

**BAZI *ENTEROCOCCUS* BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gölgün DİŞÇİOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞUBAT 2014
ANKARA**

Glgn DİŖÇİOĖLU tarafından hazırlanan “BAZI *ENTEROCOCCUS* BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŖTIRILMASI ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu alışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 06.02.2014

Bu tez ile G.. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. şeref SAĞİROĞLU

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gölgün DİŞÇİOĞLU

**BAZI ENTEROCOCCUS BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Gülgün DIŞÇIOĞLU

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Şubat 2014**

ÖZET

Bu çalışmada beyaz peynirlerden izole edilen, EPS üretimi yüksek olan *E. faecium* RI 41, *E. faecium* RI 56 ve *E. faecalis* RT 122 suşları ve EPS üretimi düşük olan *E. faecalis* RI 6, *E. faecalis* RI 21 ve *E. faecium* RT 81 suşları ile *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 ve *Enterococcus faecalis* NCDO 581 standart suşlarının bazı probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla *Enterococcus* suşların otoagregasyon, koagregasyon ve hidrokarbonlara tutunma özellikleri ile farklı pH ve farklı safra konsantrasyonlarında gelişmeleri incelenmiştir.

Enterococcus suşlarının otoagregasyon özellikleri incelendiğinde, en yüksek değerler *E. faecalis* RT 122 (%57) ve *E. faecium* RI 41 (%53) suşlarında gözlenirken, en düşük değer *E. faecalis* RI 6 (%25) suşunda bulunmuştur.

Enterococcus suşlarının koagregasyon özellikleri 5 adet test bakterileri (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*) üzerinde uygulanmıştır. % Koagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde, en yüksek değer *Enterococcus faecalis* RI 6 ile *Salmonella enteritidis* ATCC MU:80 arasında (%57,58) ve en düşük *Enterococcus faecium* RI 56 ile *Salmonella enteritidis* ATCC MU:80 arasında (%11,63) bulunmuştur.

Enterococcus suşlarının farklı pH (2, 3, 4, 5, 5,5 ve 6,2) derecelerinde gelişimleri incelenmiştir. Tüm suşların genel olarak pH 2, 3 ve 4'deki % inhibisyon değerleri birbirlerine benzer olup, yüksek (%97) bulunmuştur. pH 5'de % inhibisyon oranları en yüksek olan suşlar *E. faecalis* RI 6 (%93) ve *E. faecalis* RI 21 (%92) suşlarında belirlenmiştir. Diğer suşların pH 5'deki inhibisyon değerleri %62-76 arasında bulunmuştur. Suşların pH 5,5'deki inhibisyon değerleri düşük olup % 12-31 arasında tespit edilmiştir.

Enterococcus suşlarının farklı safra tuzu konsantrasyonlarında (% 0,06,% 0,15, %0,30) gelişmelerini incelenmiştir. *E. faecalis* RI 6, *E. faecium* RI 41, *E. faecium* RI 56 ve *E. faecalis* NCDO 581 suşlarının ortamda bulunan safrayı belirli bir seviyeye kadar tolere edebildiği tespit edilmiştir. Diğer suşların safra tuzlarına karşı toleranslarının safra oranına ve safra tuzu konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Safra konsantrasyonu artırıldığında, özellikle % 0,30 oranındaki safranın varlığında birçok *Enterococcus* suşunun üreme ve hücre yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir.

Enterococcus suşlarının farklı hidrokarbon organik çözücülere (kloroform, ksilen, etil asetat ve toluen) tutunma özellikleri incelemiştir Tüm suşların bu maddelere tutunma özelliği gösterdiği gözlenmiştir. Suşların kloroform ve etil asetat organik çözücülerine karşı ksilen ve toluen'e göre daha fazla tutunma özelliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.023

Anahtar Kelimeler : *Enterococcus*, otoagregasyon, koagregasyon, asit – safra dirençliliği , hidrofobisite

Sayfa Adedi : 103

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

**THE INVESTIGATION OF PROBIOTIC PROPERTIES OF SOME
ENTEROCOCCUS BACTERIAS**

(M.Sc. Thesis)

Glgn DİŖÇİOĐLU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2014

ABSTRACT

In this study, the high EPS production of *E. faecium* RI 41, *E. faecium* RI 56 and *E. faecalis* RT 122 and low EPS production of *E. faecalis* RI 6, *E. faecalis* RI 21 and *E. faecium* RT 81 were used. Also, standard strains *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 and *Enterococcus faecalis* NCDO 581 were included in this study. Some probiotic properties of these strains were investigated. Strains were examined for autoaggregation and coaggregation properties, growth in different pH values and bile salt concentration and adhesion properties to hydrocarbons.

The Autoaggregation properties of *Enterococcus* strains were analyzed and the highest value were determined in the cultures *E. faecalis* RT 122 (57%) and *E. faecium* RI 41 (53%). While the lowest (25%) value were estimated in *E. faecalis* RI 6 strain.

The Coaggregation properties of *Enterococcus* strains were applied on 5 tested bacteria (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*). Due to coaggregation percent results, the highest one was between *E. faecalis* RI 6 and *S. enteritidis* ATCC MU:80 (%57,58) and the lowest one was between *E. faecium* RI 56 and *S. enteritidis* ATCC MU:80 arasında (%11,63).

The growth abilities of *Enterococcus* strains in different pH values (2, 3, 4, 5, 5,5 and 6,2) were estimated. In generally, all the cultures were high inhibited (97%) in pH values (2,3,4). In pH:5, the higher inhibition growth were observed in the cultures *E. faecalis* RI 6 (93%) and *E. faecalis* RI 21 (92%). Other strains in pH:5 were inhibited between %62-76. All the strains were quite low inhibition 12-31% in pH 5,5.

The growth abilities of *Enterococcus* strains in different (% 0,06, % 0,15, % 0,30) bile salts concentration were determined. Strains *E. faecalis* RI 6, *E. faecium* RI 41, *E. faecium* RI 56 and *E. faecalis* NCDO 581 were tolerated bile salts in certain levels. Tolerances other strains to bile salts were changed according to the rate and bile salts concentration. However, the increasing of bile salt concentration and in 0.30% concentration all the strains were showed low growth densities.

The biosorptions of *Enterococcus* strains to different hydrocarbons organic solvents (chloroform, xylene, ethyl acetate and toluene) were studied. All the strains were found to exhibit adhesion to the hydrocarbons. All the strains were more capable adhesions to chloroform and ethyl acetate more than xylene and toluene.

Science Code : 203. 1. 023

Key Words : *Enterococcus*, autoaggregation, coaggregation, acid-bile salts resistance, hydrophobicity.

Page Number : 103

Adviser : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

TEŞEKKÜR

2010-2014 yılları arasında Gazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nde Prof. Dr. Yavuz BEYATLI danışmanlığında yürütülen bu çalışma, yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Tez çalışmamda ilgisini, desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, geçirdiğim zor günlerde bana yardımcı olan ve çalışmalarım boyunca değerli katkılarıyla ve bilgileriyle beni yönlendiren Sayın Hocam Prof. Dr. Yavuz BEYATLI' ya saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamda tecrübe ve yardımlarından faydalandığım Sayın Hocam Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ' a, deneysel çalışmalarım sürecinde desteğini, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve beni yalnız bırakmayan Sayın Hocam Doç. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ' a, çalışmam boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Biyoteknoloji Laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, her zaman yanımda olan aileme, annem Nilgün DİŞÇİOĞLU ve babam Ali Nezih DİŞÇİOĞLU'NA, teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Prebiyotikler.....	3
2.2. Probiyotikler.....	4
2.2.1. Probiyotik bakterilerin genel özellikleri.....	6
2.2.2. Probiyotik mikroorganizmalarda bulunması gereken özellikler....	6
2.2.3. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	9
2.2.4. Probiyotiklerin alındığı kaynaklar.....	12
2.2.5. Probiyotiklerin mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine sağladığı yararlar ve etki mekanizması.....	14
2.3. Laktik Asit Bakterileri.....	17
2.3.1. <i>Enterococcus</i> cinsi bakterilerin bilimsel sınıflandırılması.....	18

Sayfa

2.3.2. <i>Enterococcus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri.....	19
2.3.3. <i>Enterococcus</i> cinsi bakterilerin insanların normal florasındaki etkileri.....	24
2.3.4. <i>Enterococcus</i> cinsi bakterilerin fonksiyonel özellikleri.....	25
2.4. <i>Enterococcus</i> Cinsi Bakteriler İle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar ve Probiyotik Önemi	41
2.4.1. <i>Enterococcus</i> 'ların probiyotik önemi.....	41
2.4.2. <i>Enterococcus</i> suşlarının probiyotik kültür olarak güvenilirliği.....	44
3. MATERYAL VE METOT.....	47
3.1. Materyaller.....	47
3.1.1. Araştırmada kullanılan besiyerleri.....	47
3.1.2. Bakterilerin muhafazası.....	48
3.1.3. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve geliştirilme ortamları.....	49
3.2. Metotlar.....	49
3.2.1. <i>Enterococcus</i> bakterilerinin otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi.....	49
3.2.2. <i>Enterococcus</i> bakterilerinin koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi.....	50
3.2.3. <i>Enterococcus</i> bakterilerinin asit toleranslarının belirlenmesi.....	51
3.2.4. <i>Enterococcus</i> bakterilerinin safra toleranslarının belirlenmesi.....	52
3.2.5. <i>Enterococcus</i> bakterilerinin farklı hidrokarbonlara tutunmasının belirlenmesi.....	53
3.2.6. İstatistiksel analiz.....	54

Sayfa

4. DENEYSEL BULGULAR.....	55
4.1. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin EPS Üretimleri.....	55
4.2. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Otoagregasyon Özellikleri	56
4.3. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Test Bakterileri İle Koagregasyon Özellikleri.....	60
4.4. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Asit Toleransı.....	65
4.5. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Safra Toleransı.....	70
4.6. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Farklı Hidrokarbonlara Tutunma Özellikleri....	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	78
KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	103

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	10
Çizelge 2.3. Literatürlerde <i>Enterococcus</i> cinsi altında toplanan türler	19
Çizelge 2.4. <i>Enterococcus</i> türlerinin tipik fizyolojik özellikleri.....	21
Çizelge 3.1. MRS besiyerinin içeriği.....	47
Çizelge 3.2. Nutrient sıvı besiyeri içeriği.....	48
Çizelge 3.3. PBS (Phosphate Buffered Saline) tamponu içeriği.....	50
Çizelge 4.1. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının MRS ve Skim Milk besiortamlarında EPS üretimleri (mg/L)	55
Çizelge 4.2. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının MRS ve Skim Milk besiortamlarında EPS üretimleri (mg/L)	56
Çizelge 4.3. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının % otoagregasyon değerleri.....	57
Çizelge 4.4. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının % otoagregasyon değerleri.....	57
Çizelge 4.5. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının test bakterileri ile % koagregasyon değerleri.....	61
Çizelge 4.6. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının test bakterileri ile % koagregasyon değerleri.....	61
Çizelge 4.7. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının farklı pH derecelerindeki % inhibisyon değerleri.....	66
Çizelge 4.8. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının farklı pH derecelerindeki % inhibisyon değerleri.....	66

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.9. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının farklı safra konsantrasyonlarında % inhibisyon değerleri.....	71
Çizelge 4.10. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının farklı safra konsantrasyonlarında % inhibisyon değerleri.....	71
Çizelge 4.11. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının farklı hidrokarbonlara % tutunma değerleri.....	75
Çizelge 4.12. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının farklı hidrokarbonlara % tutunma değerleri.....	75

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Prebiyotik olarak kabul edilmesi için besin öğelerinde bulunması gereken özellikler.....	4
Şekil 2.2. Probiyotiklerin etki mekanizmaları.....	17
Şekil 2.3. <i>Enterococcus</i> cinsi bakterilerinin bilimsel sınıflandırılma basamakları.....	18
Şekil 4.2. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının % otoagregasyon değerleri.....	58
Şekil 4.3. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının % otoagregasyon değerleri.....	58
Şekil 4.4. <i>Enterococcus</i> suşlarının % otoagregasyon değerleri.....	59
Şekil 4.5. <i>Enterococcus faecalis</i> suşların test bakterileri ile % koagregasyon değerleri.....	62
Şekil 4.6. <i>Enterococcus faecium</i> suşların test bakterileri ile % koagregasyon değerleri.....	63
Şekil 4.7. <i>Enterococcus</i> suşların test bakterileri ile % koagregasyon değerleri....	64
Şekil 4.8. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının farklı pH derecelerindeki % inhibisyon değerleri.....	67
Şekil 4.9. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının farklı pH derecelerindeki % inhibisyon değerleri.....	68
Şekil 4.10. <i>Enterococcus</i> suşlarının farklı pH derecelerindeki % inhibisyon değerleri.....	69
Şekil 4.11. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının farklı safra konsantrasyonlarında % inhibisyon değerleri.....	72
Şekil 4.12. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının farklı safra konsantrasyonlarında % inhibisyon değerleri.....	72
Şekil 4.13. <i>Enterococcus</i> suşlarının farklı safra konsantrasyonlarında % inhibisyon değerleri.....	73
Şekil 4.14. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının farklı hidrokarbonlara % tutunma değerleri.....	76

Şekil**Sayfa**

Şekil 4.15. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının farklı hidrokarbonlara % tutunma değerleri.....	76
Şekil 4.16. <i>Enterococcus</i> suşlarının farklı hidrokarbonlara % tutunma değerleri.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mL	Mililitre
mg	Miligram
N	Normal
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
pH	Asitlik Bazlık Birimi
spp	Species
subsp	Subspecies (Alt Tür)
vb	Ve benzeri
%	Yüzde

Kısaltmalar**Açıklama**

ark.	Arkadaşları
Bkz.	Bakınız
dk	Dakika
EPS	Ekzopolisakkarit
GİS	Gastrointestinal Sistem
GRAS	Generally Recognized As Safe
HCl	Hidrojen klorür
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MRS	Man Rogosa Sharp besiyeri
OD	Optikal Dansite
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
rpm	Dakikada Devir Sayısı
sn	Saniye
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
TCC	1,3,5-trimetil-tetrazolyum klorürü

1. GİRİŞ

Sağlıklı bir konakçının gastrointestinal sisteminde (GİS) faydalı ve zararlı olmak üzere iki grub mikroorganizma dinamik bir denge halinde bulunmaktadır ve faydalı mikroorganizmalar baskın mikroflorayı oluşturmaktadır. Sindirim sisteminde bulunan ve faydalı olarak nitelendirilen bu mikroorganizmalara “probiyotik” adı verilmektedir. Probiyotik mikroorganizmalar gıdaların sindirime, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olduğu bilinmektedir [Özer ve Akın, 2000 ; Ouwehand ve ark., 2000]. Ayrıca, probiyotik bakterilerin antikolesterol, laktoz intolerans etkileri, immün sistemin aktivasyonu, karaciğer rahatsızlıklarında olumlu etkileri, antikanserojenik etki, L (+) laktik asit üretimi gibi pek çok yararlı etkisinin olduğu da bildirilmiştir [Hirayama ve Rafter, 2000 ; Saarela ve ark., 2000].

Probiyotik bakterilerinin seçiminde birçok kriterden yararlanılmaktadır. Bu kriterlere göre probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin; midenin asidik koşullarına ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olması, otoagregasyon-koagregasyon ve bağırsak epiteline tutunma özelliklerini göstermesi, antibiyotiklere karşı dirençli olması, antimikrobiyal ve antikolesterol aktivite göstermesi gerekmektedir [Aimutus, 2001; Çakır, 2003].

Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır. Probiyotikler esas olarak laktik asit bakterileridir. Laktobasiller, Bifidobakteriler ve Enterokoklar gibi probiyotikler insanların sindirim sisteminde doğal olarak bulunmaktadır. Probiyotik olarak kullanılan *Enterococcus* bakterilerinden en çok kullanılan tür *Enterococcus faecium* iken bazı preparasyonlar *Enterococcus faecalis* türünü de içerebilmektedir [Gibson, 2002 ; Lund ve ark., 2002 ; Guslandi, 2003].

Enterococcus bakterileri bağırsağın doğal mikroflorasının bir üyesi olmaları, asit ve safra tuzuna karşı dayanıklı olmaları, safra tuzlarını hidroliz edebilmeleri, antimikrobiyal ve bakteriyosin madde üretebilmeleri ve de bağırsak yolunda yaşayabilme ve patojenlerle yarışmaları gibi faktörlerden dolayı insan probiyotikleri olarak kullanılmaktadırlar [Bhardwaj ve ark., 2008]. *Enterococcus* bakterileri fermente süt ürünlerinin olgunlaşmasında etkili rolü olan değişik enzimatik aktiviteler göstermektedirler. Enterokokların starter kültür olarak birçok peynirlerin üretim ve olgunlaşmasında da rol oynadığı bildirilmektedir [Giraffa, 2003; Foulquie Moreno, 2006]. Bu nedenle enterokokların starter kültür ve probiyotik özelliklerinin araştırılmasının önemli olduğu açıklanmıştır [De Vuyst ve ark., 2003; Vancanneyt , 2002].

