıp 1,5 saat boyayı uzaklaştırmak için yıkama işlemine (boya alma çözeltisi ile) maruz kalmıştır. Boyayı uzaklaştırma işleminden sonra, jel 3 saat süresince steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Bunu takiben büyük petri kutusunda bulunan MRS agar üzerine bu jel dikkatlice konulmuştur. Jel üzerine *Lb. plantarum* içeren 45°C'deki yumuşak MRS agar dökülüp 30°C'de 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur.

### **3.2.9. İstatistiksel analiz**

Araştırma sonunda elde edilen tüm veriler, varyans analizine tabi tutularak değerlendirilecek ve gruplar arasındaki farklılıklar Duncan testi ile belirlenecektir. Veri analizleri SPPS istatistiksel paket programı ile gerçekleştirilecektir (Anon., 1999). Tüm analizler dört tekerrürlü olacak şekilde yapılacaktır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Bakteriyosin Üreten Bakterinin İzole ve Teşhis Edilmesi

Tokat yöresinde üretilen geleneksel bazı gıdalar ile farklı sebzeler, meyveler ve hububatlar metaryal metot bölümünde ifade edildiği gibi bakteriyosin üreten bakterinin izolasyonu amacıyla incelenmiştir. Bu tarama sonucunda yöresel beyaz peynirde kullanılan indikatör bakterilere karşı inhibitör aktiviteye sahip koloniler belirlenmiştir. İnhibitör zonu veren bakteri kolonileri MRS broth besiyerine aktarılarak saf kültürleri hazırlanmıştır.

Bu çalışmada geleneksel olarak üretilmiş beyaz peynirden izole edilen, inhibitör aktiviteye sahip bakteri ve ürettiği antimikrobiyal bileşik üzerinde çalışılmaya devam edilmiştir.

Saf kültürleri hazırlanan koloniler ilk olarak genel mikrobiyolojik analizlere alınmıştır. Analizler sonucunda izole edilen bakterinin Gram pozitif, tek, ikili ve kısa zincirler halinde kok şeklinde ve hareketsiz olduğu görülmüştür. Bakterinin katalaz, hemoliz, indol ve Voges Proskauer negatif olduğu, endospor oluşturmadığı ve jelatinaz aktivitesine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Sütte gelişimi sırasında pH değerini 24 saat ve 7 gün sonra 4,44 ve 4,38 değerlerine düşürdüğü ve glikoz broth besiyerinde 24 saat sonra oluşturduğu en son asitliğin ise 4,30 pH olduğu görülmüştür. Ayrıca 45°C'den daha düşük sıcaklıklarda, pH 4,5-9,6 ve % 3,0-6,5 NaCl konsantrasyonunda gelişebildiği belirlenmiştir (Tablo 4.1).

İzolatların karbonhidrat profilini belirlemek amacıyla uygulanan API strep 20 ve API 50 CHL testinin sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. API strep 20 ve API 50 CHL testleri sonucunda cins ve tür düzeyinde yüksek bir korelasyonla izolatın *Enterococcus faecalis* olduğu belirlenmiştir. İzolatın yağ asidi profili analizi de söz konusu bakterinin *Enterococcus faecalis* olduğunu doğrulamıştır (Tablo 4.3). İzole edilen bakteri *Enterococcus faecalis* KP ve bakteriyosini ise enterosin KP olarak adlandırılmıştır.

Tablo 4.1. İnhibitör aktiviteye sahip bakterinin bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

<b>Analizler</b>	<b>İzolat</b>
Gram Boyama	+
Morfoloji	Kok
Katalaz Testi	-
Endospor Testi	-
Hemoliz testi	-
Hareketlilik	-
İndol Testi	-
Voges Proskauer	-
Jelatin Hidrolizi	-
pH Gelişme Aralığı	
pH 4,5	+
pH 6,0	+
pH 8,0	+
pH 9,6	+
NaCl Gelişme Aralığı	
% 3 NaCl	+
% 4 NaCl	+
% 6,5 NaCl	+
%10 NaCl	-
Sıcaklık Gelişme Aralığı	
10°C	+
25°C	+
37°C	+
45°C	-
Sütte asit üretimi	pH 4,38
Glikoz Broth besiyerinde oluşturulan en son asitlik	pH 4, 30

+ : Üreme var; - : Üreme yok

Tablo 4.2. İnhibitör aktiviteye sahip koloninin karbonhidrat fermantasyon profili

Karbonhidratlar	İzolat	Karbonhidratlar	İzolat
Gliserol	-	Maltoz	+
Mellobiyoz	-	Laktoz	+
Eritrol	-	Melibiyoz	-
D-Arabinoz	-	Sakkaroz	+
L-Arabinoz	-	Trehaloz	+
Riboz	+	İnulin	-
D-Ksiloz	-	Melezitoz	+
L-Ksiloz	-	D-Rafinoz	-
Adonitol	-	Amidon	+
$\alpha$ - metil-xyloside	-	Glikojen	-
Galaktoz	+	Ksilitol	-
D-Glukoz	+	$\beta$ -gentiobiyoz	-
D-Fruktoz	+	D-Turanoz	-
D-Mannoz	+	D-Lyxose	-
L-Sorboz	-	L-Tagotoz	-
Ramnoz	-	D-Fukoz	-
Dulsitol	-	L-Fukoz	-
İnositol	-	D-Arabitol	-
Mannitol	-	L-Arabitol	-
Sorbitol	-	Glukonat	+
$\alpha$ - metil-mannoz	-	2-keto-glukonat	-
$\alpha$ - metil-D- glukozit	-	5-keto-glukonat	-
N-asetil-glukozamin	+	Hippurat hidrolizi	ND
Amigdalın	-	Pyrolidonylarylamidaz	-
Esculine	+	$\beta$ -Galaktosidaz	+
Salisin	+	Lösin aminopeptidaz	+
Sellobioz	+	Arjinin dihidrolaz	+
Arbutin	+		

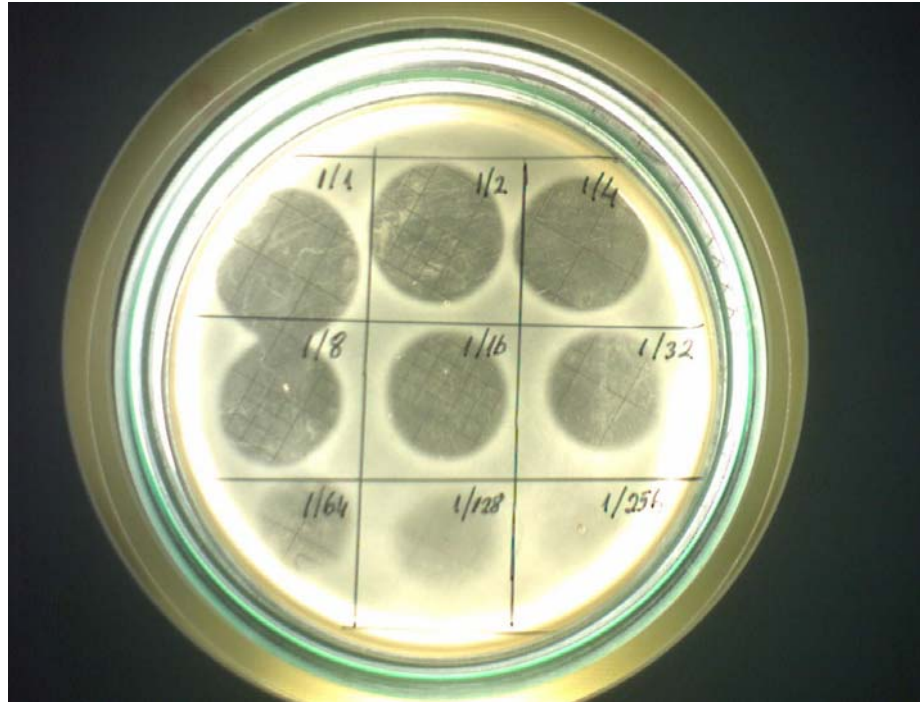
+ : Pozitif reaksiyon; - : Negatif reaksiyon; ND: Belirlenmedi

Tablo 4.3. İnhibitör aktiviteye sahip koloninin yağ asidi profili

Yağ asidi	%
Laurik Asit (12:0)	1,48
Miristik Asit (14:0)	16,12
Palmitik Asit (16:0)	33,49
Oleik Asit (18:1 w9c)	23,98
10-metilen oktadekonat (19:0 cyclo w8c)	17,18
Araşhidonik Asit (20:4 w6, 9, 12, 15c)	0,40

#### 4.2. Bakteriyosinin Antimikrobiyal Aktivitesi ve Spektrumu

Kaba bakteriyosinin *Lb. plantarum* üzerine antimikrobiyal aktivitesi, 250 mg kaba bakteriyosin 1 ml fosfat tamponunda (4 mM) çözüldürüldüğünde 1600 AU/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Kaba bakteriyosinin indikatör mikroorganizma üzerine inhibitör aktivitesi

*E. faecalis* tarafından üretilen enterosin KP'nin *Lb. plantarum*, *Lactococcus cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivonovii* ve test edilen tüm enterokok türleri üzerine antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür. Enterosin KP, kullanılan hiçbir Gram negatif bakteriye antimikrobiyal etki göstermemiştir (Tablo 4.4).