Bu çalışmada, İran ve Türkiye’de üretilen bazı beyaz peynirlerden izole edilen *Enterococcus* suşlarının bazı probiyotik özellikleri incelenmiştir. Bu amaç ile; *Enterococcus faecalis* NCDO 581 ve *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 standart kültürleri ile beyaz peynirlerden izole edilen 6 adet *Enterococcus* suşunun otoagregasyon ve koagregasyon özellikleri, asit ve safra tuzuna karşı gösterdikleri tolerans ile hidrofobisite özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

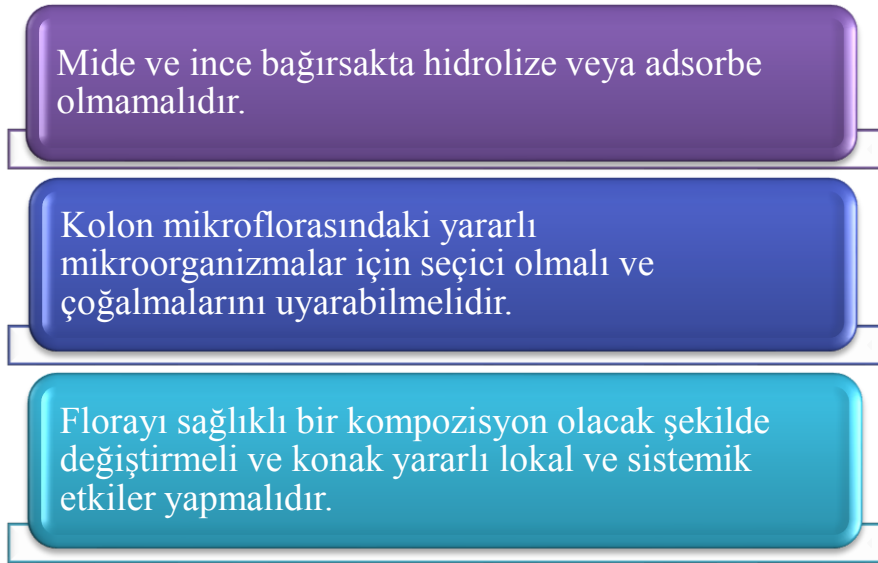
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Prebiyotikler

Prebiyotikler, intestinal florada bulunan sınırlı sayıdaki bir tür veya birkaç tür mikroorganizmanın çoğalmasını ve aktivitesini seçici olarak aktive ederek konağın sağlığını olumlu yönde etkileyebilen ve sindirilemeyen besin bileşenleri olarak tanımlanmaktadır. Prebiyotikler kolondaki yararlı mikroflora (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* gibi) tarafından selektif olarak kullanılır iken toksin üreten *Clostridium*'lar, proteolitik *Bacteriodes*'ler ve toksijenik *Esherichia coli* gibi potansiyel patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engellemektedir [Bengmark, 2001; Schrezenmeir ve Vrese, 2001].

Kolondaki mikroorganizmalar besinler ile alınan, mide ve ince bağırsakta daha önce sindirilemeyen prebiyotikler kolon mikroflorasınca fermente edilir ve açığa çıkan metabolitler mikroflora için enerji kaynağı oluşturur. Prebiyotiklerin fermentasyonu sonucu açığa çıkan bu ürünler konak için de yararlı etki gösterebilmektedir. Prebiyotiklerin kullanımı intestinal florada konak için sağlıklı bir durum yaratarak hem bazı hastalıkların tedavisinin yapılması hem de bazı hastalıkların önlenmesi mümkün hale gelmiştir. Bu nedenle besinler ile insan intestinal mikroflorasının düzenlenmesi besin biliminde popüler bir alan yaratmıştır [Gibson, 2004; Schrezenmeir ve Vrese, 2001].

Prebiyotik olarak kabul edilmesi için besin öğelerinin Şekil 2.1.'de gösterilen özellikleri taşıması gereklidir [Gibson, 2004; Schrezenmeir ve Vrese, 2001].



Şekil 2.1. Prebiyotik olarak kabul edilmesi için besin öğelerinde bulunması gereken özellikler [Gibson, 2004; Schrezenmeir ve Vrese, 2001].

Prebiyotikler oldukça güvenilir bir tedavi ajanı olarak kabul edilmektedir. İşlevleri güçlendirilmiş ve hedefi belirlenmiş prebiyotikler üretilerek ileride daha etkili bir şekilde kullanıma ihtimali vardır.

2.2. Probiyotikler

İntestinal florayı dengeleyerek insan sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalar ve bileşenlerini içeren preparatlar olarak tanımlanmaktadır. Probiyotikler bugün için birçok hastalıkta veya patolojik durumda kullanılmakta ve gastrointestinal enfeksiyonların önlenmesi veya tedavisi amacı ile insan normal ekolojisinin tekrar oluşturulması için her geçen gün daha fazla kabul görmektedir. Klinik uygulamada en fazla gastroenteritlerin oluşumunu engellemekte ve tedavisinde kullanıldığı görülmektedir ve her geçen gün kullanım alanlarına bir yenisi eklenmektedir [Dugas ve ark., 1999; Isolauri Gut, 2003].

Probiyotikler ayrıca intestinal ve vajen florasının dengesini sağlayıp patojen mikroorganizmaların çoğalmasının engellenmesi, immün sistemin şekillendirmesinin yanı sıra intestinal epitel homeostazını, bazı mineral ve vitaminlerin biyoyararlanımını artırır, serum lipid düzeyini dengeler, bağırsak motilitesini ve geçirgenliğini düzenler. Bireyin genel sağlık durumu sindirim sisteminde bulunan milyarlarca mikroorganizmaya bağlıdır. Bağırsaklardaki mikroorganizmaların bileşim ve aktivitesi; stres, hastalıklar, tıbbi tedavi, yaşlılık, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet ve alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve toksik maddeler gibi çevresel faktörlerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenebilmektedir [Ouwehve ve ark., 2001]. Bağırsak sisteminin dengesinde meydana gelen bu düzensizlikler sonucu bağırsak mikroflorasının dengesi bozulur ve faydalı mikroorganizma sayısında düşüşler başlar [Sullivan ve ark., 2002; Kaur ve ark., 2002].

Vücudun doğal intestinal florasında bulunan ve organizma için yararlı olan bakterilerin gitgide sayılarının azalması, tamamen yok olması karşısında bilim dünyası bu yararlı florayı korumak ya da tekrar geri kazanmak için arayışa girmiş ve “Probiyotik mikroorganizmaları” değişik ürünler (meyve ürünleri, meyve suları, çikolata ve et ürünleri) ile tüketime sunmuşlardır. Son yıllarda özellikle yoğurt gibi fermente süt ürünlerine eklenerek, probiyotik ürün olarak piyasaya sunulmaktadır. Yapılan çalışmalara göre, mikroflora dengesizliğinin dışarıdan yapılacak mikroorganizma takviyesi ile düzenlenebileceği belirtilmiştir. Prebiyotik ve probiyotikleri birlikte bulunduran ürünlere sinbiyotik denir. Bu şekilde bir uygulama probiyotik bakterilerin yaşam sürelerinin uzamasına ve kolonda daha iyi kolonize olmalarına olanak sağlar [Yücesan, 2002; Çakır, 2003].

2.2.1. Probiyotik bakterilerin genel özellikleri

Probiyotik bakteriler genel olarak Gram (+) veya Gram (-), sporsuz ve basil veya kok şeklinde olan bakterilerdir. Probiyotik bakteriler mide asitliğine diğer bakterilere göre daha dayanıklıdır. Safra tuzuna ve lizozim enzimine karşı daha dirençlidir. Probiyotik bakteriler laktik asit, asetik asit, bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler üreterek, bağırsaklarda istenmeyen mikroorganizmaların çoğalma hızını kontrol ederve doğal floranın denge içinde bulunmasını sağlarlar. Probiyotik bakterilerin önemli özelliklerinden biri de, bağırsak çeperine tutunabilme yeteneğine sahip olmalarıdır. Bu tutunma en önemli ve hatta biyolojik etki gösterebilmeleri için mutlaka olması gereken bir özellik olarak belirtilmiştir. Probiyotik bakteriler, bağırsak çeperine tutunarak patojen mikroorganizmaların tutunmasını engellerler. Ayrıca sindirim sırasında bağırsak hareketlerinden çok fazla etkilenmeden hızla üreyerek orijinal popülasyonda azalmayı engellerler. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların çoğu laktik asit bakterileri grubundan olup (en fazla *Lactobacillus*'lar, *Bifidobacterium*'lar) diğer türden mikroorganizmalar da (*S. boulardii*) probiyotik olarak kullanılmaktadır. *Lactobacillus* türleri, ince bağırsakta fazla sayıda bulunurken, *Bifidobacterium*'lar kalın bağırsaktadırlar. Probiyotiklerin bulunduğu konakçıdaki diğer mikroorganizmalara karşı güçlü bir etkileri ve konakçıya yararları olduğu kesin olarak kabul edilmiştir. Ancak probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda bazı özelliklerin bulunması istenmektedir [Gismondo ve ark., 1999; Yılsay ve Kurdal, 2000].

2.2.2. Probiyotik mikroorganizmalarda bulunması gereken özellikler

Probiyotik preparatlarında bulunan mikroorganizmalar, bağırsak sistemi florası ile rekabet etmek zorundadır. Bu sistemde bulunan mikrobiyal flora üzerine bir etki yapabilmesi için de probiyotik preparatında bulunan mikroorganizmaların bazı karakteristik özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda probiyotik mikroorganizmalarda gereken özellikler belirlenmiştir [Salminen, 1998].

Bunlar;

1. Güvenilir olmalı, kullanım sonucu insan veya hayvanlarda yan etkisi olmamalıdır.
2. İnsanlar için kullanılacak olan suşların tercihen insan kaynaklı olması gerekli olup, sağlıklı bir insanın mide-bağırsak sisteminden izole edilmelidir.
3. Stabil olmalı, düşük pH ve safra tuzlarına gibi olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklı olmalıdır.
4. Mide ve bağırsak kanalından geçişleri sırasında canlı kalabilmelidirler, etkilenmeden bağırsakta etkisini gösterebilmelidir,
5. Epitel yüzeylere tutunmayı sağlayan maddeler (Ekzopolisakkarit, lektin vb.) üretebilmelidirler.
6. Bakterinin yüzeyi hidrofobik yapıda olmalı, agregasyon ve koagregasyon yeteneğine sahip olmalıdır.
7. Bağırsak hücrelerine tutunabilmeli, kolonize ve metabolize olabilmelidir,
8. Kanserojenik ve patojenik bakterilere karşı antagonistik etkileri olmalı ve antikarsinojenik aktivite gösterebilmelidir.
9. Bakteriyosin, hidrojen peroksit, kısa yağ asitleri, laktik asit ve propiyonik asit gibi organik asitler ve antimikrobiyal maddeler sentezleyerek bağırsak hastalıklarını engelleyebilmelidir.
10. *Helicobacter pylori*'nin gelişimini engelleyebilmelidir.
11. Kan basıncı ve serumda kolesterol konsantrasyonunu düşürebilmelidir.
12. Antibiyotiğe bağlı (diyare) ortaya çıkan hastalıklarda bağırsak florasını düzeltmek amacı ile kullanılabileceğinden, insan ve hayvan sağlığında çeşitli nedenlerden dolayı kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli olmalıdır, bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemelidir.
13. Konakçı hücrelerde fazla sayıda bulunabilmeli, konakta hastalıklara karşı direnç artışı gibi yararlı etkiler oluşturma yeteneğinde olmalıdır.
14. Üretim ve depolama aşamalarında canlılığını ve aktivitelerini koruyabilmeli, minimum etki dozları bilinmediğinden, canlı hücrelerde büyük miktarlarda bulunabilmelidir.

15. Probiyotiklerden hazırlanan preparatlar patojenik olmamalı ve toksik madde üretmemeli, çok suşlu preparatların hazırlanmasına uygun olmalıdırlar [Pelto, 1996; Gamez, 1997; Kabir, 1997; Gırsmondo, 1999; Ocana, 1999; Yıldırım, 2000; Yılsay, 2000].

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilebilmesi için gerekli bazı özellikler şöyle açıklanabilir;

1. Asit ve Safra Tuzu Toleransı: Bu özellik, pH'nın 1.5'e kadar düşebildiği midede ve asidik ürünlerde probiyotik organizmaların canlı kalabilme kabiliyeti olup, probiyotik organizmaların en önemli seçim kriterlerinden biridir. Yani probiyotik organizmalar mide asitliğinde canlı kalabilmeli, bağırsağa canlı olarak ulaşabilmeli ve burada da canlılığını koruyabilmelidir [Shah, 2001].

2. Antagonizm: Probiyotik organizmalar sitrik asit ve hippurik asit gibi bir takım asitleri oluştururlar. Laktik asit bakterileri (*L. acidophilus* ve *L. casei*), fermantasyon sonucunda temel olarak laktik asit üretirler. Bifidobakteriler ise asetik asit ve laktik asit üretirler. Laktik asit bakterileri organik asit üretilmelerinin yanı sıra hidrojen peroksit (H_2O_2), diasetil ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler de üretebilirler. Bu maddeler, bozulmaya sebep olan organizmaları ve gıda kaynaklı patojenleri inhibe etmektedir. Bu nedenle probiyotik bakteri kombinasyonu kullanılmadan önce, bakterilerin birbirlerine karşı antagonistik etkileri mutlaka kontrol edilmelidir [Dave ve Shah, 1997].

3. Tutunma Özellikleri: Tutunma, probiyotik bakterilerin en önemli seçim kriterlerinden biridir. Bu özellik sayesinde bakterilerin bağırsaklara tutunması, koloni oluşturmaları ve çoğalmaları arzulanır. Bağırsaklarda hücre duvarına tutunma, sindirim sistemindeki kolonizasyon için önemli bir özelliktir [Coconnier ve ark., 1992; Bernet ve ark., 1993].

4. Proteolitik Aktivite: Yoğurt geleneksel olarak *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* kullanılarak üretilir ve bu bakteriler, proteolitik tabiatı ile simbiyotik ilişkilerinden dolayı esansiyel aminoasitleri üretirler. Bu iki bakteri sütte çok hızlı gelişirken, *L. acidophilus* ve Bifidobakteriler, proteolitik aktivitelerinin eksikliğinden dolayı sütte yavaş gelişirler. Bundan dolayı probiyotik ürünlere, yoğurt bakterilerinin katılması fermentasyon süresinin azaltılması için gereklidir. Yoğurt bakterileri ile karıştırıldığı zaman, probiyotik bakterilerin fermentasyon süresi 24 saatte gerçekleşebiliyorken, yoğurt bakterileri için bu süre yaklaşık 4 saattir. Sonuç olarak yoğurt bakterilerinin, probiyotik bakterilerle beraber kültür olarak kullanılması önerilmektedir [Dave ve Shah, 1997].

Shihata ve Shah (2000), *S. salivarius* ssp. *thermophilus* ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un probiyotik bakterilerden (*L. acidophilus* ve *bifidobakteriler*) daha yüksek proteolitik aktivite gösterdiklerini saptamışlardır. Bu açıdan probiyotik bakterilerin seçiminde proteolitik aktivitenin önemli olduğunu belirtmişlerdir.

5. β - D- galaktosidaz Aktivitesi: Yapılan çalışmalar yoğurt bakterilerinin, probiyotik bakterilere göre daha fazla β -galaktosidaz aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle yoğurt bakterileri, probiyotik bakterilerle beraber kullanıldığında, probiyotik bakterilerden daha hızlı geliştikleri için, proteolitik ve β - D- galaktosidaz aktivitelerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [Shah ve Jelen, 1990; Shah, 1994; Shah, 2001].

2.2.3. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

İnsan sağlığı ve beslenmesi açısından oldukça önemli terapötik ve diyetetik özellikleri olduğu bilinen probiyotik bakteriler Dünyada değişik yörelerde farklı fermente ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki faydalı etkileri ile sağlıklı yaşam arasındaki ilişki ilk kez Elie Metchnikoff'un incelemelerine bağlı olarak ortaya çıkmış olup, günümüzde de hala doğruluğunu korumaktadır [Salminen ve ark., 1992; Hirayama ve Rafter, 2000; Saarela ve ark., 2000; Aimutus, 2001].

Ancak, son yıllarda yapılan araştırmalarda, fermente süt ürünlerinden izole edilen bakteriler dışında, bağırsak kökenli bakterilerin de probiyotikler özelliklere sahip olduğunu gösterilmiştir [Sanders, 1999].

Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmakta olup, esas olarak laktik asit bakterileridir. En yaygın olarak kullanılan bakteriler ise laktik asit bakterilerinden olan *Enterococcus*, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerinden oluşmaktadır. Özellikle laktobasiller probiyotik olarak kullanılan bakterilerin başında gelmektedir. Ancak, günümüzde diğer bazı mikroorganizmalar da probiyotikler arasında yer almıştır [Salminen, 2002].

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus* ve *Propionibacterium* cinslerine ait olan bazı türler olarak bildirilmiştir [Garsse, 2003]. Araştırmalar Mayalar (*Saccharomyces cerevisiae* ve *S. boulardii*) ve filamentöz funguslerin (*Aspergillus oryzae*) de probiyotik özelliğe sahip olduğunu göstermiştir [Parvez, 2006].

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.2.'de verilmiştir [Salminen, 2002; Parvez, 2006; Jan, 2002].

Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar [Salminen, 2002; Parvez, 2006; Jan, 2002].

<i>Lactobacillus</i> Türleri	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus cellebiosus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus johsonli</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>

Çizelge 2.2. (devamı) Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar [Salminen, 2002; Parvez, 2006; Jan, 2002].

<i>Bifidobacterium</i> Türleri	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>

<i>Bacillus</i> Türleri	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus lentus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	

<i>Streptococcus</i> Türleri	
<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	

<i>Bacteriodes</i> Türleri	
<i>Bacteriodescapillus</i>	<i>Bacteriodes suis</i>
<i>Bacteriodes ruminicola</i>	<i>Bacteriodes amylophilus</i>

<i>Pediococcus</i> Türleri	
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	

Çizelge 2.2. (devamı) Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar [Salminen, 2002; Parvez, 2006; Jan, 2002].

<i>Propionibacterium</i> Türleri	
<i>Propionibacterium shermanii</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>

<i>Enterococcus</i> Türleri	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>

<i>Leuconostoc</i> Türleri	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	

Mayalar	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Cveida torulopsis</i>

Küfler	
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>

2.2.4. Probiyotiklerin alındığı kaynaklar

Günümüzde tıp alanında birçok hastalığın tedavi edilmesinde veya tekrarının önlenmesinde, probiyotiklerin kullanılma olgusunun artmasıyla birlikte bunların genellikle fermente süt ürünleri ile diyetlerde uygulanmaya başlanmasına ve tıp alanında yeni tedavi oluşumlarına kaynak teşkil ettiği görülmektedir. İnsan vücudundaki biyolojik fonksiyonları olumlu yönde etkileyen, sağlık düzeyini iyi yönde geliştiren ve hastalık gelişme riskini azaltan gıdalar “fonksiyonel gıdalar” olarak adlandırılmaktadırlar. Probiyotik mikroorganizmalar içeren tüm ürünler bu gıda kategorisi içerisinde değerlendirilmektedir [German ve ark., 1999].

Fonksiyonel gıdalarla alınan probiyotik ve prebiyotiklerin sindirim sistemindeki fonksiyonları şöyle sıralanmaktadır: [German ve ark., 1999].

1. Probiyotik ve prebiyotikler, bağırsakta bulunan *Clostridium* sp., *Salmonella* sp. gibi patojen bakteriler ve mide mukozosundaki *Helicobacter pylori* gibi çeşitli patojen bakterilerin gelişimini engelleyerek sindirim sisteminin mikroflorasını ve bağırsak epitelinin bariyer özelliklerini düzenlerler.
2. Probiyotik ve prebiyotikler gıdaların emilimini kolaylaştırarak, tamamen hazmedilmesine katkıda bulunur.
3. Mide ve bağırsaktaki beslenmeyi engelleyen faktörleri ortamdan uzaklaştırarak, vitamin ve minerallerin emilimini kolaylaştırır.
4. Sindirilemeyen oligosakkaritler ve diğer bileşenler ile probiyotik mikrofloranın gelişimini sağlarlar.

İnsan sağlığına faydalı etkilerinin olduğu düşünülen canlı bakteri hücreleri üç temel kaynaktan alınmakta;

1. Fermente süt ürünleri,
2. Gıdalara ve içeceklere bu bakterilerin canlı hücrelerinin eklenmesi,
3. Probiyotik bakterilerin canlı hücrelerinden hazırlanan farmakolojik ürünler olarak tablet veya kapsüllerin hazırlanmasıyla alınmakta olup, fonksiyonel gıdalar kapsamında değerlendirilmektedir [German ve ark., 1999].

Probiyotik bakterilerle zenginleştirilmiş fonksiyonel gıdalar içerisinde yer alan fermente süt ürünleri, detaylı bir şekilde araştırılmıştır [Saxelin ve ark., 2005]. Canlı probiyotik bakteri taşıyıcısı olarak en uygun fermente süt ürününün peynir olduğu ispatlanmıştır. Peynirin katı yapısı, yüksek pH' ısı, tampon kapasitesi ve yağ içeriği, bakterileri bağırsakta yararlı olacakları bölgeye varıncaya kadar, diğer fermente süt ürünlerine göre daha iyi ve daha etkili koruyabildiği gösterilmektedir [Settanni ve Moschetti, 2010].

Probiyotikleri İçeren Fermente Süt Ürünleri

Probiyotik bakterilerin bulunma miktarlarını olumsuz yönde etkileyen faktörlerin bireye etkilerini azaltabilmek için yeni beslenme şekilleri geliştirilmiştir. Probiyotiklerin ağız yoluyla alınması bu beslenme şekillerinden biridir. Probiyotik süt ürünleri ülkemizde yeni üretilmekle birlikte, birçok ülkede bu ürünlerin tüketimi gün geçtikçe artmaktadır. Süt endüstrisinin en önemli probiyotikleri fermente süt ürünleridir. Probiyotik süt ürünlerinden bir diğeri ise yoğurttur. Fermente süt ürünlerinde en çok kullanılan *Lactobacillus* türleri *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'dur. Bağırsak sisteminde bulunan *Lactobacillus acidophilus*, insan sindirim sisteminin doğal bir üyesi olup, sindirim sisteminde bulunan yüksek asitlik, bazı enzimlerin inhibe edici etkisine ve safra tuzlarına karşı dayanıklıdır. *Bifidobacterium* türlerinin başlangıçta yalnızca bebeklerin bağırsak florasında olduğu düşünülmüşse de, sonraki çalışmalarda bunların erişkin insanlarda ve sıcakkanlı hayvanlarda da bulunduğu tespit edilmiştir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri, ince bağırsaktaki mukoz membran tarafından tutulmakta, burada oluşturdukları asit ve diğer metabolik ürünler ile patojen ve diğer mikroorganizmalara karşı direnç göstermektedir. Bu durumda, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* içeren ürünlerin düzenli olarak tüketilmesi bu bakterilerin bağırsak sistemlerine tutunmasını sağlamakta ve tedavi edici bir özellik göstermesine sebep olmaktadır. Mide ve bağırsak enfeksiyonları için klasik antibiyotik tedavilerine alternatif olarak probiyotik ürünler kullanılması tavsiye edilmektedir [Özer ve Akın, 2000; Fuller, 1989].

2.2.5. Probiyotiklerin mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine sağladığı yararlar ve etki mekanizması

Probiyotiklerin bağırsak fizyolojisi üzerine doğrudan ya da dolaylı etkide bulunarak immün sistemi uyardığı, bu sayede konakçının ağız ve sindirim sistemi, üst solunum yolu ve ürogenital sistem mukozal yüzeyini olumlu yönde etkilediği, sağlığı geliştirici ve hastalık riskini azaltıcı bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir [Sillanpaa, 2001].

Probiyotik bakterilerin olumlu etkilerinin sadece bununla kalmayıp, diyarelerin önlenmesi, laktozun sindirimine katkı, ince bağırsakta arzu edilmeyen bakteri gelişiminin engellenmesi, enterik patojenlere etkileri, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, kandaki kolesterol seviyesinin düşürülmesi ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarının önlenmesi gibi sağlık üzerinde birçok önemli etkisinin olduğu bildirilmiştir [Çakır, 2003; Marteau, 2001; Kos, 2003; Yücesan, 2002; Wendakoon, 2002].

Yapılan çalışmalarda probiyotik bakterilerin; *Saccharomyces boulardii*'nin, *Cveida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella* ve *Esherichia coli* gibi patojen bakterilerin üremesini baskıladığı tespit edilmiştir. Probiyotik bakteriler patojenlerin adezyonunu önleyerek; sayı ve hacim avantajları ile bağırsak ve ürogenital sistem epitel hücrelerinde, patojenlerin girmesini zorlaştırırlar. Epitelyal bariyeri güçlendirerek, patojenlerin translokasyonunu önlerler. Patojen bakterilerin üremesi için gereksinim duydukları besin maddelerini tüketerek, üremelerini inhibe ederler. Bu çalışmada da probiyotik bakterilerin *Saccharomyces boulardii*, *Clostridium difficile*'nin gereksinim duyduğu monosakkaritleri tüketerek bu türün gelişimlerini önledikleri tespit edilmiştir [Castagliuolo ve ark., 1999].

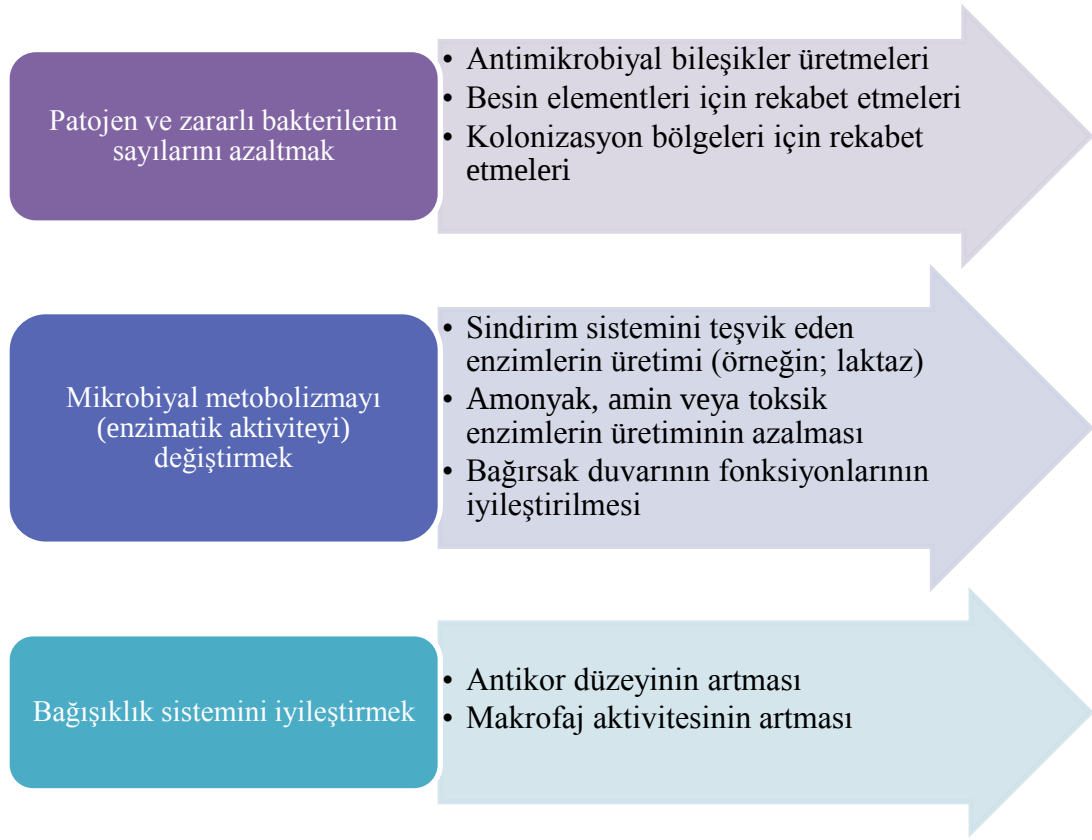
Probiyotik bakteriler, laktaz, maltaz ve sükras aktivitesini arttırarak, bağırsak enzim aktivitesine etki ederler. *Saccharomyces boulardii* poliaminleri, aminopeptidazların olgunlaşmasını sağlar [Mathieu ve ark 1993]. Toksin ve toksin reseptörlerine etki ederler. *Saccharomyces boulardii* 54 kDa proteini proteaz aktivitesinde olup, *Clostridium difficile* toksin A üzerine direkt olarak ya da toksinin reseptöre bağlanmasını önleyerek etki eder. Hayvan modellerinde, 120 kDa proteinin etkisi ile cAMP, adenilat siklaz aktivitesi azalarak, su-sodyum hiper sekresyonunun azaldığı gösterilmiştir [Reid ve ark., 2003].

Yapılan bir diğer çalışmada ise probiyotik bakterilerin immün sistemi üzerine de etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Hem antibiyotik hem de *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus bulgaricus* ile beslenen farelerde lamina propriada lenfosit proliferasyonu saptanmış, plazma hücrelerinin sayısı artmıştır [Kognoff, 1993].

Bifidobacterium breve ile yapılan hayvan deneyinde, peyer plaklarında antikör üretiminin arttığı saptanmıştır. *L. casei shirota* suşu verildiğinde, T-helper sayısında artma, IgE düzeyinde azalma görülmüştür [Kognoff, 1993].

Probiyotikler, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin salınımını aktive ederek, immün sisteme düzenleyici etki gösterirler. Probiyotiklerin, hayvan modellerinde, dışkıda karsinojenleri aktive eden bakteriyel enzimleri inhibe ederek, karsinojenlerin yapısını bozarak anti-karsinojen etkilerinin olduğunda tespit edilmiştir [Karahan, 1999].

Probiyotik bakterilerin insan sağlığı açısından bu olumlu etkileri gösterebilmeleri için sahip olmaları gereken etki mekanizmaları bulunmaktadır. Probiyotiklerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar, ilk olarak gastrointestinal sistemdeki bozukluklara dayanarak ortaya çıkan bağırsak florasının düzensizliğiyle ilgili yapılmaya başlanmıştır [Klaenhammer, 1999]. Yapılan çalışmalar sonucunda bu mikroorganizmaların, patojen bakterilerin üremesini engelleyen inhibitör antimikrobiyal peptid (mikrosin, bakteriyosin) maddeler üreterek, patojen mikroorganizmalar üzerine direkt antagonistik etki gösterdikleri belirlenmekle birlikte, probiyotiklerin etki mekanizmaları hakkında özellikle üç mekanizma önerilmektedir. Bu üç mekanizma Şekil 2.2.'de gösterilmiştir [Yıldırım ve Yıldırım, 2000].



Şekil 2.2. Probiyotiklerin etki mekanizmaları [Yıldırım ve Yıldırım, 2000].

2.3. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) içerisinde *Streptococcaceae* familyasına ait *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Pediococcus* cinsi ile *Lactobacillaceae* familyasındaki *Lactobacillus* türleri bulunur [Halkman ve Halkman, 1991; Tekinşen ve Atasever, 1994]. *Enterococcaceae* familyasında ise *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus* ve *Vagococcus* cinsi bakteriler yer almaktadır [Klein ve ark., 1998]. En önemli laktik asit bakteri cinsleri *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* ve *Tetragenococcus*'dur [Halkman ve Halkman, 1991; Tekinşen ve Atasever, 1994].

2.3.1. *Enterococcus* cinsi bakterilerin bilimsel sınıflandırılması

Başlangıçta *Streptococcus* cinsi içerisinde yer alan enterokoklar, “fokal streptokoklar” veya “Lancefield serolojik D grubu streptokoklar” olarak bilinmekteydi. 1984 yılında DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyon çalışmaları ile bunların streptokoklardan farklılığı ortaya konmuş ve buna bağlı olarak *Enterococcus* ayrı bir cins kabul edilmiştir [Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984]. *Enterococcus* cinsi bakterilerinin bilimsel sınıflandırılma basamakları Şekil 2.3.’te gösterilmiştir [Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984].



Şekil 2.3. *Enterococcus* cinsi bakterilerinin bilimsel sınıflandırılma basamakları [Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984] .

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda 16S rRNA DNA sekans analizi ve DNA-DNA hibridizasyon teknikleri kullanılarak *Enterococcus* cinsi altında toplanan 32 tür bulunmaktadır [Foulquie Moreno ve ark., 2006; Ogier ve ark., 2008; Svec ve ark., 2006].

Yeni literatürlerde *Enterococcus* cinsi altında toplanan türler Çizelge 2.3.'te gösterilmektedir [Foulquie Moreno ve ark., 2006; Ogier ve ark., 2008; Svec ve ark., 2006].

Çizelge 2. 3. Literatürlerde *Enterococcus* cinsi altında toplanan türler [Foulquie Moreno ve ark., 2006; Ogier ve ark., 2008; Svec ve ark., 2006].

<i>Enterococcus</i> Cinsine Ait Türler			
<i>E. asini</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. moraviensis</i>	<i>E. saccharominimus</i>
<i>E. avium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. solitarius</i>
<i>E. canis</i>	<i>E. flavescens</i>	<i>E. pallens</i>	<i>E. sulfureus</i>
<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. phoeniculicola</i>	<i>E. villorum</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>E. gilvus</i>	<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. italicus</i>
<i>E. columbae</i>	<i>E. haemoperoxidus</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. hermanniensis</i>
<i>E. dispar</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. ratti</i>	<i>E. termitis</i>
<i>E. durans</i>	<i>E. malodoratus</i>	<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. silesiacus</i>

2.3.2. *Enterococcus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Enterokoklar laktik asit bakterilerinin (LAB) başlıca cinslerinden birini oluşturmaktadır. Çevre şartlarına dirençli olmaları ve adaptasyon kabiliyetlerinden dolayı su, toprak, bitkiler ile insan ve hayvanların gastrointestinal sistemleri gibi oldukça geniş bir çevrede bulunabilmektedirler.

Enterokoklar çoğunlukla bitkisel ve hayvansal kaynaklardan kontaminasyon sonucu gıdalarda bulunabilmekle beraber peynirler gibi çok sayıda fermente gıdanın üretim ve olgunlaşmasında da önemli roller oynamaktadırlar [Franz ve ark., 2003].

Eskiden *Streptococcus* (D grup streptococci) cinsinin bir parçası olan *Enterococcus*lar Gram-pozitif, birkaç istisna dışında hareketsiz, spor oluşturmayan, fakültatif anaerob, katalaz negatif (oksijen varlığında gelişen ve pseudokatalaz üreten bazı türler hariç), oval kok formunda, genellikle diplokok veya kısa zincir görünümündedirler. Cins, antijenik, hemolitik ve fizyolojik özelliklerin kombinasyonu ile tanımlanmaktadır. Gram negatif bakterilere kıyasla, beslenme gereksinimleri açısından daha seçicidirler. Geliştirildikleri besiyerinde daha fazla üreme faktörüne gereksinim duymaları açısından da diğer pek çok Gram pozitif bakteriden ayrılırlar. Örneğin, gelişebilmeleri için B vitaminleri ve bazı temel aminoasitler açısından pek çok Gram pozitif bakteriden çok daha fazla oranda besin maddesine ihtiyaç duyarlar. Belirli türlerin üreme faktörü olarak bazı spesifik aminoasitlere gereksinim duymalarından dolayı bu spesifik aminoasitlerin nicel olarak belirlenmesinde test organizması olarak kullanılmaktadırlar.