Toit et al. (2000) tarafından yapılan çalışmada *E. faecalis* suşlarının genellikle enterokok türlerine karşı etkili olduğu, *E. faecium* suşlarının ise, *Propionibacterium* spp., *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *Clostridium sporogenes* ve *Cl. tyrobutyricum*'u kapsayan geniş inhibitör aktivite spektrumuna sahip olduğu görülmüştür. Bir başka çalışmada peynirden izole edilen *E. faecium* RZS C5 suşunun listeria'ya karşı aktif bir bakteriyosin ürettiği belirlenmiştir (Leroy and Vuyst, 2002). Garcia et al. (2003 ve 2004) *E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97'nin *Bacillus macroides*, *Bacillus maroccanus* ve *Bacillus coagulans*'ın gelişimlerini inhibe ettiğini saptamışlardır. *E. faecalis* A-48-32 tarafından üretilen enterosin AS-48'in sosislerde *S. aureus* gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Ananou et al., 2005).

### 4.3. Enzimlerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

*E. faecalis* tarafından üretilen enterosin KP'nin test edilen enzimlerden sadece papaine karşı duyarlı olduğu, diğer enzimlerden ise etkilenmediği görülmüştür (Tablo 4.5). Bakteriyosin aktivitesinin lipaz ve amilazdan etkilenmemesi bakteriyosin aktivitesinde karbonhidrat ve lipit bileşenlerinin etkisinin olmadığını, katalazdan etkilenmemesi ise inhibitör aktivitenin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den kaynaklanmadığını göstermektedir. Bakteriyosinin aktivitesinin proteolitik bir enzim olan papain ile muamelenin sonucunda tamamen kaybolması antimikrobiyal etkisi olan bu molekülün protein tabiatında olduğunu kanıtlamıştır.

Tablo 4.4. Enterosin KP'nin antimikrobiyal etki spektrumu (n=4)

Bakteri	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Lactobacillus plantarum</i> (RSKK)	+++
<i>Lactobacillus plantarum</i> (AÜ)	+++
<i>Enterococcus faecium</i> (RSKK)	++
<i>Enterococcus faecalis</i> (RSKK)	++
<i>Enterococcus cloaceae</i> (AÜ)	+
<i>Enterococcus dissduens</i> (AÜ)	+++
<i>Lactococcus cremoris</i> (AÜ)	+++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (AÜ)	++
<i>Listeria monocytogenes</i> (AÜ)	+
<i>Listeria ivonovii</i> (RSKK)	++
<i>Staphylococcus aureus</i> CAMP (AÜ)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (AÜ)	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (AÜ)	-
<i>Escherichia coli</i> Tip I (AÜ)	-
<i>Rhodococcus equi</i> (AÜ)	-
<i>Hafnia alvevi</i> (AÜ)	-
<i>Salmonella enteritidis</i> (AÜ)	-
<i>Proteus mirabilis</i> (AÜ)	-
<i>Bacillus cereus</i> (AÜ)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 (AÜ)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 (AÜ)	-
<i>Citrobacter freundii</i> (AÜ)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (AÜ)	-
<i>Camphylobacter jejuni</i> (AÜ)	-

+: İnhibisyon pozitif (+++ : inhibisyon çapı 20 mm'den büyük, ++:15-20 mm, +:10-15 mm)

-: İnhibisyon negatif;

AÜ: Ankara Üniversitesi; RSKK: Refik Saydam Hıfzısıhha Kültür Koleksiyonu

Tablo 4.5. Enterosin KP üzerine farklı enzimlerin etkisi (n=4)

Enzimler	Bakteriyosin Aktivitesi
Lipaz (EC 3.1.1.3)	+
Katalaz (EC 1.11.1.6)	+
Papain (EC 3.4.22.2)	-
Tripsin (EC 3.4.21.4)	+
Pepsin (EC 3.4.23.1)	+
Pankreatin (EC 232.468.9)	+
Alfa amilaz (EC 3.2.1.1)	+

+ : inhibisyon var; - : inhibisyon yok

Toit et al. (2000) tarafından yapılan çalışmada farklı *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının bakteriyosinlerinin  $\alpha$ -kimotripsin, proteinaz K, tripsin, pronaz, pepsin ve papain ile inaktif olduğu fakat lipaz, lizozim ve katalazdan etkilenmediği belirlenmiştir. *E. faecium* N15 tarafından üretilen bakteriyosinin  $\alpha$ -kimotripsin, proteinaz K, tripsin ve pepsin gibi proteazlar ile  $\alpha$ -amilaza karşı duyarlı, lipaz enzimine ise dayanıklı olduğu görülmüştür (Losteinkit et al., 2001).

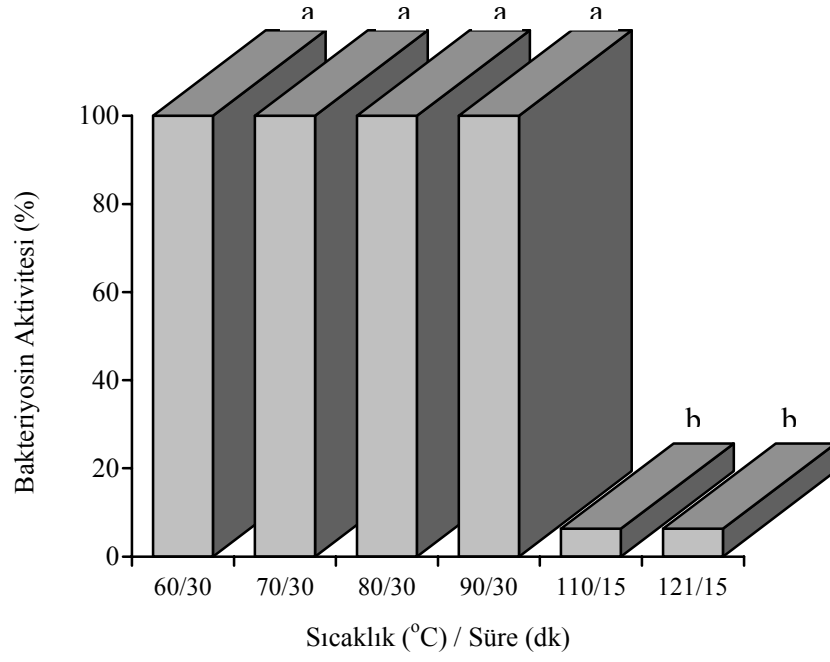
#### 4.4. Bakteriyosin Aktivitesine Isıl İşlemin Etkisi

*E. faecalis* tarafından üretilen enterosin KP'nin aktivitesinin 90°C'de 30 dakika ısıtılı işleme dayanıklı olduğu ve aktivitesini tamamen koruduğu, 121°C'de 15 dakika otoklavlama koşullarında ise aktivitesini büyük ölçüde kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 4.2).

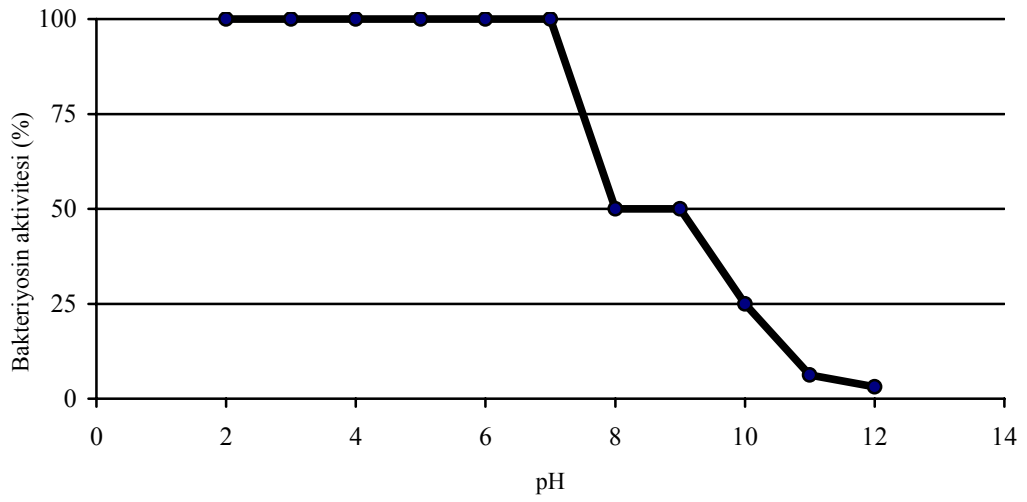
*E. faecium* N15 tarafından üretilen bakteriyosinin 100°C'de 2 saat ısıtılı işleme dayanıklı olduğu, ancak 121°C'de 15 dakika otoklavlama koşullarında aktivitesini tamamen kaybettiği görülmüştür (Losteinkit et al., 2001). Sabia et al. (2004) ısı uygulamaları sonucunda *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosinin ısıya duyarlı olduğunu, *E. casseliflavus* tarafından üretilenin ise otoklavlama işleminden sonra antimikrobiyal aktivitesini koruduğunu belirlemişlerdir.

#### 4.5. Bakteriyosin Aktivitesine pH'nın Etkisi

*E. faecalis* tarafından üretilen enterosin KP'nin aktivitesinin asidik pH'lar ile nötral pH'larda maksimum düzeyde olduğu belirlenmiştir. pH 7,0'den sonra aktivitede % 50 oranında azalma görülmüş ve pH 9,0'dan sonra aktivite büyük ölçüde (% 75-95) azalmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Enterosin KP aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi (n=4)



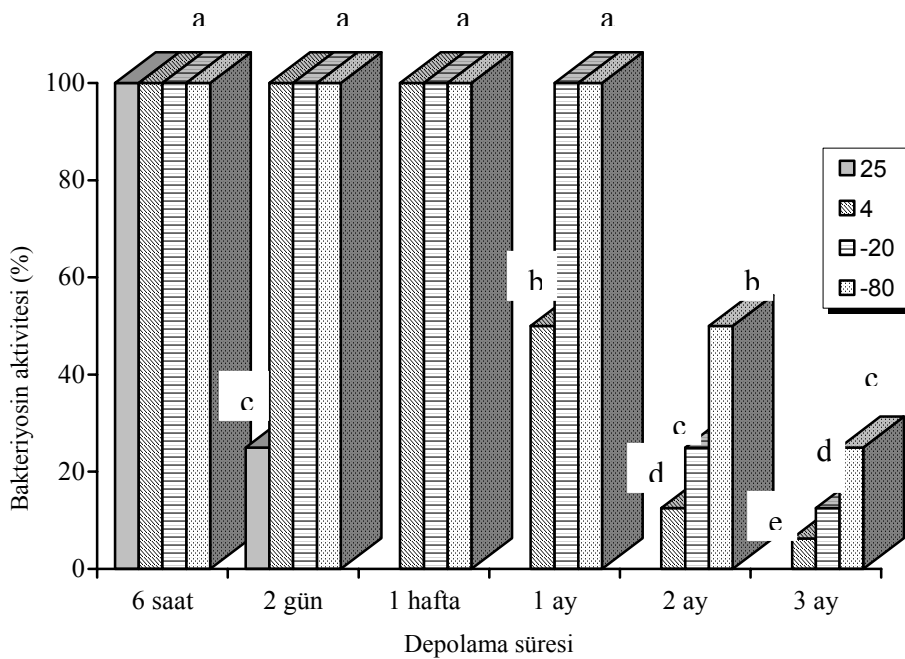
Şekil 4.3. Enterosin KP aktivitesi üzerine pH'nın etkisi (n=4)

*E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97'nin indikatör bakteriye karşı maksimum aktivitesi pH 7,0'de gözlenmiştir. pH 5,0'de aktivitede küçük bir düşüş görülürken, pH 9,0'da aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (Garcia et al., 2003).

#### 4. 6. Bakteriyosin Aktivitesine Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi

Enterosin KP'nin inhibitör aktivitesinin artan sıcaklık ve depolama sürelerinde azaldığı belirlenmiştir. -20 ve -80°C'de 1 ay depolama süresinin sonunda bakteriyosin aktivitesinde değişme görülmezken, 3 ay depolama süresinin sonunda aktivitede -20°C'de % 87,5, -80°C'de % 75 oranında azalma görülmüştür (Şekil 4.4). Liyofilizasyon işleminin ise bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Sabia et al. (2004) tarafından yapılan çalışmada *E. faecalis* ve *E. casseliflavus* tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitelerini buzdolabı koşullarında 6 ay boyunca koruduğu belirtilmiştir.



Şekil 4.4. Bakteriyosin aktivitesi üzerine depolama sıcaklığı ve süresinin etkisi (n=4)

#### 4.7. Bazı Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

*E. faecalis* KP tarafından üretilen enterosin KP'nin aktivitesinin test edilen organik çözücülerden etkilenmediği belirlenmiştir (Tablo 4.6). Organik çözücüler ile muamelenin sonucunda bakteriyosin aktivitesinin korunması, bakteriyosinin aktivitesinde rol oynayan bölgelerinde karbonhidrat ya da lipit türevli bileşenlerin olmadığını göstermektedir. Formaldehit amino asitlerin amino gruplarını bloke etmektedir. Kullanılan formaldehit konsantrasyonunda (% 10) bakteriyosin aktivitesinde değişme gözlenmemiştir.

*Lb. plantarum* LC74 tarafından üretilen plantarisin LC74'in hekzan, asetonitril, etanol, aseton ve kloroformdan etkilenmediği görülmüştür (Rekhif et al., 1994). Lee and Paik (2001) *Lactococcus lactis* NK24 tarafından üretilen bakteriyosinin etanol, metanol, aseton, toluen, isopropanol ve kloroformdan etkilenmediğini belirlemişlerdir.

Tablo 4.6. Enterosin KP'nin aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi (n=4)

Organik Çözücü	Bakteriyosin içermeyen organik çözücüler	Bakteriyosin Aktivitesi (AU/mL)
Formaldehit (%10)	+	6400
Isopropil Alkol (%10)	-	6400
Aseton (%10)	-	6400
Metanol (%10)	-	6400
Kloroform (%10)	-	6400
Etil Eter (%25)	-	6400
Hekzan (%25)	-	6400
Etil Alkol (%25)	-	6400

Organik çözücü içermeyen bakteriyosin aktivitesi (AU/ml): 6400

+ : inhibisyon var - : inhibisyon yok

#### 4.8. Bazı Deterjanların ve Kimyasal Maddelerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine test edilen SDS, üre, tween 80, triton X-100, farklı konsantrasyonlarda EDTA'nın bir etkisi olmadığı ve aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir.  $\beta$ -merkaptolanolün % 10 konsantrasyonun enterosin KP aktivitesini % 50, % 20'lik konsantrasyonunun ise % 87,5 oranında azalttığı görülmüştür (Tablo 4.7).

*E. mundtii* tarafından üretilen enterosinin karakterizasyonunun yapıldığı bir çalışmada bakteriyosin aktivitesi üzerine SDS, tween 20, tween 80, triton X-100 ile EDTA'nın bir etkisi olmadığı belirlenmiştir (de Kwaadsteniet et al., 2005). Galvez et al. (1998) *E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97'nin SDS, tween 80, EDTA ve  $\beta$ -merkaptolanolden etkilenmediğini göstermişlerdir.

Bakteriyosin aktivitesi üzerine deterjanların etkisi aktif molekülün yapısı hakkında bilgi verir. Anyonik deterjanlar proteinlerin doğal yapılarındaki hidrofobik merkezle kompleks oluşturarak proteinin açılmasına ve üç boyutlu yapısının bozulmasına sebep olur. Deterjan uygulaması ile aktivite kaybı, bakteriyosinin kısmi denatürasyonu ya da aktivitesi üzerinde stabilizasyon etkisi olan diğer moleküllerle birlikteliğinin bozulmasından kaynaklanmaktadır (Ivanova et al., 1998). EDTA, bakteriyosin aktivitesinde rol oynayan divalent katyonlarla kompleks oluşturarak bakteriyosin aktivitesini olumsuz yönde etkileyebileceği gibi hücre membranına zarar vererek bakteriyosinin etkisini kolaylaştırabilmektedir (Ganzle et al., 1999).  $\beta$ -merkaptolanol ise bakteriyosin yapısında bulunan ve aktivitesinde rol oynayan olası disülfid bağlarını kırarak bakteriyosin aktivitesinin azalmasına ya da tamamen kaybolmasına neden olmaktadır. *E. faecalis* KP tarafından üretilen enterosin KP'nin aktivitesinin  $\beta$ -merkaptolanol ile % 50-87,5 oranında azalması bu bakteriyosinin aktif bölgesinde disülfid bağlarının olduğunu göstermektedir.