Enterococcus'ların optimum üreme sıcaklıkları 35 °C olmasının yanı sıra enterokok türlerinin bir çoğu 10-45°C'lerde iyi gelişim gösteren mikroorganizmalardır. 50 °C'de iyi gelişmekte olan *Enterococcus* suşları olmasına rağmen, bazı suşlar 52 °C'de gelişmemektedir. Enterokoklar pH; 4-9,6 gibi geniş bir pH aralığında gelişebilmektedirler [Wood ve Holzapfel, 1995]. Bununla birlikte %6,5 NaCl içeren ortamda üreme yeteneğine sahip olup, birçok tür %40' lik safra tuzları bulunan ortamlarda eskulini hidroliz edebilirler. Türlerin çoğu Lancefield D-grubu antijeni olarak bilinen hücre duvarına bağlı gliserol teikoik asit antijeni üretirler. Birçok suş fruktoz, galaktoz, maltoz, mellebiyoz, sellebiyoz ve laktoz'dan asit üretmektedir. Arginin'den amonyak üreterek enerji kaynağı olarak kullanırlar. Tirozin dekarboksilasyonları suşlara göre farklılık göstermektedir [Buchanan ve Gibbons, 1974; Kılıç, 2001].

Enterokok türlerinin bazı fizyolojik özellikleri Çizelge 2.4.' te gösterilmektedir.

Çizelge 2.4. *Enterococcus* türlerinin tipik fizyolojik özellikleri [Franz ve ark., 2003].

Bakteri Türleri	Üreme Sıcaklığı		Farklı Ortamlarda Üreme Durumu				Eskulin Hidrolizi	D-grubu Antigeni
	10°	45° C	pH 9,6	% 6,5	% 40	% 0,0 4		
<i>E. asini</i>	(+)	(+)	n.d.	–	+	n.d.	+	+
<i>E. avium</i>	V	+	+	V	V/ +	n.d.	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	V/ +	+	+	+	+
<i>E. cecorum</i>	–	+	(+)	–	(+)	–	+	–
<i>E. columbae</i>	–	n.d.	n.d.	–	(+)	–	+	–
<i>E. dispar</i>	+	–	n.d.	+/_	+	–	+	–
<i>E. durans</i>	+	+	+	+	+	+	+	(+)
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. flavescens</i>	V/_	V/ +	n.d.	+	+	+	+	+
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. haemoperoxidus</i>	+	–	n.d.	+	+	+	+	+
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. malodoratus</i>	+	–	+	+	+	n.d.	+	+
<i>E. moraviensis</i>	+	–	n.d.	+	+	+	+	+
<i>E. mundtii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. porcinus</i>	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	+
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	+	+/_	V/ +	n.d.	+	–
<i>E. raffinosus</i>	(+)	+	+	+	V/ +	n.d.	+	n.d.
<i>E. ratti</i>	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	(+)
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	n.d.	(+)	+	n.d.	+	–
<i>E. solitarius</i>	+	+	n.d.	+	+	n.d.	+	+
<i>E. sulfureus</i>	+	–	n.d.	+	+	n.d.	+	–
<i>E. villorum</i>	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	+	n.d.

+, pozitif reaksiyon; –, negatif reaksiyon; (+), zayıf pozitif; V, değişken; +/_ , literatürlerdeki farklılık; n.d., test edilmedi

Bunların yanı sıra, geniş bir pH aralığında ve pek çok patojen bakterinin gelişemediği alkali pH 'da (pH 9,6) gelişebilen Enterokoklar düşük O/R potansiyelindeki (Eh) ortamlarda da çok iyi gelişirler. Sodyum azid, safra tuzu ve sodyum klorüre dayanıklıdırlar. *Enterococcus* cinsine ait tüm türler % 40 safra tuzu ve % 3 NaCl içeren besiyerlerinde gelişebilirken, *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* türleri tuza daha dirençli olup % 6,5 tuz konsantrasyonunda gelişebilirler.

Termodurik bakterilerdir, süte uygulanan pastörizasyon işlemi ile elimine edilemezler. *Escherichia coli* 'ye kıyasla donma ve kurutmaya karşı daha dayanıklıdırlar. Bütün türleri eskülini hidroliz eder ve 1,3,5-trimetil-tetrazolyum klorürü (TCC) indirgerler. *E. casseliflavus* ve *E. mundtii* türleri sarı pigment oluştururken *E. avium* ve *E. malodoratus* türleri de H₂S oluştururlar. *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* türleri ise menakuinon üretirler. Diğer yandan Enterokoklar birçok karbonhidratı fermentatif olarak kullanırlar. *E. faecalis* ve *E. faecium* karbonhidratlardan fermentasyon yoluyla başlıca ürün olarak laktik asit ürettiklerinden, çeşitli peynirlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılabilirler. Örneğin Cheddar peyniri, yumuşak İtalyan peyniri ve bazı İsviçre peynirlerinin yapımında asit, tat ve aroma oluşumu için kullanılmaktadır.

Enterokoklar, insan dışkısında genellikle *Escherichia coli*'den daha az sayıda bulunan, suda iyi üreyemeyen ancak koliformlardan daha uzun süre canlılıklarını koruyan bakterilerdir [Kavas ve Kınık, 2003]. Bundan dolayı sularda enterokoklar fekal kontamiasyonun göstergesi [Lopez-Diaz ve ark., 1995] ve özellikle sularda hijyen indikatörü olarak değerlendirilmektedirler [Arizcun ve ark., 1997]. Ancak daha doğru sonuç elde edebilmek için klasik enterokokların koliform bakteri veya toplam bakteri sayısı ile birlikte verilmesinin uygun olacağı tartışılmaktadır. 4 Avrupa ülkesinde 2868 örnekte yapılan bir çalışmada enterokokların gıda zincirinin birçok bölümünde yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir [Kühn ve ark., 2003].

"Klasik enterokok" lar gıda endüstrisinde kullanılan ısıtma, kurutma, dondurma gibi işlemler ile temizlik ve dezenfeksiyon maddelerine karşı nispeten dirençlidirler. Bu nedenle işlem görmüş gıdalar özellikle de dondurulmuş gıdalar için koliform bakterilere kıyasla daha iyi bir sanitasyon veya fekal kontaminasyon indikatörü olma özelliğine sahiptirler. Bir gıdaya uygulanan işlemle, gıdada bulunan enterokok sayısının yorumlanması yakından ilişkilidir. Düşük enterokok sayım sonuçları işlem görmemiş gıdalar için önemsiz kabul edilirken dondurulmuş, pişirilmiş veya işlem görmüş diğer bazı gıdalarda önemli olarak kabul edilir. Süt işletmelerinde sıklıkla rastlanıldığı gibi yetersiz sanitasyon uygulamaları nedeni ile enterokoklar, işletmelerde alet ve ekipmanların yüzeylerinde yerleşik flora haline gelerek buralardan sürekli olarak gıdalara bulaşabilirler. Ancak işlenmiş ürünlerdeki enterokok varlığı, bu üründe her zaman için enterik patojen varlığını göstermeyebilir. Çünkü enterokoklar, enterik patojenlere kıyasla uygulanan işlemlere karşı daha dirençlidirler.

Enterokok içeren gıdaların sağlık riski olmaksızın tüketiminin uzun bir tarihi olmasına karşın enterokokların gras mikroorganizma olarak kabul edilmesi çok daha fazla çalışmayı gerektirmektedir. Patojenlik potansiyeli veya antibiyotik rezistansı, suşa spesifik gözükmekte veya izolasyon kaynağına bağlıdır. Bu bakterilerin bazıları güvenilir ve kullanılma potansiyeli olan bakteriler olarak kabul edilebilir. Bu türlerden *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* en çok bilinen türler olup, fermente gıdaların üretimi ve probiyotik ürün teknolojisinde önemli rollere sahiptirler [Franz ve ark., 2003].

E. faecalis insan ve hayvan dışkısında bulunan fekal orijinli bir türdür. Ancak bu bakterilere insan ve memeli hayvanların dışkısı dışında toprak, su, bitki ve böcek gibi birçok çevrede de rastlanmaktadır. Bu nedenle gıdalarda enterokokların bulunması, gıdanın dışkı ile doğrudan kontamine olduğu ve *Salmonella* ile *Listeria* gibi diğer enterik patojenlerin de bu gıda maddelerinde bulunabileceği anlamına gelmez.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla çevre şartlarına oldukça dayanıklı olan Enterokokların bazı gıdaların mikroflorasında bulunduğu ve gıda kalitesi üzerine olumlu etkilerinin belirlenmesinin ardından Enterokokların yalnızca hijyen indikatörü olarak değerlendirilmemesi gerektiği ortaya çıkmıştır.

E. faecalis 'in bazı türlerinin bitkilerde de yaygın olarak bulunması bu bakterilerin sanitasyon indikatörü olarak değerini büyük ölçüde azaltmaktadır. Ancak *E. faecalis* 'in fekal veya fekal olmayan türlerini biyokimyasal testlerle (Litmus Milk besiyerindeki reaksiyonları Melizitoz ve Melibiyoz Broth 'da oluşturduğu fermentasyon tipleri) ayırmanın mümkün olduğu bilinmektedir.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'de (1994) *Streptococcus* cinsinden ayrılan yeni bir cins olarak gösterilen Enterokokların identifikasyonlarında genellikle çeşitli problemler yaşanmaktadır. Özellikle çevresel kaynaklardan izole edilen çok sayıda enterokok izolatu yalnızca fenotipik özellikler dikkate alınarak identifiye edilmeye çalışıldığında söz konusu işlem başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Fizyolojik testler kullanılarak bir *Enterococcus* türü içerisindeki izolatların açık bir şekilde karakterize edilmesi fenotipik özelliklerdeki yüksek heterojenite nedeniyle oldukça zordur [Giraffa, 2003].

2.3.3. *Enterococcus* cinsi bakterilerin insanların normal florasındaki etkileri

Enterococcus türlerinin çoğu insanın gastrointestinal sisteminin normal florasıdır. İnsandan klinik olarak izole edilen enterokokların çoğu (%80-90) *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur, bunlar enterokok enfeksiyonlarının %5-10'unda bulunurlar. Diğer Enterokok türlerine daha az sıklıkla rastlanır [Devriese ve ark., 1990]. Enterokokların farklı türlerinin insandan diğer kaynaklarda bulunması ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Çünkü bu cinsin taksonomisi değişmiştir yeni araştırmalarda en son taksonomi önerilerine dayanarak, Enterokok türlerinin hayvanlarda ve çevredeki dağılımları insanlardakinden daha farklı olduğu bildirilmiştir [Devriese ve ark., 1990].

2.3.4. *Enterococcus* cinsi bakterilerin fonksiyonel özellikleri

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Asitlik Aktivitesi

Enterokoklar, glikoz ve laktozu homofermentatif laktik asit fermantasyonu ile pirüvik asite dönüştürürler. Piruvattan da laktat dehidrogenaz enzimi ile L-laktik asit oluştururlar. Sütte enterokokların asit üretim yetenekleri genellikle düşüktür. Genel olarak enterokoklar sütü asitleştirme kabiliyeti açısından zayıf bir yapı sergilemektedirler. Sarantinopoulos ve ark., (2001), çeşitli kaynaklardan izole ettikleri 129 Enterokok'un (*E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans*) biyokimyasal ve teknolojik özelliklerini incelemiştir. Çalışmada genel olarak enterokokların asidifikasyon kabiliyetleri açısından zayıf olduğu ve en etkin türün *E. faecalis* olduğu belirlenmiştir.

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Sitrat Metabolizması

Sitrat metabolizması laktik asit bakterilerinin önemli bir teknolojik özelliğidir [Rea ve Cogan, 2002]. Sütte bulunan sitrat birçok laktik asit bakterisi tarafından asetat, asetaldehit ve diasetil gibi lezzet bileşiklerine metabolize edilmektedir [Rea ve Cogan, 2003].

Enterokokların pirüvat metabolizması hakkında çok sayıda çalışma yapılmış iken [Rea ve Cogan, 2003] enterokokların sitrat metabolizması ile ilgili oldukça az bilgi mevcuttur [Rea ve Cogan, 2002]. Yapılan bir araştırmada, gıdalardan izole edilen *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* tek karbon kaynağı olarak sitrat ve pürivatı kullanma açısından farklılık göstermiş ve *E. faecalis* organik asitleri kullanma açısından diğer iki türe göre daha aktif bulunmuştur [Sarantinopoulos ve ark., 2001]. Peynir olgunlaşması sırasında sitrat ve laktozun parçalanması asetaldehit, etanol, diasetil, aseton ve asetoin gibi lezzete katkıda bulunan bir seri uçucu bileşiğin açığa çıkmasını sağlamaktadır [Rea ve Cogan, 2003; Sarantinopoulos ve ark., 2002].

Bu bağlamda, süt ürünlerinden izole edilen bir çok *E. faecalis* ve *E. faecium* suşu sütte geliştiklerinde asetaldehit, etanol, diasetil ve asetoin'in iyi üreticileri olarak görülmektedir ve bu bileşikler peynirin aroma ve lezzetine katkıda bulunmaktadır. Bu bulgular enterokokların fermente süt ürünlerindeki lezzet gelişimine katkıda bulunabilecek bir metabolik potansiyele sahip mikroorganizmalar olduğunu göstermektedir [Hagrass ve ark., 1991; Verighetto ve ark., 2001; Sarantinopoulus ve ark., 2001].

Enterokoklar, birçok gıdada (meyve, sebze ve süt) doğal olarak bulunan veya bazı gıdaların üretiminde (sosis vb.) katkı olarak kullanılan sitratı da fermente edebilmektedirler [Sarantinopoulus ve ark., 2001b ; Giraffa, 2003]. Enterokokların sitrat metabolizması üzerinde pH'nın ve ortamda bulunan karbonhidrat kaynaklarının etkisi bulunmaktadır. Ortamda karbonhidrat bulunmadığında *E. faecalis* subsp. *liquefaciens*'in sitratı metabolize edebildiği tespit edilmiştir [Foulquie Moreno ve ark., 2006].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Proteoliz Aktivitesi

Peynir teknolojisinde starter ve starter olmayan mikroorganizmaların proteolitik ve peptidolitik aktiviteleriyle ilintili olan kazeinin parçalanması peynir olgunlaşmasında oldukça önemli bir role sahiptir [Gürsoy ve ark., 2006].

Enterokokların kazeini proteoliz edebilme özelliği çoğunlukla suştan suşa farklılık göstermektedir [Arizcun ve ark., 1997; Durlu-Ozkaya ve ark., 2001]. Bazı araştırmacılar farklı tip peynirlerden izole edilen *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans* suşlarının proteolitik aktivilerinin yararlı ve yerinde olduğunu bildirmelerine rağmen, genel olarak enterokokların proteinaz ve peptidaz aktiviteleri zayıftır. *E. faecalis* ise bu açıdan en aktif türdür [Arizcun ve ark., 1997; Tsakalidou ve ark., 1994; Andrighetto ve ark., 2001; Sarantinopoulus ve ark., 2001].

Sarantinopoulos ve ark., (2001), yaptıkları bir çalışmada enterokokların hücre dışı proteolitik aktivitelerini zayıf bulmuş, bu açıdan en etkin türün *E. faecalis* olduğunu bildirmiştir. Yine aynı çalışmada enterokokların peptidaz aktiviteleri de düşük bulunmuş, peptidazların özellikle glisin-prolin ve glutamat-4-nitroanilid spesifik oldukları tespit edilmiştir. Bu çalışmaların aksine Wessels ve ark., (1990), enterokokların proteolitik aktivitelerinin lipolitik aktivitelerinden daha güçlü olduğunu bildirmektedir.

Enterokokların proteolitik özellikleri ile asitleştirme özellikleri arasında net bir ilişki gözlenmese de, bu iki özellik arasında zaman zaman pozitif korelasyon olabilmekte ve proteolitik özelliği güçlü olan suşların asitleştirme özellikleri de yüksek çıkmaktadır [Giraffa, 2003]. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, Laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen proteoliz *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cinsleri ile sınırlandırılmıştır [Somkuti ve Babel, 1969].

Yapılan bir diğer çalışmada Enterokok suşlarının düşük proteolitik ve peptidolitik aktiviteye sahip olduğu, ancak *E. faecalis* suşlarının biraz daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [Sarantinopoulos ve ark., 2001a].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Lipoliz Aktivitesi

Lipoliz direkt olarak peynir reolojisi ile ilgili değildir. Bununla beraber, gliseridler kısmen moleküler organizasyonu etkileyen bileşiklerdir. Bundan dolayı peynir tektürünü etkilemektedirler [Giraffa, 2003].

Yapılan çalışmalarda, proteolitik aktiviteye zıt olarak enterokokların lipolitik aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir [Sarantinopoulos ve ark., 2001]. *E. faecalis* ve kısmen de *E. faecium* ve *E. durans*'ın en lipolitik türler olduğu tespit edilmiştir [Sarantinopoulos ve ark., 2001; Durlu-Ozkaya ve ark., 2001]. Diğer taraftan, süt orijinli enterokokların sütteki düşük ve çoğunlukla suşa bağlı lipolitik aktivitesi diğer bazı çalışmalarda araştırılmıştır.

Enterokokların esterolitik enzim aktiviteleri daha gelişmiş olup, lipolitik enzim sistemlerine göre daha etkilidir. Enterokoklar diğer laktik asit bakterilerinin birçok türünden daha yüksek esterolitik aktivite göstermekte ve *Enterococcus faecium*, enterokok türleri içerisinde en esterolitik tür olarak karşımıza çıkmaktadır [Giraffa, 2003]. El Soda (2002) *Enterococcus faecium*'un yağ asitlerinin 4-nitrofenil ve 2-nitrofenil türevlerine karşı esterolitik aktivite gösterdiğini bildirmektedir.

Lipitler de peynirin aroma ve tekstüründe önemli etkiye sahiptir [Dovat ve ark., 1970]. Enterokokların sütte lipolitik aktivitesinin suşa bağlı olduğu, suşların çoğunun düşük aktivite sergilediği ve *Enterococcus faecalis* türleri arasında yer alan bazı suşların lipolitik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [Carrasco de Mendoza ve ark., 1992].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri

Antimikrobiyal maddeler mikroorganizmalar tarafından üretilen, mikroorganizma gelişimini engelleyen, düşük moleküler ağırlıklı, biyolojik kökenli, ikincil metabolitlerdir. Bunlar, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici “bakteriostatik” veya “fungustatik” özellikte olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne sebep olan “bakterisit” ve “fungisit” özellikte maddeler de olabilirler [Demain, 1999; El-Adaway, 2001].

Enterococcus' lar süt ürünleri gibi belirli gıdaların ve mide-bağırsak sisteminin doğal florası olduklarından, fermantasyon sonucu ürettikleri laktik asit ve hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal maddeler eskiden beri gıdaların raf ömrünü uzatmak amacıyla gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Bu inhibitör etkiye sahip primer metabolitlerin yanı sıra *Enterococcus*' larda bakteriyosin gibi başka antimikrobiyal bileşikler de oluşmaktadır. *Enterococcus* bakterileri antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı ortamda bulunan; gıda kaynaklı kontaminant ve patojen mikroorganizmaların (*E.coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Listeria* gibi) gelişimini engellemekte ve ölümlerine neden olmaktadır [Tannock, 1981].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Laktik Asit Üretimleri

Laktik asit bakterilerinin, karbonhidratların fermantasyonu sonucunda ürettikleri en önemli son ürün laktik asittir. Laktik asit üreten starter kültürler, fermente süt, et ve bitki ürünlerinin üretiminde kullanılmış, fermantasyon sonucu oluşan laktik asit, raf-ömrü, tadı, aroması, kıvamı ve kalitesi bakımından daha iyi ve gelişmiş bir ürünün oluşmasında etkili olmuştur. Bununla birlikte, laktik asit bakterilerinin fermente ettiği gıdalarda laktik asidin yanı sıra çok az miktarda asetik asit ve formik asitte oluşmaktadır ki buda pH' nin düşmesine ve dolayısıyla gıdalardaki kontaminant ve patojen bakterilerin inhibisyonuna neden olmaktadır. Fermente gıdalardaki laktik asidin inhibisyon etkisi, ortamda bulunan patojen bakterilerin türüne, sayısına, sterilizasyon aşamasına ve mevcut olan Laktik asit bakterilerin sayısına göre değişmektedir [Wijaya, 2003].

Yapılan çalışmalarda, Skim milk besiyerinde gelişen *E. faecalis* suşlarının laktozdan laktik asit ve sitrattan asetik asit üretebildikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, koyun ve keçi sütünde geliştirilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının, laktoz ve sitratı bir arada kullandıkları takdirde, oldukça yüksek miktarda laktik asit ve daha az miktarda formik ve asetik asit ürettikleri tespit edilmiştir [Foulquie Moreno ve ark., 2006].

Laktik asit bakterilerinden olan *Enterococcus*' lar fakültatif anaerob ve fermentatif metabolizmaya sahip kemo-organotrof bakterilerdir. Enterokoklar birçok karbonhidratı fermentatif olarak kullanırlar. Homofermantatif yoldan glikozu fermente eden bu bakteriler, son ürün olarak L(+) laktik asit üretmektedirler. *E. faecalis* ve *E. faecium* karbonhidratlardan fermentasyon yoluyla başlıca ürün olarak laktik asit ürettiklerinden, çeşitli peynirlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılabilirler. Örneğin; cheddar peyniri, yumuşak İtalyan peyniri ve bazı İsviçre peynirlerinin yapımında asit, tat ve aroma oluşumu için kullanılmaktadır [Foulquie Moreno ve ark., 2006].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Üretimleri

Enterococcus bakterileri fakültatif anaerob olduklarından elektron-transport zinciri mevcut değildir. Dolayısıyla oksijenli ortamlarda, eksik yapılan reduksiyondan dolayı hidrojen peroksit oluşup, ortama salgılanır. *Enterococcus*' ların oluşturdukları hidrojen peroksit, enzimlerin yapısında bulunan sülfidril grupların oksidasyonu ile bu enzimleri denature ederek ve membran lipidlerinin peroksidasyonu ile membran geçirgenliğini arttırarak;

1. Enzim aktivitelerinin bozulmasına,
2. Enzimlerin kimyasal yapısının, biyokimyasal karakterinin ve aktivitelerinin değişikliğe uğramasına ve böylelikle enzimlerin inaktive olmasına neden olarak, patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki göstermektedir [Hwanhlem ve ark., 2010].

Enterococcus bakterileri tarafından üretilen hidrojen peroksit, patojen ve gıda bozucu bakterilerin üremesini engeller. Bu nedenle bu bakterilerin, daha uzun süreli saklanabilen gıdaların üretiminde etkili olabileceği düşünülmektedir [Campos ve ark., 2006].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Bakteriyosin Üretimleri

Laktik asit bakterileri tarafından ribozomal olarak sentezlenen, küçük katyonik, amfilik ve antimikrobiyal peptidlere bakteriyosin adı verilir [Tagg ve ark., 1976]. *Enterococcus* cinsi bakterilerin ürettiği bakteriosinler enterosin olarak adlandırılmaktadır. Bakteriosin üreten *Enterococcus* cinsi bakteriler doğada yaygın olarak bulunmakta ve yapılan birçok araştırmada süt ürünleri, fermente sucuklar, balık, sebze ve gastrointestinal yoldan oldukça sık izole edilmişlerdir [Sarantinopoulos ve ark., 2001c].

Enterococcus faecium'un ürettiği bakteriosinler *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. ve diğer gram pozitif patojenik bakteriler ile gıda bozulması yapan bakterilere karşı inhibitör etki gösteren antimikrobiyal proteinler olup, bu türe ait bakteriler bakteriosin üretimi ile dikkat çekmektedir [Franz ve ark., 1999; Sarantinopoulos ve ark., 2001c; Marekova ve ark., 2003; Vuyst ve ark., 2002; Ross ve ark., 2002; Giraffa, 2003; Hugas ve ark., 2003; Leroy ve ark., 2003; Saavedra ve ark., 2003].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi

Mikroorganizmaları hücreleri kurumadan fagositozdan ve faj etkisinden koruduğu, yüksek oksijen gerilimi sağladığı, antibiyotiklere ve toksik maddelere (toksik metal iyonları, sülfür dioksit, etanol gibi) karşı hücreleri koruma ve yüzey tutunmasında yapıştırıcı işlevine sahip olduğu bilinen, gıda sanayinde kıvam arttırıcı olarak kullanılan ve çok sayıda bakterinin (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) yüzeyinde bulunan ekzoselüler polimerlere eksopolisakkarit (EPS) denir [Cerning, 1992; Bouzar, 1996; Cerning, 1994; Rua-Madiedo, 2006]. Eksopolisakkarit'lerin tüm bu özelliklerinin yanısıra immün sistemi teşvik ettiği, antitümoral ve kolesterol düşürücü aktiviteye sahip olduğu da gösterilmiştir [Hosono, 1997].

Bazı laktik asit bakterileri polisakkarit polimeri salgırlar. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler, homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olarak iki grupta incelenmektedir. Homopolisakkaritler yüksek molekül ağırlığına sahiptir [Şimşek ve Çon, 2003]. Heteropolisakkaritler, D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz veya nadiren N-asetilglikozamin, N-asetilgalaktozamin, ve glukoronik asit içeren birimlerin tekrarlanması sonucu açığa çıkan yapılardır [Duboc ve Mollet, 2001]. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen polimerlerin çoğu bu özelliği göstermektedir [Broadbent ve ark., 2001].

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen eksopolisakkarit'ler düşük yağ oranlı, kaymaklı ve düşük süt oranlı yoğun yoğurtlar gibi yeni ve değeri artan ürünlerin geliştirilmesi için teknolojik bakımdan öneme sahip polimerlerdir.

Bunun yanı sıra laktik asit bakterileri tarafından üretilen eksopolisakkarit, mikrobiyal hücreyi fagositoza, faja, antibiyotik ve toksik maddelere karşı koruyabilmektedir. Bakteriyal polimer üretimi ve polimerin şeker içeriği fermentasyon koşullarına (inkübasyon süresi ve sıcaklığı) ve besiyerinin bileşimi gibi özelliklerden etkilenmektedir [Ekici ve Barefoot, 2006; Faye ve ark., 2002].

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritlere (EPS) ekonomik açıdan bakıldığında ise; gıdaların üretiminde fonksiyonel işlevlerinin ve yararlı birçok etkilerinin olmasından dolayı önemli avantajlar sağladığından, eksopolisakkarit üretimi yüksek olan bir suşun starter ve probiyotik olarak kullanımının önemli avantajlar sağlayacağı düşünülmektedir [Welman ve Maddox, 2003].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Agregasyon Özellikleri

Probiyotik açıdan önemli diğer bir kriter de bakterilerin agregasyon özelliğine sahip olmasıdır. Agregasyon kelime anlamı olarak; toplanma, bir araya gelme ve kümeleşme olarak tanımlanabilir. Bakteriler bu özellikleri sayesinde bulunduğu hücrelere tutunabilir ve dominant olarak kolonize olabilir [Kocatürk, 1991; Boris, 1997].

Agregasyon aktivitesinden APF (aggregation promoting factor) denilen ve hücre dışına salınan protein yapısındaki bir maddenin sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Agregasyon reseptörleri türden türe farklılık göstermekle birlikte, bu reseptör *L. plantarum* LL 441 suşunda bir protein iken, *Enterococcus faecalis*’te bir glikoproteindir. Hücre agregasyonunun ise lipotekoik asit, proteinler ve karbonhidratlar gibi, hücre yüzey bileşenleri ile ilgili olabileceği düşünülmektedir [Vandevoorde ve ark., 1992].

Agregasyon maddesi feromona-duyarlı plazmidler üzerinde kodludur. Bu maddenin üretimine protein yapısında ve hidrofobik bir bileşik olan seks feromonu sebep olmaktadır [Boris, 1997; Foulquie Moreno ve ark., 2006; Barbosa ve ark., 2010].

Çalışmalara göre fenomenler; laktobasiller ile patojenler geniş bir etkileşim alanı geliştirdikleri ve laktobasiller tarafından üretilen metabolitlerin bu alana dağıldığı (mikroçevrelerin inhibe edilmesi) şeklinde açıklanmaktadır. Ayrıca, bakterilerin hücre yüzeyleri arasındaki bu etkileşim hücre içi metabolitlerin transfer edilmesini sağlayan iki bakteri sitoplazması arasında sürekli bir bölgeyi oluşturabilmektedir [Fernandez, 2003].

Böyle bir mekanizma ile gastrointestinal sisteminde düzenlenebileceği düşünülmüş ve probiyotiklerin mukuzoya tutunarak kogregasyon yetenekleri ile patojenlere bariyer teşkil ettikleri bildirilmiştir [Boris ve ark., 1997; Fernandez, 2003; Foulquie Moreno ve ark., 2006; Barbosa ve ark., 2010].

Laktik asit bakterilerinin agregasyon madde üretimleri mide-bağırsak yolunda yaşama yüzeylerini ve kolonize olmalarını arttırarak, yüzeye ve birbirlerine yapışmasını böylece biyolojik bir bariyer oluşturmalarını sağlamıştır. Bu özellikleri laktik asit bakterilerinin bağırsağın peristaltik hareketlerinden dolayı elimine olmalarını engellenerek, bağırsak ekosisteminde avantajlı olmaları sağlanmaktadır [Nikolic ve ark., 2008]. Agregasyon özelliği tüm bunların yanı sıra genetik materyallerin aktarımını kolaylaştırarak probiyotik bakterilere yeni fenotipik özellikler kazandırabilmekte de rol almaktadır. *Enterococcus faecalis* 'lerde seks feromonu konjugasyon sıklığını artıran bir madde olarak gösterilmektedir [Nikolic ve ark., 2008; Strompfova ve ark., 2004].

Enterococcus cinsi bakterilerin agregasyon ve koagregasyon özellikleri üzerine yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [Rosenberg ve ark., 1980; Brassart ve ark., 1994].

Yapılan bir çalışmada, *Enterococcus* suşlarının sedimantasyon oranları 5 saat içinde tespit edilmiş ve sonuç olarak tüm suşların %17 ile %30 oranları arasında otoagregasyon özelliği gösterdikleri ve orta derecede otoagregasyon özelliğine sahip oldukları belirlenmiştir [Fortina ve ark., 2008].

Yapılan bir başka çalışmada, *Enterococcus* suşlarının bağırsak epitel hücrelerine yapışma oranlarının %5 ile %8 arasında değiştiği tespit edilmiştir [Strompfova ve ark., 2004].

Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon ve koagregasyon yeteneklerinin olması sadece kolonizasyonda yardımcı olmamış, aynı zamanda zarar gören bağırsak epitel hücrelerinin iyileşmesi ve patojen mikroorganizmaların bu hücrelere yapışmalarının engellenmesi sağlanmıştır. Ayrıca, antimikrobiyal aktivite gösteren laktik asit bakterileri bağırsak patojenleriyle koagreg olduklarında bu bakterilere daha yakından etki gösterip inhibe olmalarına neden olmaktadır. Bu da normal mikrofloranın en önemli savunma mekanizmalarından biri olarak belirlenmiştir [Rinkinen ve ark., 2003].

Agregasyon; otoagregasyon ve koagregasyon olmak üzere iki grupta incelenmektedir. *Enterococcus* cinsi bakterilerin potansiyel yapışma yeteneklerinin belirlenmesinde hem otoagregasyon hem de koagregasyon özellikleri incelenmiştir.

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Otoagregasyon Özellikleri

Probiyotik bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine yapışmaları için gerekli olan bir diğer özellik ise otoagregasyon özelliğidir. Aynı türe ait mikroorganizmaların birbirlerine tutunarak oluşturdukları hücre kolonileri otoagregasyon olarak tanımlanmaktadır. Otoagregasyon özelliği birçok mikroorganizma türünde gözlenmekte olup, hücrenin fiziksel ve kimyasal karakterleri bu özelliği ve farklı hücrelere yapışma özelliğini etkileyebilmektedir [Kos ve ark., 2003; Del Re ve ark., 2000].

Patojenlerde gözlenen otoagregasyonun, ultrasonik ses dalgalarına, ısıya ve pepsine duyarlı hücre yüzeyi proteinlerin otoagregasyondan sorumlu olduğu belirlenmiş ve virulans kaynağı olabileceği düşünülmektedir.

Otoagregasyon özelliği iyi olan mikroorganizmaların, sürekli otoagregasyon halinde olduğu bu nedenle aralarında daimi bir gen transferinin olduğunun düşünülmüş ve bu bakterilerin otoagregasyon özelliği düşük olan mikroorganizmalara göre genetik stabilitelerini daha iyi korudukları belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinde görülen otoagregasyon özelliğinin epitele kolonize olmada ve epitel üzerinde biyolojik bir bariyer oluştururarak, bağırsak patojenlerin uzaklaştırılmasında ve burada üremesinin engellenmesinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu yönü ile probiyotik açıdan otoagregasyon mikroorganizmalarda aranan bir özelliktir [Roos, 1999; Tanaka, 2000].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Koagregasyon Özellikleri

Koagregasyon özelliği sağlıklı bir ürogenital floranın elde edilmesi ve korunmasında çok büyük bir öneme sahiptir. Koagregasyon; farklı türe ait iki mikroorganizmanın birbirini ile tutunması olarak tanımlanmaktadır. Koagregasyon özelliği ile probiyotikler, kendi mikrobiyal topluluklarının devamlılığını ve şeklini koryabilir, varlığının istikrarını ve yapısını sürdürebilirler [Mastromarino ve ark., 2002].

Laktik asit bakterileri sahip oldukları koagregasyon özelliği ile bulunduğu ekosisteme giren patojen bakterilere yapışır ve onların doku reseptörlerine girişini engelleyerek etkisiz hale getirmekte, böylece olası bir enfeksiyonu ve bakterinin toksin etkisini engelleyebilmektedir. Bu sayede laktik asit bakterileri bulunduğu hücrede diğer bakterilerle rekabete girer ve bu bakterilerin baskın bir şekilde kolonize olması sağlanır [Rinkinen ve ark., 2003].

Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus* türlerinin üropatojen bakteriler ile koagregasyonu gösterilmiş ve bu fenomenin sağlıklı ürogenital floranın devamlılığı ve tespitinde önemli olduğunu bildirmişlerdir [Reid ve ark., 1988].

Yapılan bir diğerk çalışmada ise bağırsaktan izole edilen *Lactobasillus* türlerinin üropatojenik *E. coli* ATCC 25922 ve bağırsak patojeni *E. coli* ATCC 35401 türlerinin ikisi ile de farklı derecelerde koagregoldukları tespit edilmiştir [Drago ve ark., 1997].