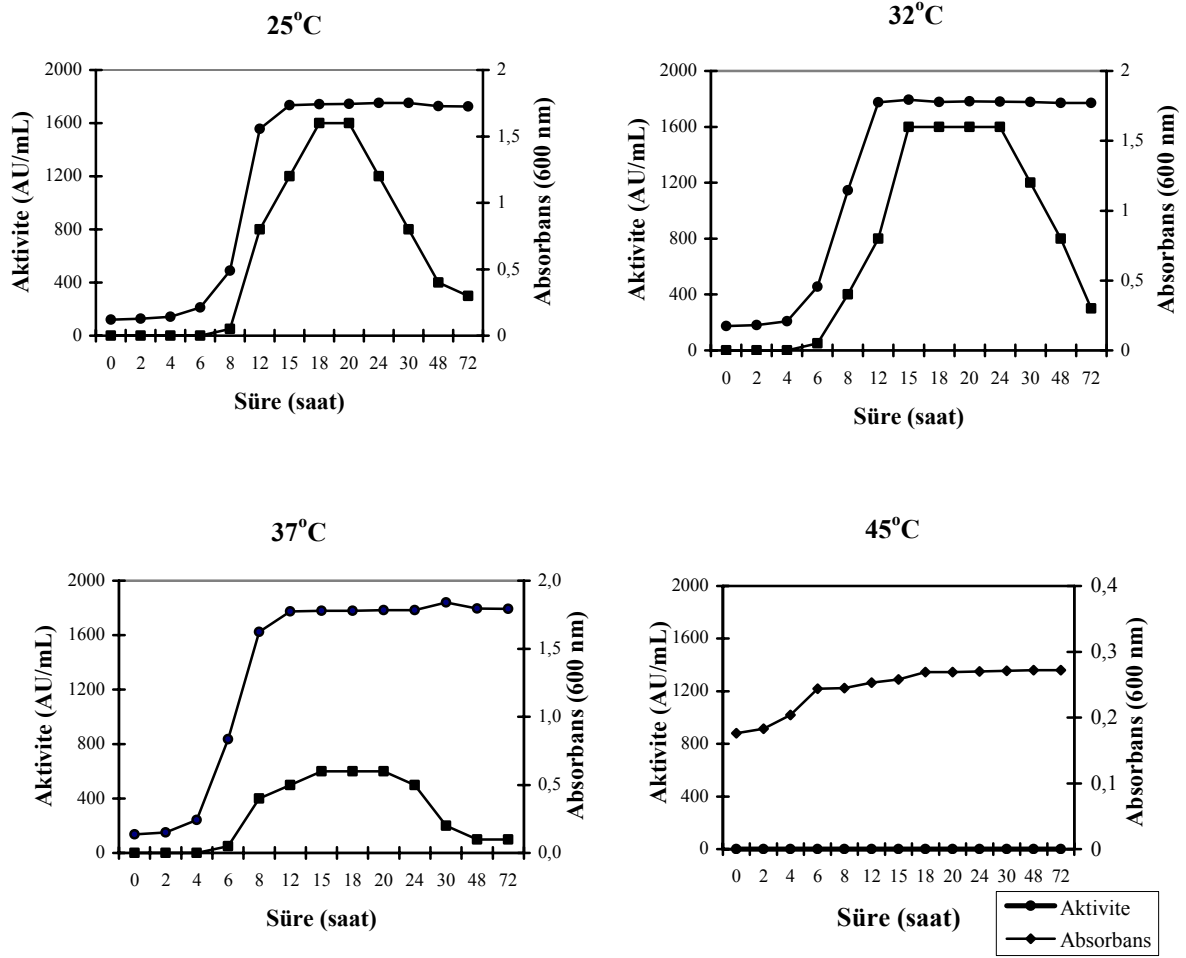
Tablo 4.7. Enterosin KP'nin aktivitesi üzerine bazı deterjan ve kimyasalların etkisi (n=4)

Deterjan ve Kimyasallar	Bakteriyosin İçermeyen Deterjan Ve Kimyasalların İnhibisyon Etkisi	Bakteriyosin Aktivitesi (%)
SDS (% 1)	-	100
Tween 80 (% 1)	-	100
Triton X-100 (% 1)	-	100
Üre (% 1)	-	100
EDTA		
0,1 mM	-	100
2,0 mM	-	100
50,0 mM	-	100
1,0 M	-	100
β-merkaptöetanol		
% 10	-	50
% 20	Sadece 1:1 dilasyonunda inhibisyon zonu (4 mm çaplı) gözlenmiştir	12,5

+ : inhibisyon var      - : inhibisyon yok

#### 4.9. Bakterinin Gelişme Sıcaklığının ve Gelişme Fazının Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi

Bakterinin gelişme sıcaklığının ve gelişme fazının enterosin KP üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla *E. faecalis* MRS broth besiyerinde 25, 32, 37 ve 45°C'de 72 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Analiz sonucunda 32 ve 37°C'de *E. faecalis*'in yoğun bir şekilde geliştiği gözlenmiştir. Enterosin KP üretiminin ise 25 ve 32°C'lerde maksimum düzeyde olduğu, ancak 32°C'de aktivitesini daha uzun süre koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5). 25 ve 32°C'lerde bakteriyosin üretimi logaritmik gelişme fazında başlamış ve durgun gelişme fazında maksimum düzeye ulaşmıştır.



Şekil 4.5. Farklı gelişme sıcaklıkları ve gelişme fazının enterosin KP üretimi üzerine etkisi (n=4)

Campos et al. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *E. faecium* USC-46 ve *E. mundtii* USC-51 tarafından maksimum enterosin üretiminin gelişimlerinin durgun fazında olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları tarafından enterosin üretiminin erken logaritmik gelişme fazında başladığı ve maksimum miktarda üretiminin ise durgun fazın başlangıcında olduğu saptanmıştır (Toit et al., 2000).

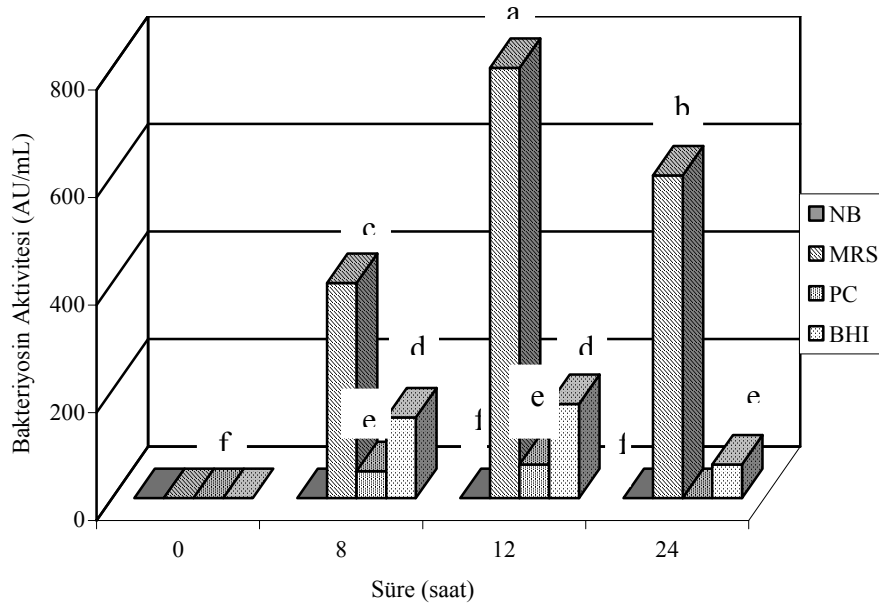
#### 4.10. Bakteriyosin Üretimine Farklı Besiyerlerinin, İnokülüm Miktarının ve Başlangıç pH'sının Etkisi

Enterosin KP üretimi üzerine farklı besiyerlerinin etkisini belirlemek amacıyla NB, PC, BHI ve MRS besiyerleri kullanılmıştır. *E. faecalis* KP'nin MRS besiyerinde daha iyi geliştiği ve maksimum düzeyde bakteriyosin ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

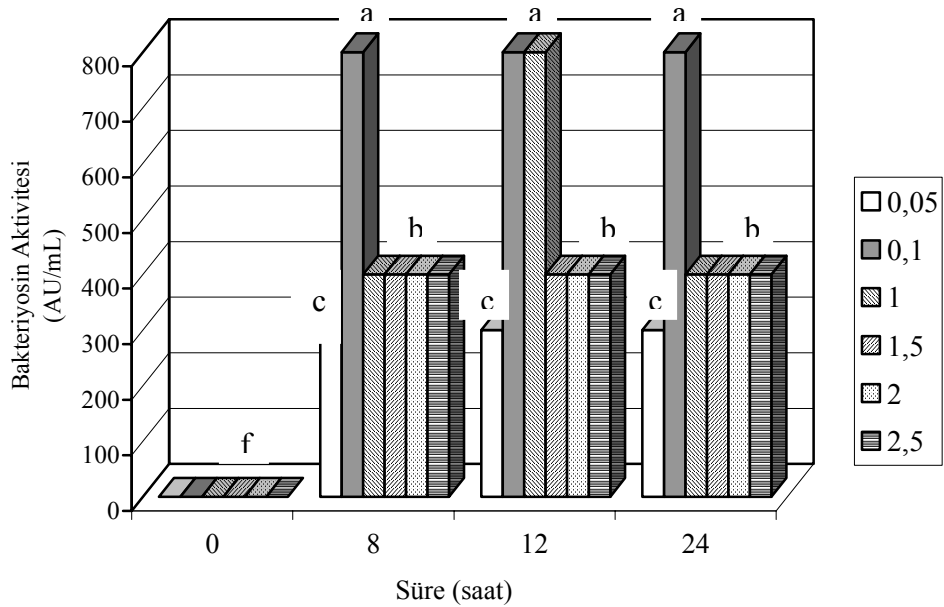
İnokülüm miktarının etkisini ortaya koymak için değişik düzeylerde *E. faecalis* KP, MRS broth besiyerine ilave edilip 32°C'de inkübe edilmiş ve sonuçta % 0,1 ve 1,0 inokülüm miktarları kullanıldığında maksimum düzeyde enterosin KP'nin olduğu gözlenmiştir. Ancak, inokülüm miktarı % 0,1 düzeyinde tutulduğunda enterosin aktivitesini 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7).