Hajikhani (2011) tarafından yapılan bir çalışmada 8 adet *Enterococcus* suşunun bağırsak patojeni ve gıda kontaminantı olan *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* RSKK 863, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* ATCC 13076 ve *S. typhimurium* MU 80 bakterileri arasındaki % koagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde, en yüksek % koagregasyon *E. durans* RI 43 ile *S. enteritidis* ATCC MU:80 arasında (%52,4) ve en düşük *E. faecium* RI 75 ile *E. coli* O157:H7 arasında (%8,4) bulunmuştur. *E. faecium* RI 75 ve RI 57 suşları dışındaki diğerk *Enterococcus*’ların en yüksek koagregasyon değerleri *S. enteritidis* ile elde edilmiştir.

Sonuç olarak probiyotik bakterilerin sahip oldukları otoagregasyon özellikleri ile bağırsak epitel hücrelerine tutunduğu ve koagregasyon özellikleri ile de patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu önleyen bir bariyer teşkil ettikleri tespit gösterilmiştir [Boris, 1998; Kos, 2003; Reid, 1988].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Asit Dirençliliği

Ağız yolu ile alınan probiyotikler bağırsak bölgesine varmadan önce ilk savunma mekanizması olan mide asiti (pH 1,5-3,0) ile karşılaşmaktadır. Bir mikroorganizmanın probiyotik özelliklerini gösterebilmesi için mide-bağırsak sisteminde ve endüstriyel işlemler sırasında canlı kalması gerekmektedir. Bu nedenle midenin asitli ortamına tolerans gösterip, canlı olarak bağırsağa ulaşmaları gerekmektedir. Bu yüzden probiyotik mikroorganizma seçiminde ilk aranması gereken kriterlerden biri suşların asit dirençliliğidir. Probiyotik olarak kullanılan suşların asit dirençliliklerinin yüksek olması, midenin asidik ortamında canlılıklarını kaybetmeden bağırsak sistemine ulaşp, burada kolonize olabilmeleri için avantaj sağlayacağı düşünülmektedir [Vasiljevic ve ark., 2008].

Her gün mideden pH' sı yaklaşık 2,0 olan 3 litre kadar mide suyu salgılanmaktadır. Bu nedenle, probiyotik mikroorganizmaların kolon' a ulaşp, orada kolonize olması için gerekli olan ilk koşul mide asidinden en az oranda zarar görmesidir [Vernazza ve ark., 2005].

Enterokokların mide-bağırsak sisteminin yerleşik mikroflorası olarak asitli ve safra içeren ortamlara dirençli olmaları beklenen bir özelliktir [Franz ve ark., 2001].

Süt ürünlerinden izole edilen *E. faecium* KH 24 suşunun düşük pH' lara ve safra asitlerine gösterdiği tolerans araştırılmıştır. Sonuçları değerlendirildiğinde *E. faecium* KH 24 düşük pH' ya (pH: 2,0) 120 dak.' den daha fazla dirençlilik gösterdiği, bu ortamdaki canlı hücre sayısı 2-3 log kob/mL düşüş göstererek 7,0 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Bakterinin daha düşük pH' larda (pH:1,0) 120 dak. inkübasyondan sonra tamamen inhibe olduğu belirtilmiştir. pH 3,0' de 120 dak. bekletildikten sonra bakterinin canlı hücre sayısı 7,88 log kob/mL olarak belirlenirken, pH 7,0' de 2 saat inkübasyon sonrası canlılık miktarı 9-10 log kob/mL olarak rapor edilmiştir [Bhardwaj ve ark., 2010].

Probiyotik olarak gıdalarda kullanılan *E. faecium* SF 68 suşunun, pH 3,0 ve pH 2,5' de 60 dak. inkübasyondan sonra sırasıyla %66 ve %40 oranlarında canlılığı bildirilirken, pH 2,5' de 90 dak. bekletilen bakterinin yalnız %5 oranında canlılık gösterdiği rapor edilmiştir [Lewenstein ve ark., 1979].

Başka bir çalışmada, test edilen *Enterococcus* suşlarının canlılık oranları, pH 3,0' de 3 saat inkübasyondan sonra, %76 ile %87 değerleri arasında bulunmuştur [Strompfova ve ark., 2004].

Yapılan bir diğer çalışmada ise, fermente soya ürününden izole edilen *E. faecium* suşlarının canlılıkları düşük pH' lı ortamlarda 3 saat bekletildikten sonra 2-3 log kob/ml azalmasına rağmen dirençlilik gösterdikleri bildirilmiştir [Yoon ve ark., 2008].

Suşıların pH 2,0' de 3 saat inkübasyon bitimindeki canlılık oranları %42 ile %61 değerleri arasında olduğu, pH 1,0' de suşların tamamen inhibe oldukları gösterilmiştir [Yoon ve ark., 2008]. Bu sonuçlar *Enterococcus*' ların diğer laktik asit bakterilerine göre asitli ortamlara daha dayanıklı olduklarını göstermektedir [Minelli ve ark., 2004].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Safra Dirençliliği

Probiyotik seçiminde kullanılan diğer kriterlerden biri ise suşların safra asitlerine direnç özellikleridir [Vasiljevic ve ark., 2008].

Safra organik (safra tuzları, kolesterol, fosfolipitler, bilirubin) ve inorganik (su ve elektrolitler) bileşiklerin sulu bir karışımından oluşur [Champe ve ark., 1997].

Safranin nicelik olarak en önemli bileşenleri fosfatidilkolin (lesitin) ve safra tuzlarıdır. Safra, gerektiği zaman doğrudan safra kanalı yoluyla karaciğerden onikiparmak bağırsağına geçer ya da sindirim için hemen gereksinim yoksa safra kesesinde depolanabilir [Champe ve ark., 1997].

Safra asitleri çok basamaklı bir metabolik yol tarafından karaciğerde sentezlenir ve amfipatik özelliğe sahiptir. Bu nedenle, moleküller polar ve hem nonpolar bir yüze sahip olup, bağırsakta yağları çözücü ajanlar olarak işlev görebilirler. Böylece diyetle alınan lipitlerin, pankreasın sindirim enzimleri tarafından yıkılması için yardımcı olurlar [Champe ve ark., 1997]. Oluşan bileşikler kolik asit ve keno-deoksikolik asit olup, en çok bulunan safra asitleridir. Bu bileşikler “primer” safra asitleri olarak adlandırılırlar. Safra asitleri karaciğerden ayrılmadan önce bir molekül glisin ya da taurin aminoasitleri ile konjuge edilir. Konjugasyon, safra asidinin karboksil grubu ile eklenen bileşiğin amino grubu arasında oluşan amid bağı tarafından sağlanır. Oluşan bu yeni bileşiklere safra tuzları denilmektedir [Champe ve ark., 1997].

Günde 500-700 mL miktarında ince bağırsağa salgılanan safra, bakterilerin büyük oranda lipid ve yağ asidi içeren hücre membranına zarar vererek antimikrobiyal etki göstermektedir [Dunne ve ark., 1999]. Kalın bağırsağa varan safra asitleri mikrobiyal aktivite sonucu tamamen kimyasal değişimlere uğramaktadır [Demain, 1999]. Bu nedenle probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin bağırsaklarda fonksiyon gösterebilmeleri için safraya karşı dirençli olmaları gerekmektedir [Succi ve ark., 2005].

Genellikle, probiyotiklerin seçimindeki safra toleransı çalışmalarında %0,15 ve %0,30 konsantrasyonlarında safranin kullanılması önerilmektedir [Huang ve ark., 2004]. Bu sonuçla birlikte yapılan çalışmalarda, insandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olmasından dolayı safraya dirençli olan suşları belirlemek için özellikle %0,30' lük safra konsantrasyonunun kritik bir değer olduğu tespit edilmiştir [Erkkila ve ark., 2000].

Laktoz intoleransı olan insanlarda, safraya toleranslı bakteri türlerinin seçimi, laktoz sindirimi açısından önemli olduğu bildirilmiştir. Tüm bu nedenlerden dolayı probiyotiklerin bakterilerin seçiminde asit ve safra toleransı temel kriterlerden birini oluşturmaktadır [Zarate ve ark., 2000].

Probiyotik bakteriler safra dirençliliği açısından farklılık göstermekte olup, bunların direnç mekanizmaları tam olarak belirlenmemiştir [Klaenhammer ve ark., 1999].

Yapılan bir çalışmada *E. faecium* suşlarının safra asitlerine ve onikiparmak bağırsağı sıvısına *E. faecalis* 'lere göre daha dirençli oldukları gösterilmiştir [Wijaya, 2003].

Saavedra ve ark. (2003)' nın yaptıkları bir çalışmada, geleneksel peynirlerden izole edilen 122 adet *Enterococcus faecium* suşundan 86' sının (suşların yaklaşık %70' i), %0,3 safra içeren ortama yüksek düzeyde dirençlilik gösterdikleri rapor edilmiş ve *E. faecium* suşlarının diğer probiyotik bakterilere göre mide-bağırsak sisteminin zorlu şartlarına daha dayanıklı oldukları bildirilmiştir.

Bhardwaj ve ark., (2010)'nın yaptıkları çalışmada, *E. faecium* KH 24 suşunun %1,0, %2,0 ve %3,0 safra konsantrasyonlarına tolerans gösterdiği ve hücre sayısında çok fazla düşüşün olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, tüm safra konsantrasyonlarında 1 saat inkübasyondan sonra KH 24 suşunun log sayısında artışın gözlemlendiğini bildirirken, suşun safrayı besin kaynağı olarak kullandığını ileri sürmüşlerdir.

Laktik asit bakterileri kullanılarak yapılan safra dirençliliği çalışmasında, safra içeren ortamlarda daha yavaş üreme ve daha az direnç gösteren *L. jugurti*, *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* spp. ve *L. acidophilus* suşlarına göre *E. faecium*'ların safralı ortamlara daha dirençli oldukları belirlenmiştir [Rossi ve ark., 1999].

Enterococcus italicus suşları ile yapılan bir diğer çalışmada, tüm suşların % 0,3 oranında safra asitlerine karşı düşük oranda tolerans gösterdikleri belirlenmiş olup, bu sonuç diğer çalışmalarda test edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* suşlarının yüksek safra toleransları ile karşılaştırıldığında, *Enterococcus italicus* suşlarının mide-bağırsak sistemindeki zor şartlara duyarlı oldukları tespit edilmiştir [Saavedra ve ark., 2003; Fortina ve ark., 2008].

Enterococcus suşları (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus hirae*) ile yapılan bir başka çalışmada ise; % 1 oranında safra içeren ortamda safra dirençlilikleri incelenmiş, *Enterococcus* suşlarının canlılık oranları % 72 ile % 98 değerleri arasında tespit edilmiştir [Strompfova ve ark., 2004].

Enterococcus Cinsi Bakterilerinin Hidrofobisite Özellikleri

Epitel yüzeye tutunmanın sağlanmasında agregasyon özelliği ile birlikte hidrofobisite özelliğinin de olması gerektiği, ancak agregasyon ile hidrofobisite özelliği arasında doğrudan bir ilişki olmadığı bazı makalelerde bildiriliyor. Adezyon (tutunma) olayında konak hücre yüzeyinin hidrofob oluşu, yüzey yükleri ile bağlantılıdır. Hem bakteri hem de konak hücre yüzeyleri negatif (-) yüke sahip oldukları için bu itici güç özel etkileşimlerle aşılar [Del Re, 2000].

Bakterilerin farklı maddelere tutunmasında öncelikle hücre yüzeyinin fizikokimyasal özellikleri, hücre tutunması ile pozitif ilişkisi olan hidrofobisite, otoagregasyon, hemagglütinasyon gibi kesin karakterlerle belirlenmektedir. *Bifidobacterium bifidum* ve *Bifidobacterium suis* suşları ile yapılan çalışmalarda suşlarının epitele tutunma ve otoagregasyon arasında, bazı laktobasillerde de hidrofobisite ve tutunma arasında korelasyonun olduğu tespit edilmiştir [Del Re, 1998; Zavaglia, 2002].

Yapılan bir başka çalışmada ise Streptokoklar, Laktobasiller ve Bifidobakterilerin hücre tutunması ile hücre-yüzey hidrofobisitesi arasında pozitif bir ilişki belirlenmiştir [Zarate, 2002a].

2.4. *Enterococcus* Cinsi Bakteriler İle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar ve Probiyotik Önemi

2.4.1. *Enterococcus*'ların probiyotik önemi

Enterokoklar insanlarda en fazla bulunan Gram-pozitif kok olup, memelilerin mide-bağırsak yolunun doğal mikroflorasını oluşturmaktadır. Bu nedenle de ilk tanımlanan bakteriler arasında yer almakta ve laktik asit bakterilerinin büyük bir grubunu oluşturmaktadırlar [Fisher ve ark., 2009; Valenzuela ve ark., 2010].

Enterococcus cinsi içinde 32 tür bulunmaktadır. Bunlardan *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* probiyotik açıdan en önemli iki tür olup, insanlarda gastrointestinal sisteminin doğal florasında bulunmaktadırlar. Bulunma oranları bireyler arasında (sindirim içeriğinin her gramında 10^2 - 10^8) ve mide-bağırsak sistemi boyunca farklılık göstermektedir [Ogier ve ark., 2008]. Enterokoklar fekal kaynaklı ve kötü çevre koşullarına karşı dayanıklı olduklarından dolayı genellikle gıda, bitki, su ve topraktan izole edilmektedirler [Giraffa, 2002].

Endüstriyel potansiyeli açısından *Enterococcus* suşları önem taşımaktadır. Ancak diğer laktik asit bakterilerine zıt olarak enterokoklar genellikle güvenli kabul edilen statüsünde değillerdir [Godfree ve ark., 1997; Leroy ve ark., 2003].

Enterococcus suşları insanlarda ve hayvanlarda bağırsak florasında mikrobiyal dengeyi sağlamak için probiyotik olarak kullanılmakta olup, *Enterococcus* suşlarını içeren bazı eczacılık ürünleri, insanların klinik tedavisinde probiyotik kültür olarak kullanılmaktadır [Franz ve ark., 1999; Klein, 2003]. Bu probiyotik preperatlar gastroenteritisin tedavisinde gastrointestinal dengeyi geliştirmek ve hayvanlarda enterik hastalıkları önlemek amacıyla kullanılmaktadır [Franz ve ark., 1999; Hugas ve ark., 2003].

Enterococcus cinsi içinde probiyotik özellik gösteren iki tür olmasına rağmen Enterokoklardan probiyotik amaçlı olarak genellikle *Enterococcus faecium* suşları gıda uygulamalarında kullanılmaktadır. Bu bakteri çok hızlı çoğalan (her 18 dakikada bir bölünür), silli bir organizmadır ki implantasyon ve kolonizasyonda çok başarılıdır. *E. faecium* hızlı ürediği ve bölünebildiği için probiyotik kültürlerde, patojenlerin üremesi ve toksin oluşturmalarını hızlı bir şekilde engelleyebilmektedir. *Enterococcus faecium* suşlarının yüksek seviyede bakteriosin üretmesi ve insanlarda Enterokoklarla ilgili olan enfeksiyonların % 80'inin de *Enterococcus faecalis* suşlarının tanımlanması da bu suşun probiyotik olarak kullanımını öne çıkarmaktadır [Centeno ve ark., 1996; Nunez ve ark., 1997; Gardiner ve ark., 1999; Sarantinopoulos ve ark., 2002].

Laktik asit üreten bir bakteri olarak, *Enterococcus faecium* bağırsak rahatsızlıklarında hem profilaksi ve hem de tedavi amaçlı yardımcı olmaktadır ve dünyada yıllarca çiftlik hayvanlarında kullanılmıştır. Birçok farklı patojen bakteriler kısmen veya tamamen *Enterococcus faecium* ile inhibe edilmiştir. Bu nedenle bu bakterilerin probiyotik olarak kullanımı, insanlarda diyarenin tedavisinde antibiyotik uygulamalarına bir alternatif olarak düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda tüm bu özelliklerinin yanı sıra *Enterococcus faecium* suşunun insanlarda kolesterolün sindirim sisteminden kana absorpsiyonunun azaltılması şeklinde bir probiyotik etkisinin daha olduğu tespit edilmiştir [Saavedra ve ark., 2003].

Enterokokların yüksek enzimatik aktivite göstermeleri, düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklı olmaları nedeniyle süt ürünleri teknolojisinde ek starter veya starter olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir [Giraffa ve ark., 1997]. Ancak starter kültür olarak kullanılacak Enterokok türlerinin belirlenmesinde, suşun apatojen olmasının yanısıra, antibiyotiklere dirençliliğinin de olmaması gerekliliği vurgulanmaktadır [Klare ve ark., 2003]. Bu kapsamda Cheddar, Manchego, Feta gibi çeşitli peynirlerin üretiminde var olan starter kültürlerin yanında apatojen Enterokok suşlarının da kullanılmasına yönelik çalışmalar mevcut olup, Enterokok'ların geleneksel peynirlerin olgunlaşma ve aroma gelişiminde önemli rol oynadığı, bu nedenle peynirlere ilave edildiğinde gerek duyusal gerekse olgunlaşma süresi bakımından olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir [Gürsoy ve Kınık, 2006].

Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* ve *Enterococcus faecium* bakterilerinin çeşitli suşlarının destek kültür olarak Cheddar peynirinde kullanımında olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu mikroorganizmaların ilavesi ile proteoliz ve lipolizi arttırarak aroma gelişimini hızlandırmıştır [Gardiner ve ark., 1999]. Peynir starter kültürleri ile birlikte *Enterococcus faecium* suşlarının antibakteriyel maddeler (enterosin) oluşturmaları, ürünün hijyenik kalitesi için de bir avantaj olarak görülmektedir [Moreno ve ark., 2002].

Enterococcus cinsi bakterilerin en önemli habitatı insanların ve hayvanların mide ve bağırsağıdır. Ancak bu bakteriler bağırsak dışındaki ortamlarda da canlılıklarını sürdürebilirler. Daha az miktarlarda ağız-boğaz salgılarında ve deri yüzeyinde bulunurlar. Bağırsak florasında sahip olduğu yararlı etkiler göz önünde bulundurularak, çiftçiler tarafından hayvanların sağlık statusünü iyileştirmek (örneğin, daha az ishal) ve sonuçta hayvan performansında (örneğin, büyüme oranında) değerli iyileşme elde etmek için hayvanların yemlerinde probiyotik olarak kullanılmakta olmakla birlikte birçok gıda üretim sürecinde bulunup, gıda mikroflorasının önemli bir kısmını oluştururlar [Doming ve ark., 2003].

Enterococcus cinsi bakterilerin süt ve et ürünlerinin doğal floralara elemanları olmalarının yanı sıra, fermente ürünlerin olgunlaştırılması sırasında istenen teknolojik ve metabolik özelliklerine (lipolitik ve esterolitik aktivite, sitrattan yararlanma ve uçucu aromatik bileşikleri sentezleme gibi) zelliklere sahip olmaları nedeniyle, yöresel peynirlerin üretiminde, olgunlaştırılması sırasında peynir aromasının geliştirilmesi ve peynir kalitesinin arttırılmasında önemli rol oynarlar [Franz ve ark., 1999; Sarantinopoulos ve ark., 2001b; Vancanneyt ve ark., 2002; Vuyst ve ark., 2002; Franz ve ark., 2003; Giraffa, 2003; Hugas ve ark., 2003 ; Klein, 2003; Saavedra ve ark., 2003].

Probiyotiklerin olumlu sağlık etkilerini oluşturabilmeleri için canlıda belirli seviyelerde bulunmalıdır. Bu nedenle probiyotiklerin etkili olabileceği tüketim seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu konuda çeşitli araştırıcılar tarafından 106, 107 ve 108 cfu/g değerleri önerilmektedir. Genel olarak gıda endüstrisindeki *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobakteriler ve diğer probiyotik mikroorganizmaların uygulamaları için 106 cfu/g seviyesi önerilmektedir. Yine probiyotiklerin fonksiyonallitesi için ince bağırsakta günlük olarak en az 108-109 canlı bakteri bulunması gerektiği düşünülmektedir [Ishibashi ve Shimamura, 1993; Gobbetti ve ark., 1998; Stanton ve ark., 1998; Fonden ve ark., 2000; Godward ve ark., 2000]. Ancak yapılan bir model çalışmada, gastrointestinal sistemde toplam probiyotik bakteriden %10-40'nin canlılığını srdrdğu dikkate alınırsa toplam tüketim dozu, gastrointestinal sistemdeki canlılık seviyesi, dışkıdaki canlı probiyotik sayısı gibi faktörlerin çok yönlü olarak ayrı ayrı incelenmesi gerekmektedir [Sveers ve Veld, 1999].

2.4.2 Probiyotik kültür olarak *Enterococcus* suşlarının güvenilirliği

Probiyotik bakteriler birçok peynir çeşidinin üretiminde başarıyla kullanılmaktadırlar. Ancak peynirlere probiyotik bakterilerin ilavesindeki bu başarı; probiyotik olarak kullanılan tür ve suş, üretimde kullanılan laktik asit bakterilerinin aktivitesi, peynir kompozisyonu, üretim ve olgunlaşma koşulları gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir.

Laktik Asit Bakterileri Endüstriyel Platformu Uluslararası Toplantısı'nda gıda katkısı olarak sadece probiyotik özellikleri gösterilmiş olan bakteri suşlarının kullanımları önerilmiştir [Guarner ve Schaafsma, 1998; Gardiner ve ark., 1999a].

FAO/WHO, (2001) tarafından insan tüketiminde kullanılacak probiyotik mikroorganizmaların sağlığa yararlı etkilerinin gösterilmesi ve bunların GRAS (genel olarak güvenli bilinen) statüsünde kabul edilmesi gerektiği bildirilmektedir. Ancak Enterokoklar hala birçok kaynak tarafından GRAS statüsünde kabul edilmemektedir [Biorollo ve ark., 2001; Giraffa, 2002; Ross ve ark., 2002]. Bu nedenle bazı bilim insanları *Enterococcus* türlerinin gıda üretiminde kullanılmaları konusuna sıcak bakmamakta olup, günümüzde *Enterococcus* türlerinin gıda üretiminde starter kültür veya probiyotik olarak potansiyel uygulamaları sorgulanmaktadır [Klein, 2003; Giraffa 2003].

Avrupa Birliği Çerçeve Programı kapsamında yürütülen “Gıda Fermantasyonlarında Enterokoklar: Fonksiyonalite ve Güvenlik Hususları” konulu bir araştırmada (FAIR-CT97-3078) yaklaşık 400 Enterokok'tan oluşan bir koleksiyon oluşturulmuş ve biyokimyasal karakterizasyon işlemi yapılarak suş seviyesinde tanımlama gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmada gıda, insan ve hayvan kaynaklı izolatların çoğunlukla *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* türlerini içerdiği görülmüştür. Araştırmacılar ilgili çalışmanın başlıca sonucunun güvenlik ve fonksiyonalite ile ilgili özelliklerin suşa spesifik olduğu ve bu açıdan Enterokoklarla hazırlanacak probiyotik preparasyonlarda kullanılacak suş bazında dikkatli bir seçim yapılması gerektiğini bildirmişlerdir [Vancanneyt ve ark., 2002].

Antibiyotiğe dirençli bazı suşlarının gıdalardan izole edilmesi, antibiyotik direncinin gıda zincirine girebileceği endişesini doğurmaktadır [Giraffa ve ark., 2000; Giraffa 2003]. Antibiyotiğe dirençli suşların, gıda yoluyla insan bağırsak florasında bulunan diğer bakterilerin antibiyotik direnci kazanmasına yol açabileceği düşünülmektedir [Franz ve ark., 2003; Klein, 2003]. Genellikle gıda kaynaklı VRE (vankomisin dirençli *Enterococcus*)'ler, medikal kaynaklı vankomisin dirençli Enterokok (VRE) izolatlarından daha düşük oranda virulans faktör taşırlar [Klein, 2003].

Gıda kaynaklı *Enterococcus*'ların henüz direkt klinik enfeksiyonlara yol açtığı gözlenmemiştir [Giraffa, 2003]. Ayrıca şimdiye kadar herhangi bir probiyotik kaynaklı enterococcal enfeksiyon rapora rastlanmamıştır [Rinkinen ve ark., 2002]. Ancak yine de *Enterococcus*'ların gıdalarda güvenli olarak kullanılıp kullanılmayacağına yanıt vermek zordur. Kesin yanıt verebilmek için de klinik ve epidemiyolojik verilere ihtiyaç duyulmaktadır [Giraffa, 2003].

Enterococcus türlerinin ticari kullanımlarında güvenlik kriterlerinin oluşturulması, probiyotik ve starter kültür olarak kullanılan veya kullanılması düşünülen *Enterococcus* cinsine ait suşlarının antibiyotik dirençliliği, direnç transfer özellikleri ve virulans faktörleri gibi gıda güvenliği açısından araştırılması gerekmektedir [Vuyst ve ark., 2002 ; Franz ve ark., 2003; Klein, 2003; Hugas ve ark., 2003].

Son on yıl boyunca VRE'lerin sayısı artmıştır. Bu nedenle gıda endüstrisinde kullanılacak *Enterococcus* türlerinin seçiminde, türlerin patojenik özellikler ve antibiyotik direnç genleri taşımamasına dikkat edilmelidir. Günümüzde modern analiz tekniklerinin gelişmiş olması bu türlerin ve özelliklerinin belirlenmesinde, *Enterococcus*'ların bazı gıdalarda kullanımının kabulünde yardımcı olacağı düşünülmektedir [Foulquie Moreno ve ark., 2006].

Enterokokların insan bağırsak florasında doğal olarak bulunmaları ve olumsuz çevre koşullarına karşı oldukça dirençli olmaları onların probiyotik ürünlerin üretiminde kullanımlarını destekleyici unsurlardır. Bununla birlikte antibakteriyel proteinler (bakteriosinler) üreten Enterokok suşları peynirinde içinde bulunduğu birçok gıda grubuna ilave edildiğinde bu gıdalarda *Listeria monocytogenes* gibi gıda patojenlerinin gelişimini etkili bir şekilde engelleyebildiği tespit edilmiştir. Bu nedenle Enterokok suşları birçok gıdada, gıda güvenliğinin geliştirilmesi için kullanılması düşünülen mikrobiyal katkılardandır [Foulquie Moreno ve ark., 2006].

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyaller

Bu çalışmada *Enterococcus faecalis* NCDO 581 ve *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 standart suşları ile Türkiye ve İran' ın farklı bölgelerinde üretilen beyaz peynirlerden Hajikhani (2011) tarafından izole edilen ve tanımlanan, EPS üretimi yüksek olarak belirlenen *E. faecium* RI 41, *E. faecium* RI 56, *E. faecalis* RT 122 suşları ve EPS üretimi düşük olarak belirlenen *E. faecalis* RI 6, *E. faecalis* RI 21, *E. faecium* RT 81 suşları olmak üzere toplam 8 adet *Enterococcus* suşu kullanılmıştır [Hajikhani, 2011]. Bu çalışmada kullanılan tüm suşlar Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.1. Araştırmada kullanılan besiyerleri

Araştırmada kullanılan *Enterococcus* suşlarının aktifleştirilmesinde ve bazı deneylerin gerçekleştirilmesinde Man Rogosa ve Sharp (MRS) sıvı besiyeri kullanılmıştır [Man ve ark., 1960; Anonymous, 2005]. Bu besiyerinin içeriği Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. MRS besiyerinin içeriği

Maddeler	g/L
Pepton	10,0
Beef Ekstrakt	10,0
Yeast Ekstrakt	5,0
Dekstroz	20,0
K ₂ HPO ₄	2,0
Na-Asetat. 3H ₂ O	5,0
Tri Amonyum Sitrat	2,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0,05
Tween 80	1,08 mL

Maddeler 1 litre distile su ile tamamlanmıştır. Deneyin amacına göre katı besiyerinin hazırlanmasında besiyerine % 1,5 oranında agar ilave edilmiştir. Besiyerinin pH'sını $6,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlamak amacı ile 0,01 M HCl ve 0,01 M NaOH kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir [Man ve ark., 1960; Anonymous, 2005].

Enterococcus suşları ile yapılan bazı deneyler için Nutrient Broth besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerinin içeriği Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Nutrient sıvı besiyeri içeriği

Maddeler	g/L
Lab-Lemco Powder	1,0
Yeast ekstrakt	2,0
Pepton	5,0
Sodyum klorür	5,0

Maddeler 1 litre distile su ile tamamlanmıştır. Besiyerinin pH' sını $6,8 \pm 0,2$ ' ye ayarlamak amacı ile 0,01M HCl ve 0,01M NaOH kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C' de 15 dak. otoklavda sterilize edilmiştir [Halkman ve Anonymous, 2005].

3.1.2. Bakterilerin muhafazası

1,5 mL'lik ağzı kapaklı tüplere yaklaşık 400 µL gliserol aktararak, 121 °C' de 15 dk sterilize edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiyerinde iki kez ard arda aktifleştirilmiş, aktif kültürlerden 600 µL örnek alınarak gliserol içeren steril tüplere paralelli olarak aktarılmıştır. Kültürlerin bir kısmı derin dondurucuda -80 °C' de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar yaklaşık iki ayda bir aktifleştirilerek yenilenmiştir [Sağlam, 2000].

3.1.3. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve geliştirilme ortamları

Enterococcus suşlarının aktifleştirilmesinde MRS sıvı besiyeri, patojen bakterilerin aktifleştirilmesinde ise Nutrient Broth besiyeri kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar yürütülürken çalışmada kullanılan tüm bakteriler iki kez ard arda 37 ± 1 °C’de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir.

3.2. Metotlar

3.2.1. *Enterococcus* bakterilerinin otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Enterococcus suşlarının otoagregasyon değerlerinin belirlenmesi, modifikasyon yapılarak Kos ve ark. (2003)’ nın metoduna göre yapılmıştır.

1. *Enterococcus* suşları öncelikle MRS sıvı besiyerinde iki kez ard arda 37 ± 1 °C’ de ve 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiş, aktif kültürler 10000 rpm’ de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
2. Santrifüj sonucunda elde edilen bakteri pelletleri, iki kez fosfat tamponu (PBS, pH 6,2) ile yıkandıktan sonra, aynı tampon içinde tekrar çözündürülmüş ve bir çözelti elde edilmiştir.
3. Elde edilen bu çözeltilerin OD’ si (optikal yoğunluğu) spektrofotometre kullanılarak 600 nm $\approx 0,600$ ’ ye ayarlanmıştır.
4. Yoğunluğu ayarlanan bakteri suşlarından 2’ şer mL alınarak steril cam tüplere ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir.
5. İnkübasyon sonrası çözeltinin üsteki fazından 0,1 mL alınarak, 600 nm spektrofotometrede OD’ si okunmuş ve aşağıdaki formül kullanılarak otoagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Otoagregasyon} = \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{\text{OD}_1} \times 100$$

OD₁: İlk optikal dansite

OD₂: 4 saat sonraki optikal dansite

Çizelge 3.3. PBS (Phosphate Buffered Saline) tamponu içeriği

Maddeler	g/L
NaCl	8
K ₂ HPO ₄	1,21
KH ₂ PO ₄	0,34

Maddeler 1 litre distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan tamponun pH' sı 0,01M HCl ve 0,01M NaOH kullanılarak 6,2±0,2' ye ayarlandıktan sonra 121°C' de 15 dak. otoklavda sterilize edilmiştir.

3.2.2. *Enterococcus* bakterilerinin koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Enterococcus suşları ile *E. coli* ATCC 35218, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* RSKK 863, *S. enteritidis* ATCC 13076 ve *S. typhimurium* MU 80 suşlarının koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi, Rinkinen ve ark. (2003)' nın metoduna göre yapılmıştır.

1. *Enterococcus* bakterileri MRS sıvı besiortamında aktifleştirilirken, test bakterileri ise Nutrient Broth sıvı besiortamında ve 37 °C' de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiş, aktif kültürler 10000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
2. Santrifüj sonucunda elde edilen bakteri pelletleri, iki defa fosfat tamponu (PBS, pH 6,2) ile yıkandıktan sonra aynı tampon içinde tekrar çözündürülmüş ve bir çözelti elde edilmiştir.

3. Elde edilen bu çözeltilerin OD' si (optikal yoğunluğu) spektrofotometre kullanılarak 600 nm ≈0,600' ye ayarlanmıştır.
4. Yoğunluğu ayarlanan bakteri suşlarından öncelikle *Enterococcus* kültürü örneklerinden 2'şer mL alınarak steril cam tüplere konulmuştur. Bu bakteri kültürlerinin üzerine ise yine yoğunluğu ayarlanan test bakterileri örneklerinden 2'şer mL alınarak, ilave edilmiştir. Elde edilen bakteri karışımları 10-15 sn vorteks' le karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir.
5. İnkübasyon sonrası bakteri karışımlarının üst kısmından 0,1 mL alınarak, OD değerleri 600 nm dalga boyunda olan spektrofotometrede okunmuş ve aşağıdaki formül kullanılarak koagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Koagregasyon} = \frac{(\text{OD}_1 + \text{OD}_2) - 2(\text{OD}_3)}{(\text{OD}_1 + \text{OD}_2)} \times 100$$

OD₁: *Enterococcus* kültürlerinin optikal dansitesi

OD₂: Test bakterilerin optikal dansitesi

OD₃: Karışımın 4 saat sonundaki optikal dansitesi

3.2.3. *Enterococcus* bakterilerinin asit toleranslarının belirlenmesi

Enterococcus suşlarının asit toleransları Chung ve ark. (1999)' nın metoduna göre belirlenmiştir.

1. *Enterococcus* bakterileri MRS sıvı besi ortamında, 37±1 °C' de 24 saat inkübe edilerek iki kez ard arda aktifleştirilmiş, aktif kültürlerin optikal yoğunlukları 600 nm' de spektrofotometrede 0,6 ±0,2' ye ayarlanmıştır.

2. Elde edilen kültürlerin asit toleranslarını belirleyebilmek amacı ile farklı pH değerlerine sahip MRS sıvı besiyerleri oluşturulmuştur. Besiyerlerinin pH ayarlanması 0,01M HCL ile yapılmıştır.
3. Optikal yoğunlukları ayarlanan *Enterococcus* kültürlerinden % 2 oranında, pH' sı 0,01M HCl ile 2, 3, 4, 5, 5,5 ve 6,2' ye ayarlanan MRS sıvı besiyerine inoküle edilerek, 37±1°C' de 24 saat inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon bitiminde hücre yoğunluğu 600 nm' de spektrofotometrede ölçülmüştür.
5. Elde edilen OD değerleri kontrol grubu (pH' sı 6,2 olan MRS sıvı besiyerinde gelişen kültürün yoğunluğu) ile karşılaştırılarak, farklı pH değerlerinin *Enterococcus* bakterileri üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{\text{OD}_1} \times 100$$

OD₁: Kontrol besiyer ortamında (pH 6,2) hücre yoğunluğu

OD₂: Bakterilerin farklı pH ortamlarında hücre yoğunlukları

3.2.4. *Enterococcus* bakterilerinin safra toleranslarının belirlenmesi

Enterococcus suşlarının safra tuzu toleransları Chung ve ark. (1999)' nın metoduna göre belirlenmiştir.