MRS broth besiyerinin başlangıç pH'sı 6,5-7,0 olduğunda gerek *E. faecalis* KP gelişiminin gerekse enterosin KP üretiminin yüksek düzeyde gerçekleştiği tespit edilmiştir. pH 7,0'den yüksek değerlerde söz konusu bakterinin gelişimi iyi olmasına karşın bakteriyosin üretiminin düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Düşük başlangıç pH'larında (pH 5,0-5,5) ise hem bakteri gelişiminin hem de bakteriyosin üretiminin düşük düzeyde olduğu görülmüştür (Şekil 4.8).

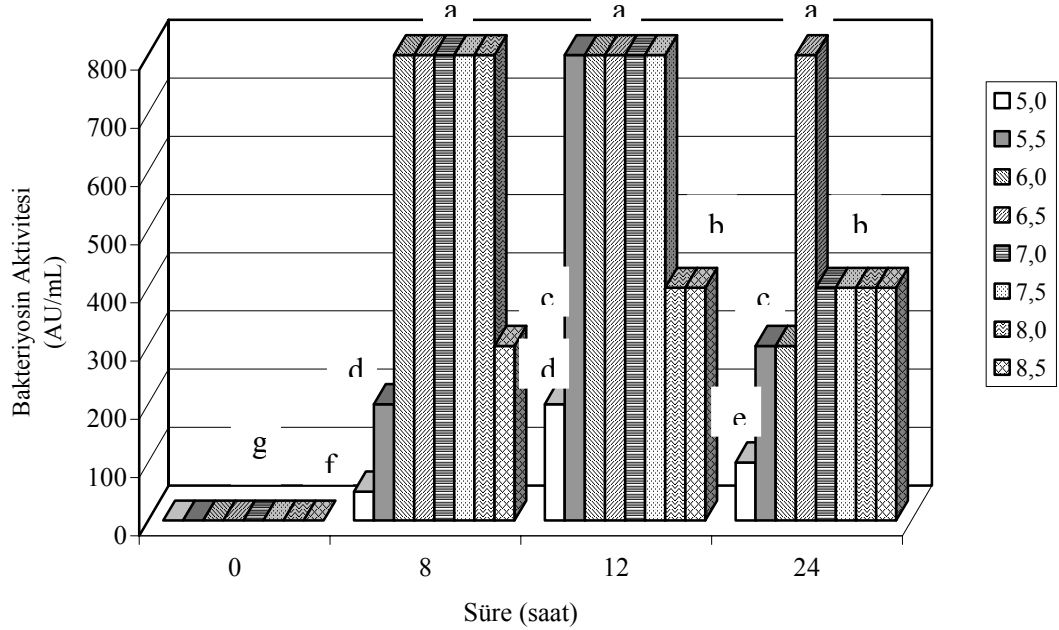
*Lc. lactis* subsp. *cremoris* tarafından üretilen lactokoksin R'nin üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığı ve süresinin, inokülüm miktarının ve besiyeri başlangıç pH'sının etkili olduğu belirlenmiştir (Yildirim and Johnson, 1998).



Şekil 4.6. Farklı besi yerlerinin enterosin KP üretimi üzerine etkisi (n=4)



Şekil 4.7. Farklı inokülüm miktarlarının enterosin KP üretimi üzerine etkisi (n=4)

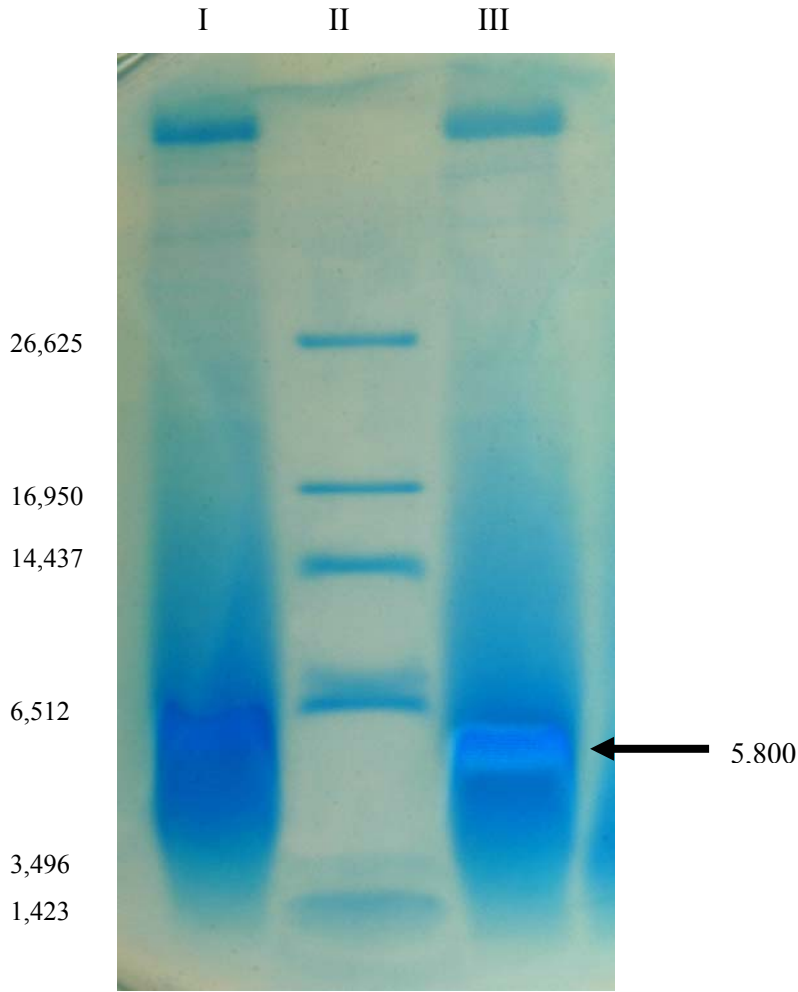


Şekil 4.8. Farklı başlangıç pH'larının enterosin KP üretimi üzerine etkisi (n=4)

#### 4.11. Bakteriyosinin Molekül Ağırlığı

Metaryal metot kısmında belirtildiği şekilde tuzla çöktürme ile kısmen saflaştırılan enterosin KP'nin molekül ağırlığının belirlenmesi için % 16 trisin-SDS-PAGE kullanılmıştır. Boyama ve boya giderme işlemlerinden sonra jelde enterosin örneğinin yüklendiği kısımda birden fazla bant gözlenmiştir. Antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olan bantı belirlemek amacıyla *Lb. plantarum*'a karşı antimikrobiyal aktivite testi yapılmıştır. Sonuçta molekül ağırlığı 3496 ile 6512 Da arasında olan bantın inhibitör aktivite gösterdiği saptanmıştır. Enterosin KP'nin molekül ağırlığı yaklaşık 5800 Da olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9). Merkaptoetanol içeren örnek tamponunda hazırlanan enterosin KP, aktivitesini kaybettiğinden *Lb. plantarum*'a karşı inhibitör etki göstermemiştir.

Toit et al. (2000) farklı *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin molekül ağırlıklarını trisin-SDS-PAGE kullanarak yaklaşık 3,4 kDa, Galvez et al. (1998) ise *E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97'nin molekül ağırlığını 4,8 kDa olarak bulmuşlardır.



Şekil 4.9. Enterosin KP'nin *Lb. plantarum*'a karşı inhibitör etkisini gösteren trisin-SDS-PAGE jeli. I. sütun, merkaptetanol içeren örnek tamponuyla hazırlanan enterosin KP; II. sütun, düşük moleküler ağırlıklı standart; III. sütun, merkaptetanol içermeyen örnek tamponuyla hazırlanan enterosin KP. Enterosin KP'nin oluşturduğu inhibisyon zonu okla gösterilmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada yöresel beyaz peynirden farklı bazı bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip bir bakteri izole edilmiş ve buna paralel olarak bakterinin tanısı ve ürettiği antimikrobiyal bileşimin fiziko-kimyasal özellikleri ile üretimini etkileyen faktörler belirlenmiş ve moleküler ağırlığı saptanmıştır. Araştırmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. İzolatın Gram pozitif, kok şeklinde, hareketsiz, endospor, katalaz, hemoliz, jelatinaz, indol ve Voges Proskauer negatif, 45°C'den daha düşük sıcaklıklarda, pH 4,5-9,6 ve % 3,0-6,5 NaCl konsantrasyonunda gelişebildiği, sütün asitliğini 7 gün sonra 4,38 pH'ya düşürdüğü ve glikoz broth besiyerinde oluşturduğu en son asitliğin 4,30 pH olduğu tespit edilmiştir. API strep 20 ve API 50 CHL testi ile belirlenen karbonhidrat fermantasyon ile yağ asidi profili sonucunda bakterinin *Enterococcus faecalis* olduğu belirlenmiştir. İzolat *Enterococcus faecalis* KP olarak adlandırılmıştır.
2. İnhibitör maddenin proteolitik enzimlerden sadece papaine karşı duyarlı olduğu, ancak tripsin, pepsin, pankreatin, katalaz, amilaz ve lipaz enzimine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. İnhibitör etkinin supernatant pH'sının nötrlendiğinde de devam etmesi bu etkinin asitlikten kaynaklanmadığını göstermiştir. İnhibitör maddenin bir proteolitik enzim olan papainle muamele edilmesi sonucunda etkisini kaybetmesi bu maddenin protein tabiatında bir bakteriyosin olduğuna işaret etmiştir. *E. faecalis* KP tarafından üretilen bu bakteriyosin enterosin KP olarak adlandırılmıştır.
3. Enterosin KP'nin bazı gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilere örneğin *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.
4. Yüksek derecede uygulanan ısı işlemin enterosin KP'nin aktivitesini etkilediği bulunmuştur. 90°C'de 30 dk ısı işleme maruz kaldığında aktivitesini tamamen

koruduğu, ancak otoklavlama koşullarında aktivitesinin büyük kısmını kaybettiği belirlenmiştir.