1. *Enterococcus* bakterileri MRS sıvı besiyer ortamında 37±1°C' de 24 saat inkübe edilerek iki kez ard arda aktifleştirilmiş, aktif kültürlerin optikal yoğunlukları 600 nm' de spektrofotometrede 0,6±0,2' ye ayarlanmıştır.

2. Kùltürlerin safra toleranslarının belirlenmesi amacıyla farklı safra konsantrasyonlardaki besiortamları, standardize edilmiş safra asitlerinin karışımı olan Oxfall (Sigma) kullanılarak elde edilmiştir.
3. Optikall yoğunlukları ayarlanan *Enterococcus* kùltürlerinden % 2 oranında, % 0,0, % 0,06, % 0,15 ve % 0,30 oranında safra içeren MRS sıvı besiortamına inoküle edilmiş ve 37±1°C’ de 24 saat inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon bitiminde bakterilerin hücre yoğunlukları 600 nm’ de spektrofotometrede ölçülmüştür.
5. Elde edilen OD değeri kontrol grubu (%0,0 safra içeren MRS sıvı besiyerinde gelişen kùltürün yoğunluğu) ile karşılaştırılarak farklı safra konsantrasyonlarının *Enterococcus* bakterileri üzerindeki yüzde inhibisyon değeri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{\text{OD}_1} \times 100$$

OD₁: Kontrol besiortamında (%0,0 safra) hücre yoğunluğu

OD₂: Farklı safra konsantrasyonlarında bakterilerin hücre yoğunlukları

3.2.5. *Enterococcus* bakterilerinin farklı hidrokarbonlara tutunmasının belirlenmesi

Enterococcus suşlarının hidrokarbonlara mikrobiyal tutunması Zárte ve ark. (2002)’na göre belirlenmiştir.

1. *Enterococcus* bakterileri MRS sıvı besiortamında 37±1°C’ de 24 saat inkübe edilerek iki kez ard arda aktifleştirilmiş, aktif kùltürler 10000 rpm’de 15 dk santrüfj edilmiştir.

2. Elde edilen bakteri peletleri, iki kez fosfat tamponu (pH 7,2) ile yıkanmış, 0,1 M KNO₃ (pH 6,2) tamponu içinde tekrar çözülerek spektrofotometrede OD'si 600 nm de 0,6±0,02'ye ayarlanmıştır (OD₁).
3. OD değerleri ayarlanan *Enterococcus* bakteri süspansiyonundan 2 mL örnek alınarak, 0,5 mL p-ksilen (polar olmayan nötral çözücü), kloroform (monopolar asidik çözücü), etil asetat (monopolar bazik çözücü) ve toluen hidrokarbonlarının üzerine konulmuş, oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk.'lık ön inkübasyondan sonra ayrılan iki faz 2 dk. vorteks ile karıştırılıp, tekrar oda sıcaklığında 4 saat inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon sonrası sulu fazın OD'si 600 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür (OD₂).
5. *Enterococcus* suşlarının hidrokarbonlara mikrobiyal tutunma yüzdesi aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hidrofobisite} = \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{\text{OD}_1} \times 100$$

3.2.6. İstatistiksel analiz

Tüm çalışmalarda üç farklı paralelin ortalaması verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) programı kullanılmıştır. Pearson korelasyonuna göre; *Enterococcus* suşlarının farklı pH (2, 3, 4, 5, 5,5 ve 6,2) derecelerinde gelişmeleri, farklı safra tuzu konsantrasyonlarında (% 0,06, % 0,15, % 0,30) gelişmeleri, hidrofobisite özellikleri, otoagregasyon ve koagregasyon özellikleri ile EPS üretimleri arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. *Enterococcus* Bakterilerinin EPS Üretimleri

Çalışmada kullanılan *Enterococcus* suşlarının EPS üretim miktarları MRS ve Skim Milk besiortamlarında Hajikhani (2011) tarafından belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde suşların genel olarak Skim Milk besiortamında daha fazla EPS ürettikleri ve *E. faecium* suşlarının *E. faecalis* suşlarına kıyasla daha yüksek EPS üretim yeteneğine sahip oldukları belirtilmiştir (Çizelge 4.1. ve 4.2.).

Enterococcus bakterileri ile Hajikhani (2011) tarafından yapılan doktora çalışmasının sonucunda EPS üretimi yüksek ve düşük olarak belirlenen 6 adet *Enterococcus* suşu bu çalışmada kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. *Enterococcus faecium* suşlarının MRS ve Skim Milk besiortamlarında EPS üretimleri (mg/L) [Hajikhani, 2011].

Bakteriler	MRS Besiortamı		Skim Milk Besiortamı	
	pH	EPS (mg/L)	pH	EPS (mg/L)
1 <i>E. faecium</i> RT 81	4,69	129±1,0	4,63	176±1,2
2 <i>E. faecium</i> RI 41	4,83	185±0,0	4,58	292±1,5
3 <i>E. faecium</i> RI 56	4,64	156±0,6	4,85	351±2,1
Ortalama Değer ($\bar{x}$)	4,70	146,71	4,66	240,57
4 <i>E. faecium</i> DSMZ 20447*	4,72	175±1,0	4,67	251±2,0

*; Standart kültür

Çizelge 4.2. *Enterococcus faecalis* suşlarının MRS ve Skim Milk besiortamlarında EPS üretimleri (mg/L) [Hajikhani, 2011].

Bakteriler	MRS Besiortamı		Skim Milk Besiortamı	
	pH	EPS (mg/L)	pH	EPS (mg/L)
5 <i>E. faecalis</i> RT 122	4,67	130±2,0	4,66	230±1,6
6 <i>E. faecalis</i> RI 6	4,76	86±1,0	4,74	204±1,8
7 <i>E. faecalis</i> RI 21	4,77	49±0,5	4,72	180±1,6
Ortalama Değer ($\bar{x}$)	4,73	109,92	4,79	208,92
8 <i>E. faecalis</i> NCDO 581*	4,68	66±1,0	4,54	220±0,8

*; Standart kültür

4.2. *Enterococcus* Bakterilerinin Otoagregasyon Özellikleri

Enterococcus suşlarının otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı şekilde yapılmış ve elde edilen otoagregasyon değerleri Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.' de gösterilmiştir.

Enterococcus suşlarının otoagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde, *Enterococcus faecalis* RT 122 suşunun en yüksek (%57,5) otoagregasyon özelliği gösterdiği, *Enterococcus faecalis* RI 6 suşunun ise en düşük (%25,40) otoagregasyon özelliği gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3., Çizelge 4.4. ve Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4.).

Çizelge 4.3. *Enterococcus faecalis* suşlarının % otoagregasyon değerleri

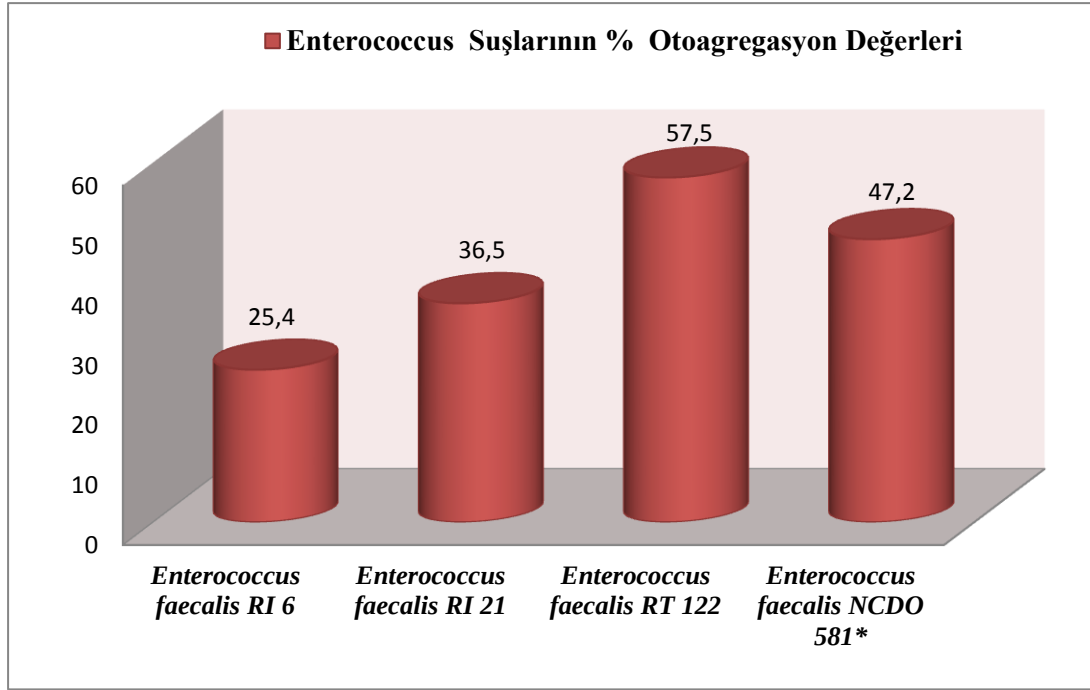
No.	<i>Enterococcus faecalis</i> Suşları	Otoagregasyon değerleri (%)
1.	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	25,40±0,14
2.	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	36,50±0,28
3.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	57,50±0,14
4.	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581*	47,20±0,14

*; Standart kültür

Çizelge 4.4. *Enterococcus faecium* suşlarının % otoagregasyon değerleri

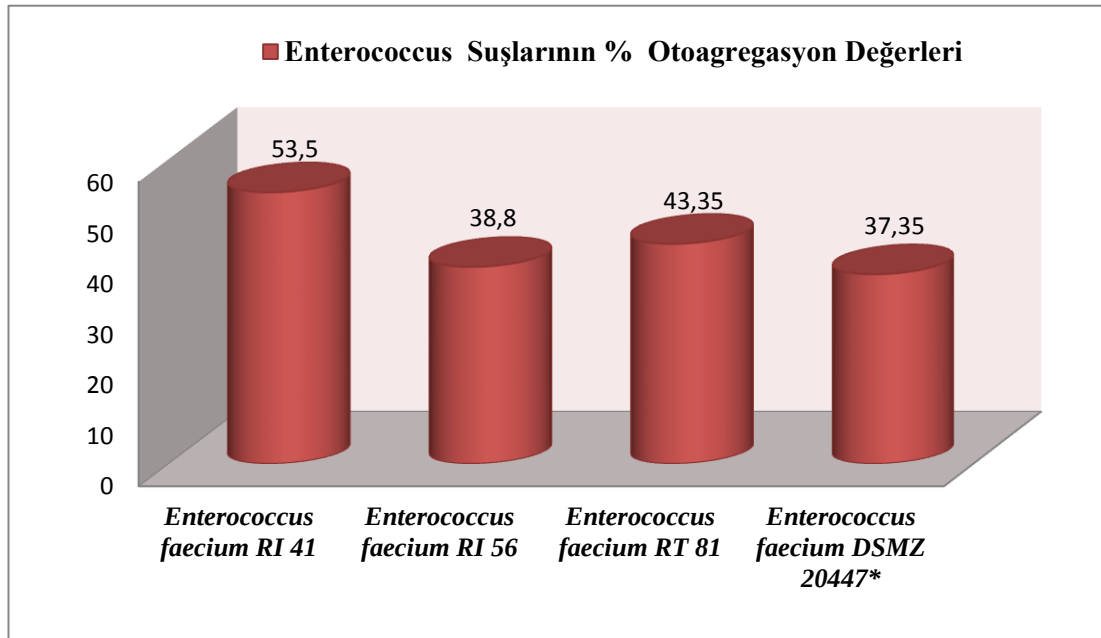
No.	<i>Enterococcus faecium</i> Suşları	Otoagregasyon değerleri (%)
1.	<i>Enterococcus faecium</i> RI 41	53,50±0,14
2.	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	38,80±0,14
3.	<i>Enterococcus faecium</i> RT 81	43,35±0,21
4.	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ*	37,35±0,21

*; Standart kültür



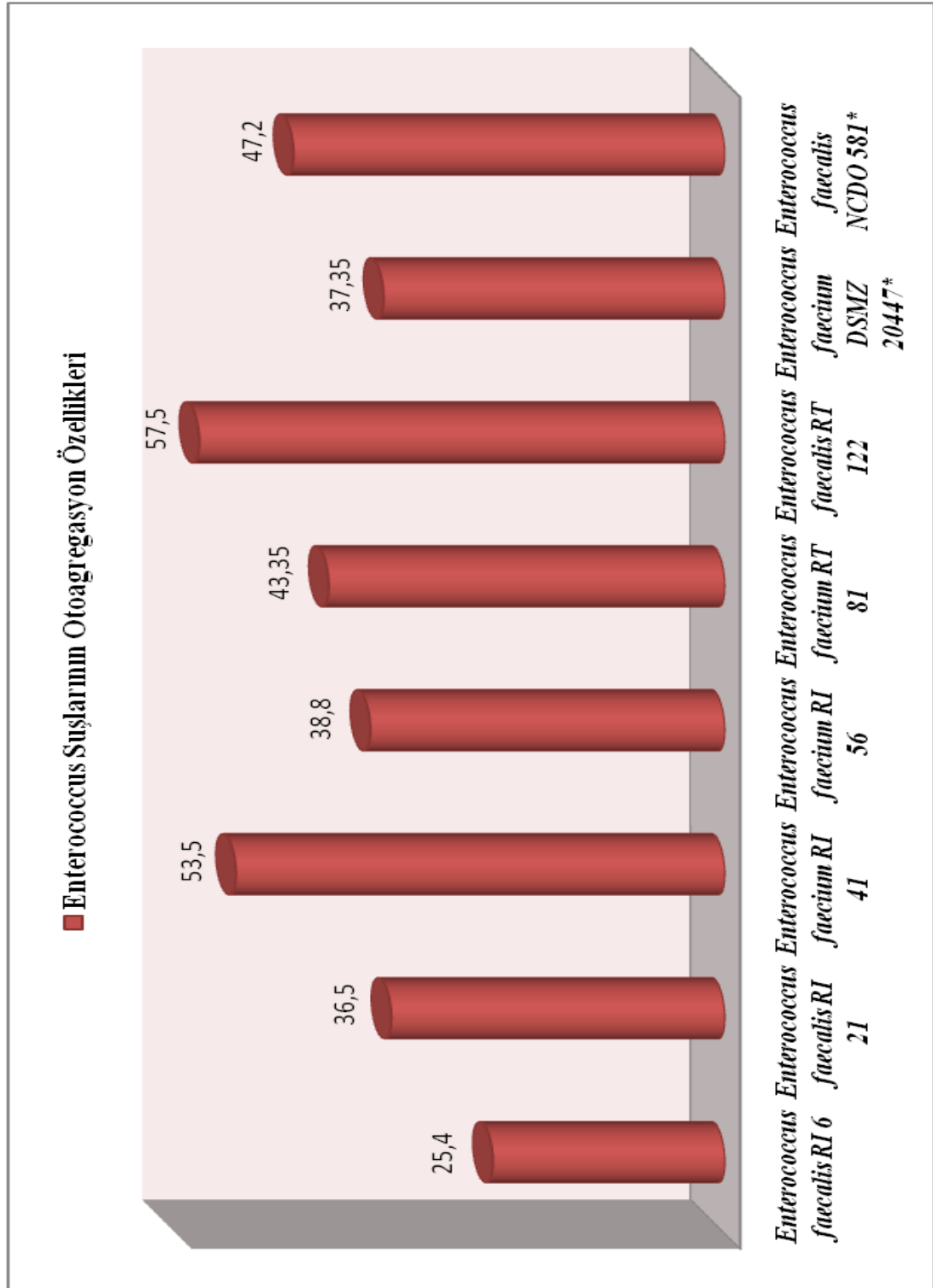
*; Standart kültür

Şekil 4.2. *Enterococcus faecalis* suşlarının % otoagregasyon değerleri



*; Standart kültür

Şekil 4.3. *Enterococcus faecium* suşlarının % otoagregasyon değerleri



*; Standart kültür

Şekil 4.4. *Enterococcus* suşlarının % otoagregasyon değerleri

4.3. *Enterococcus* Bakterilerinin Test Bakterileri İle Koagregasyon Özellikleri

Enterococcus suşları ile bağırsak patojeni ve gıda kontaminantı olan *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ve *Salmonella typhimurium* MU 80 bakterileri arasındaki koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi Bölüm 3.2.2.' de anlatıldığı şekilde yapılmış ve elde edilen % koagregasyon değerleri Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir.

Enterococcus suşlarının % koagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde, en yüksek % koagregasyon değeri *Enterococcus faecalis* RI 6 ile *Salmonella enteritidis* ATCC MU:80 arasında (%57,58) ve en düşük % koagregasyon değeri *Enterococcus faecium* RI 56 ile *Salmonella enteritidis* ATCC MU:80 arasında (%11,63) bulunmuştur.

Enterococcus faecalis RI 6, *Enterococcus faecalis* RI 21, *Enterococcus faecium* RT 81, *Enterococcus faecalis* RT 122, *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 ve *Enterococcus faecalis