5. Bakteriyosinin düşük asidik ve nötral pH (pH 1,0-7,0)'lara karşı stabil olduğu fakat bazik pH koşullarında (pH 8,0-12,0) aktivitesini %50-100 oranında kaybettiği saptanmıştır.
6. Isıl işlem ve pH'da olduğu gibi farklı depolama koşullarının da bakteriyosin aktivitesi üzerinde önemli etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Enterosin KP'nin -20 ve -80°C'de 1 ay depolama sürecinde aktivitesini koruduğu, ancak -80°C'de 3 ay depolandığında aktivitesinde %75 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir.
7. Bakteriyosinin test edilen organik çözücülere (etanol, metanol, hekzan, klorofom, aseton, etil eter, isopropil alkol, formaldehit), deterjanlara (SDS, üre, tween 80, triton X-100) ve EDTA'ya karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca  $\beta$ -merkaptöetanol ile muamele edildiğinde inhibitör aktivitesinde azalma (%50-87,5) olduğu bulunmuştur.
8. Besiyeri olarak MRS broth, inokülüm miktarı %0,1, besiyeri başlangıç pH'sı 6,5 ve inkübasyon sıcaklığı 32°C olduğu zaman enterosin KP'nin maksimum düzeyde üretildiği gözlenmiştir.
9. Enterosin KP'nin *E. faecalis* KP'nin logaritmik gelişme fazında üretilmeye başladığı ve durgun fazın başında üretiminin maksimum düzeye ulaştığı saptanmıştır.
10. Enterosinin moleköl ağırlığının yaklaşık 5800 Da olduğu belirlenmiştir.

Son yıllarda enterokoklar hakkında starter kültür veya co-kültürler olarak kullanımlarını öneren bildiriler oldukça artmıştır. Enterokokların gıdalarda bulunması ve gelişimi, peynir, sosis gibi fermente ürünlerde, organoleptik olarak farklı ürünlerin oluşmasını sağlar. Enterokokların gıdalardaki bu olumlu özellikleri de dikkate alındığında bu çalışmada izole edilen ve bakteriyosin ürettiği belirlenen *E. faecalis* KP'nin farklı

gıdalarda uygulamaları düşünülebilir. Özellikle *Listeria monocytogenes* gibi gıda kaynaklı bir patojene karşı inhibitör etki gösteren enterosin KP'nin de gıdalarda direkt olarak kullanılması söz konusu olabilir. Fakat bu uygulamaların ne şekilde ve hangi koşullar altında yapılacağını ve sonuçlarının ne olacağını belirlenebilmesi için hem bakterinin hem de bakteriyosinin farklı gıda bileşenleri ile etkileşimlerinin belirlenmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

**ANANOÜ, S., GARRIGA, M., HUGAS, M., MAQUEDA, M., MARTINEZ-BUENO, M., GALVEZ, A., VALDIVIA, E. 2005a.** Control Of *Listeria Monocytogenes* In Model Sausages By Enterocin AS-48. Inter. J. Food Microbiol. 103:179–190.

**ANANOÜ, S., MAQUEDA, M., MARTÍNEZ-BUENO, M., GÁLVEZ, A., VALDIVIA, E. 2005b.** Control Of *Staphylococcus aureus* In Sausages By Enterocin AS-48. Meat Sci. 71: 549–556.

**ANONİM 1997.** Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete, sayı: 23172, Ankara.

**ANONYMOUS. 1999.** SPSS Statistical Program Package (Version 10.0).

**AYMERICH, T., ARTIGAS, M.G., GARRIGA, M., MONFORT, J.M., HUGAS, M. 2000.** Effect Of Sausage Ingredients And Additives On The Production Of Enterocins A And B By *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization Of In Vitro Production And Anti-Listerial Effect In Dry Fermented Sausages. J. Of Appl. Microbiol. 88: 686–694.

**AXELSSON, L.T., 1993.** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In “ Lactic Acid Bacteria” Salmina, S., Wright, A.V., pp. 1-63, Marcel Dekker Inc. USA.

**BANWART, G. J. 1981.** Basic Food Microbiology. AVI Publishing Company. Westport Connecticut. 168-169.

**BAUER, R., DICKS, L.M.T. 2005.** Mode Of Action Of Lipid II-Targeting Lantibiotics. Inter. J. of Food Microbiol. 101: 201– 216.

**BHUNIA, A., JOHNSON, M.C., RAY, B. 1988.** Purification, Characterization And Antimicrobial Spectrum Of A Bacteriocin Produced By *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 65:261-268.

- BHUNIA, A., JOHNSON, M.C., RAY, B., KALCHANAND, N. 1991.** Mode Of Action Of Pediocinach From *Pediococcus acidilactici* H On Sensitive Bacterial Strains. J. Appl. Bacteriol. 70: 25-33.
- BLOM, H., KATLA, T., HAGEN, B. F., AXELSSON, L. 1997.** A Model Assay To Demonstrate How Intrinsic Factors Affect Diffusion Of Bacteriocins Inter. J. Of Food Microbiol. 38:103–109.
- BRÖTZ H., SAHL H.G. 2000.** New Insights Into The Mechanizm Of Action Of Lantibiotics–Diverse Biological Effects By Binding To The Same Molekular Target. J. Of Antimic. Chemotherapy. 46: 1-6.
- BRUNO, M.E.C., MONTVILLE, T.J. 1993.** Common Mechanistic Action Of Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria. Appl. Environ. Micro. 59: 3003-3010.
- CAMPOS, C.A., RODRIGUEZ, O., MATA, P.C., PRADO, M., VELAZQUEZ, J.B. 2006.** Preliminary Characterization Of Bacteriocins From *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* And *Enterococcus mundtii* Strains Isolated From Turbot (Psetta Maxima). Food Research Inter. 39: 356–364.
- CHEN, H., HOOVER D.G. 2003.** Bacteriocins And Their Food Applications. Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety. 2: 82-100.
- CHEIGH, C.I., CHOI, H.J., PARK, H., KIM, S.B., KOOK, M.C., KIM, T.S., HWANG, J.K., PYUN, Y. R. 2002.** Influence Of Growth Conditions On The Production Of A Nisin-Like Bacteriocin By *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 Isolated From Kimchi. J. Of Biotech. 95: 225–235.
- CINTAS, L.M., CASAUS, P., HARVARSTEIN, 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: 4321-4330.

**CINTAS, L. M., CASAUS, P., FERNANDEZ, M. F., HERNANDEZ, P. E. 1998.** Comparative Antimicrobial Activity Of Enterocin L50, Pediocin PA-1, Nisin A And Lactocin S Against Spoilage And Foodborne Pathogenic Bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289-298.

**CLEVELAND, J., MONTVILLE., J.T., NES, F.I., CHIKIDAS, L.M. 2001.** Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials For Food Preservation. *Inter. J. Microbiol.* 50: 1-17.

**COVENTRY, M.J., GORDON, J.B., WILCOCK, A, HARMARK, K., DAVIDSON, B.E., HICKEY, M.W., HILLIER, A.J., WAN, J. 1997.** Detection Of Bacteriocins Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Foods And Comparison With Pediocin And Nisin. *J. of Appl. Microbiol.* 83: 248-258.

**DAESCHEL, M.A. 1989.** Antimicrobial Substances From Lactic Acid Bacteria For Use As Food Preservatives. *Food Technology.* January: 164-167.

**DAESCHEL, M.A. 1990.** Application Of Bacteriocins In Food Systems., In "Biotechnology And Food Safety" Shain-Doco, K (Ed), Butterworths, London.

**DE KWAADSTENIET, M., TODOROV, S.D., KNOETZE, H., DICKS, L.M.T. 2005.** Characterization Of A 3944 Da Bacteriocin, Produced By *Enterococcus mundtii* ST15, With Activity Against Gram-Positive And Gram-Negative Bacteria. *Inter. J. Of Food Microbiol.* 105: 433– 444.

**DELGADOA, A. , BRITO, D. , PERES, C. , ARROYO, F. N., FERNANDEZ, A. G. 2005.** Bacteriocin Production By *Lactobacillus pentosus* B96 Can Be Expressed As A Function Of Temperature And NaCl Concentration *Food Microbiol.* 22: 521–528.

**DELVES-BROUGHTON, J. 1990.** Nisin And Its Uses As A Food Preservative. *Food Technology.* November: 100, 102, 104, 106, 111-112, 117.

- DEVLIEGHERE, F., VERMEIREN, L., DEBEVERE, J. 2004.** New Preservation Technologies: Possibilities And Limitations. *Inter. Dairy J.* 14: 273-285.
- DROSINOS, E.H., MATARAGAS, M., METAXOPOULOS, J. 2006.** Modeling Of Growth And Bacteriocin Production By *Leuconostoc Mesenteroides* E131. *Meat Science*. Article In Pres.
- ECKNER, K. F., 1992.** Bacteriocins And Food Applications. *Dairy Food Environment Sanit.* 12: 204-209.
- ENNAHAR, S., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A. 1999.** Class Iia Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Antibacterial Activity And Food Preservation. *J. Bio. Bioeng.* 87: 705-716.
- ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A. 2000.** Class Iia Bacteriocins: Biosynthesis, Structure And Activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 85-106.
- ERİNÇ, H., YILDIRIM, Z., YILDIRIM, M. 2006.** Lantibiyotikler. *Gıda Mühendisleri Odası Kongresi. Kongre Bildiri Kitapçığı.* Ankara.
- 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. *Milchwissensc.* 54: 30– 32.
- FRANZ, C.M.A.P., HOLZAPFEL, W. H., STILES, M. E. 1999.** Enterococci At The Crossroads Of Food Safety?. *Inter. J. Food Microbiol.* 47: 1–24.
- FRANZ, C.M.A.P., STILES, M. E., SCHLEIFER, K. H., HOLZAPFEL, W. H. 2003.** Enterococci In Foods A Conundrum For Food Safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88:105–122.
- GÁLVEZ, A. 2005.** Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* In Fruit Juices By Enterocin AS-48. *Inter. J. Food Microbiol.* 104: 289– 297.

- GÁLVEZ, A. , VALDIVIA, E., CAMAFEITA, H. A. E. , BUENO, E.M.M.M., MAQUEDA, M. 1998.** Isolation And Characterization Of Enterocin EJ97, A Bacteriocin Produced By *Enterococcus faecalis* EJ97 Arch Microbiol. 171:59–65.
- GANZLE, M.G., WEBER, S., HAMMES,W. P. 1999.** Effect Of Ecological Factors On The Inhibitory Spectrum And Activity Of Bacteriocins. Inter. J. Of Food Microbiol. 46:207–217.
- GARNEAU, S., MARTIN, N. I., VEDERAS, J.C. 2002.** Two-Peptide Bacteriocins Produced By Lactic Acid Bacteria Biochimie. 84: 577–592.
- GARCIA, M.T., OMAR, N. B., LUCAS, R., PULIDO, R. P., CASTRO, A., GRANDE, M.J., CANAMERO, M. M., GALVEZ, A. 2003.** Antimicrobial Activity Of Enterocin EJ97 On *Bacillus coagulans* CECT 12. Food Microbiol. 20: 533–536.
- GARCIA, M.T., LUCAS, R., ABRIOUEL, H., OMAR, N. B., PEREZ, R., GRANDE, M.J., CANAMERO, M. M., GALVEZ, A. 2004.** Antimicrobial Activity Of Enterocin EJ97 Against ‘*Bacillus macroides/Bacillus maroccanus*’ Isolated From Zucchini Pure. J. Of Appl. Microbiol. 97: 731–737.
- GEINSEN, R., LUCKE, K.K., KROCKEL, L. 1992.** Starter And Protective Cultures For Meat And Meat Products. Fleischwirtsch. 72 (6): 894-898.
- GIRAFFA, G., NEVIANI, E., TORRI TARELLI, G. 1994.** Antilisterial Activity By Enterococci In A Model Predicting The Temperature Evolution Of Taleggio, An Italian Soft Cheese. J. Of Dairy Sci. 77:1176– 1182.
- GIRAFFA, G., PICCHIONI, N., NEVIANI, E., CARMINATI, D. 1995.** Production And Stability Of An *Enterococcus faecium* Bacteriocin During Taleggio Cheesemaking And Ripening. Food Microbiol. 12: 301– 307.
- GIRAFFA, G. 2003.** Functionality of Enterococci In Dairy Products. Inter. J. Food Microbiol. 88: 215– 222.

**GRANDE, M.A.J., LUCAS, R., ABRIOUEL, H., OMAR, N. B., MAQUEDA, M., MARTINEZ-BUENO, M., MARTINEZ-CANAMERO, M., VALDIVIA, E., GUDER, A., WIEDEMANN, I., SAHL, H.G. 2000.** Post-Translationally Modified Bacteriocins – The Lantibiotics. *Biopolymers*. 55: 62-73.

**GRANDE, M.A.J., LUCAS, R., ABRIOUEL, H., OMAR, N. B., MAQUEDA, M., MARTINEZ-BUENO, M., MARTINEZ-CANAMERO, M., VALDIVIA, E., GALVEZ, A., 2005.** Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* In Fruit Juices By Enterocin AS-48, *Inter. J. of Food Microbiol.* 104 289– 297.

**GUERRA, N. P., RUA, M. L., PASTRANA, L. 2001.** Nutritional Factors Affecting The Production Of Two Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria On Whey *Inter. J. of Food Microbiol.* 70: 267–281.

**GRATIA, A. 1925.** Sur un remarquable d’antagonisme entre deux souches de colibacille. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.* 93: 1040-1041.

**HAVARSTEIN, L.S., DIEP, B.D., NES. I.F. 1995.** A Family Of Bacteriocin ABC Transporters Carry Out Proteolytic Processing Of Their Substrates Concomitant With Export. *Mol. Microbiol.* 16: 229-240.

**HAVERAAR, R., HUIS IN’T VELD, J.H.S. 1992.** Probiotics: A General View. In: ‘Wood, B.J.B (Ed), *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, The Lactic Acid Bacteria*, Vol. 1, Chapman and Hall, New york, pp. 209-224.

**HOFFMANN, A., PAG, U., WIEDEMANN, I., SAHL, H. G. 2001.** Combination Of Antibiotic Mechanisms in Lantibiotics. *Farmaco.* 57: 685–691.

**HOOVER, D.G. 1993.** Bacteriocins with potential for use in foods. p. 409-440. In ‘Antimicrobial in Foods’, P.M. Davidson and A.L. Branen (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, p. 617.

**HOWARD, B.J., KEISER, J.F., SMITH, T.F., WEISSFELD, A.S., TILTON. R.C. 1993.** Clinical And Pathogenic Microbiology. 2nd Edition. A.C.V. Mosby. Imprint Of Mosby-Year Book Inc. St. Louis. 95.

**HUGAS, M., GARRIGA, M., AYMERICH, M.T. 2003.** Functionalty of Enterococci In Meat Products. Inter. J. Food Microbiol. 88: 223– 233.

**IVANOVA, I., MITEVA, V., STEFANOVA, T., PANTEV, A., BUDAKOV, I., DANOVA, S., MONCHEVA, P., NIKOLOVA, I., DOUSSET, X., BOYAVAL, P. 1998.** Characterization Of A Bacteriocin Produced By *Streptococcus thermophilus* 81. Inter. J. Of Food Microbiol. 42:147–158.

**İŞLEROĞLU, H., YILDIRIM, Z., YILDIRIM, M. 2005.** Sınıf IIa Bakteriyosinlerin Biyosentezi, Yapısı Ve Antimikrobiyal Aktivitesi. Gıda Kongresi, Kongre Bildiri Kitapçığı. İzmir.

**JACK, R. W., TAGG, J. R., RAY, B. 1995.** Bacteriocins Of Gram Positive Bacteria, Microbiol. Rev. 171-200.

**KIM, M., KONG, Y., BAEK, H., HYUN, H. 2006.** Optimization Of Culture Conditions And Medium Composition For The Production Of Micrococcin GO5 By *Micrococcus* Sp. GO5 J. Of Biotech. 121: 54–61.

**KAISER, D., JACK, R.W., JUNG, G. 1998.** Lantibiotics And Microcinns: Novel Post Translational Modifications Of Polypeptides. Pure & Appl. Chem. 70: 97-104.

**KLAENHAMMER, T.R. 1993.** Genetics Of Bacteriocins Produced By Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. 12: 39-86.

**KLEIN, G. 2003.** Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of Enterococci From Food and The Gastro-Intestinal Tract. Inter. J. Food Microbiol. 88:123– 131.

**KRAMER, J., BRANDIS, H. 1975.** Mode of action of two *Streptococcus faecium* bacteriocins. Antimic. Agents and Chemotherapy. 7:117– 120.

- KOPONEN, O. 2004.** Studies Of Producer Self – Protection And Nisin Biosynthesis Of *Lactococcus lactis*, Doctoral Dissertation, Institute Of Biotech. And Department Of Appl. Chemistry And Microbiol. Helsinki.
- LAUKOVA, A., CZIKKOVA, S., DOBRANSKY, T., BURDOVA, O. 1999.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by Enterocin CCM4231 In Milk Products. Food Microbiol. 16: 93-99.
- LEE, N.K., PAIK, H.D. 2001.** Partial Characterization Of Lacticin NK24, A Newly Identified Bacteriocin Of *Lactococcus lactis* NK24 Isolated From Jeot-Gal. Food Microbiol.18:17-24.
- LEROY, F., VUYST, L. 2002.** Bacteriocin Production By *Enterococcus faecium* RZS C5 Is Cell Density Limited And Occurs In The Very Early Growth Phase Inter. J. Of Food Microbiol. 72:155– 164.
- LOSTEINKIT, C., UCHIYAMA, K., OCHI, S., TAKAOKA, T., NAGAHISA, K. , SHIOYA, S. 2001.** Characterization of Bacteriocin N15 Produced by *Enterococcus faecium* N15 and Cloning of the Related Genes. Bioscience And Bioeng. 91: 390-395.
- LUCKE, F.K., EARNSHAW, R.G. 1991.** Starter Cultures, In Food Preservatives (ed. N.J. Russel&G.W.Gould). Blackle&Sons Ltd. Glasgow. 226-229.
- MAYR-HARTING, A., HEDGES, A.J., BERKLEY, R.W. 1972.** Methods For Studying Bacteriocins. Pp. 315-442. In ‘Methods In Microbiology, J.R. Norris And N.W. Ribbons (Eds.) Vol 7A.
- MCAULIFFE, O., ROSS, R. P., HILL, C. 2001.** Lantibiotics: Structure, Biosynthesis And Mode Of Action. FEMS Microbiol. Reviews. 25: 285-308.
- MONTVILLE, T.J., CHEN, Y. 1998.** Mechanistic Action Of Pediocin And Nisin: Recent Progress And Unresolved Questions. Appl. Microbiol. Biotech. 50: 511-519.

**MONTVILLE, T. J., WINSKOWSKI, K. 1997.** Biologically Based Preservation Systems And Probiotic Bacteria. In “Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers”, M. P. Doyle, L.R. Beuchat & T. J. Montville (Eds.) ASM, Washington D.C.

**MORENO, M.R., LEISNER, J.J., TEE, L.K, LEY, C., RADU, S., RUSUL, G., VANCANNEYT, M., DE VUYST, L. 2002.** Microbial Analysis Of Malaysian Tempeh, And Characterization Of Two Bacteriocins Produced By Isolates Of *Enterococcus faecium*. J. Appl. Microbiol. 92 (1): 147-57.

**MORENO, M.R. F., CALLEWAERT, R., DEVREESE, B., BEEUMEN, J. V, DE VUYST, L. 2003.** Isolation And Biochemical Characterisation of Enterocins Produced By Enterococci From Different Sources. J. Appl. Microbiol. 94: 214– 229.

**MORENO, M.R. F., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. 2006.** The Role and Application of Enterococci In Food and Health. Inter. J. Food Microbiol.106: 1–24.

**MUNDT, O.J. 1986.** Enterococci. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1063– 1065.

**MURIANA, P.M., LUNCHANSKY, J.B. 1993.** Biochemical Methods For The Purification Of Bacteriocins. Pp. 41-57. In “Bacteriocins Of Lactic Acid Bacteria, D.F Hoover And L.R. Steenson (Eds), Academic Press, San Diego, CA.

**NETTLES, G.C., BAREFOOT, S.F. 1993.** Biochemical And Genetic Characteristics Of Bacteriocins Of Food Associated Lactic Acid Bacteria. J. Of Food Protection. 56: 338-356.

**NEYSENS, P., MESSENS, W., VUYST, L. 2003.** Effect Of Sodium Chloride On Growth And Bacteriocin Production By *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 Inter. J. Of Food Microbiol. 88: 29– 39.

- 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. of Appl. Microbiol.* 83: 671– 677.
- ONDA, T., YANAGIDA, F., TSUJI, M., SHINOHARA, T., YOKOTSUKA, K. 2003.** Production And Purification Of A Bacteriocin Peptide Produced By *Lactococcus* sp. Strain GM005, Isolated From Miso-Paste.. *Inter. J. Of Food Microbiol.* 87: 153– 159.
- ORLA-JENSEN., S. 1919.** The Lactic Acid Bacteria. Fred Host and Son. Copenhagen.
- O’SULLIVAN, L., ROSS, R.P., HILL, C. 2002.** Potential Of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria For Improvements In Food Safety And Quality. *Biochimie.* 84: 593-604.
- PASTEUR, L., JOUBERT, F. 1877.** Charbon Et Septicemie. *C.R. Soc. Biol. Paris* 85: 101-115.
- PUGSLEY, A.P. 1993.** The Complete General Secretory Pathway In Gram-Negative Bacteria. *Microbiol.Rev.* 57: 50-108.
- REKHIF, N., ATRIM A., LEFEBVRE, G. 1994.** Characterization And Partial Purification Of Plantaricin LC74, A Bacteriocin Produced By *Lactobacillus plantarum* LC74. *Biotech. Letters.* 16: 771-776.
- RODRIGUEZ, J.M, MARTÍNEZ, M.I., HORN, N., DODD, H.M. 2003.** Heterologous Production Of Bacteriocins By Lactic Acid Bacteria. *Inter. J. Food Micro.* 80: 101-116.
- ROLLER, S., LUSENGO, J. 1997.** Developments In Natural Food Preservatives. *Agro-Food-Industry Hi-Tech.* July/August: 22-25.
- SAHL, H-G., JACK, R.W., BIERBAUM, G. 1995.** Biosynthesis And Biological Activities Of Lantibiotics With Unique Post-Translational Modifications. *Eur. J. Biochem.* 230: 827-853.

**SABIA, C., MANICARI, G., MESSI, P., DE NIEDERHAUSERN, S., BONDI, M. 2002.** Enterocin 416K1, An Antilisterial Bacteriocin Produced By *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 Isolated From Italian Sausages Inter. J. Of Food Microbiol. 75:163– 170.

**SABIA, C., MESSI, P., DE NIEDERHAUSERN, S., MANICARDI, G., BONDI, M. 2004.** Study Of Two Bacteriocins Produced By *E. casseliflavus* And *E. faecalis*. Letters In Appl. Microbiol. 38: 99–105.

**SARANTINOPOULOS, P., ANDRIGHETTO, C., GEORGALAKI, M. D., REA, M. C., LOMBARDI, A., COGAN, T. M., KALANTZOPOULOS, G., TSAKALIDOU, E. 2001.** Biochemical Properties Of Enterococci Relevant To Their Technological Performance. Inter. Dairy J. 11: 621–647.

**SCHAGGER, H., G. VON JAGOV. 1987.** Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis For The Separation Of Proteins In The Range From 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379.

**STILES, M. E., HOLZAPFEL, W. H. 1997.** Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. Inter. J. Food Microbiol. 36: 1- 29.

**TAGG, J.R., DAJANI, A.S., WANNAMAKER, L.W. 1976.** Bacteriocins Of Gram-Positive Bacteria. Bacteriol. Rev. 40: 722-756.

**TAKALA, T.M. 2005.** Nisin Immunity And Food Grade Transformation In Lactic Acid Bacteria. Academic Dissertation In Microbiology (Ph.D). University Of Helsinki. Finland.

**TEMİZ, A. 2000.** Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. III. Baskı. Hatıñoğlu Yayınevi. Ankara.

**TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T. 2006.** Effect Of Medium Components On Bacteriocin Production By *Lactobacillus plantarum* Strains ST23LD And ST341LD, Isolated From Spoiled Olive Brine. Microbiol. Res. 161(2): 102-108.

- TOIT, M., FRANZ, C.M.A.P., DICKS, L.M.T. , HOLZAPFEL, W.H. 2000.** Preliminary Characterization Of Bacteriocins Produced By *Enterococcus faecium* And *Enterococcus faecalis* Isolated From Pig Faeces. J. of 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 plasmid pYI17. J. Bacteriol. 178: 3585-3593.
- TYÖPPÖNEN, S., PETAJA, E., MATTILA-SANDHOLM, T. 2003.** Bioprotectives And Probiotics For Dry Sausages. Inter. J. of Food Microbiol. 83: 233– 244.
- WACHSMAN, M.B., FARIAS, M.E., TAKEDA, E., SESMA, F., DE RUIZ HOLGADO, A.P., DE TORRES, R.A., COTO, C.E. 1999.** Antiviral Activity Of Enterocin CRL35 Against Herpes Viruses. Inter. J. Of Antimic. Agents 12: 293– 299.
- WHITEHEAD, H. R. 1933.** A Substance Inhibiting Bacterial Growth, Produced By Certain Strains Of Lactic Streptococci. Biochem. J. 27 (6):1793–1800.
- YANG, R., RAY, B. 1994.** Factors Influencing Production Of Bacteriocins By Lactic Acid Bacteria. Food Microbiol. 11: 281-291.
- YILDIRIM, Z., JOHNSON, M.G. 1998.** Detection And Characterization Of A Bacteriocin Produced By *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R Isolated From Radish. Lett. Appl. Microbiol. 26: 297-304.
- YILDIRIM, Z., YILDIRIM, M. 2000.** Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Genel Karakteristikleri. Süt Mikrobiyolojisi Ve Katkı Maddeleri Sempozyumu. 247-253 S. 22-23 Mayıs Tekirdağ.
- YILDIRIM, Z., M. YILDIRIM. 2001.** Characterization Of Buchnericin LB Produced By *Lactobacillus buchneri* LB. Turkish J. Of Biology. 25:73-82.

## ÖZGEÇMİŞ

04.07.1981 tarihinde Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini çeşitli şehirlerde tamamladıktan sonra 1999 yılında Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nü kazandı. Haziran 2003 tarihinde bu bölümden başarıyla mezun olduktan sonra Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir.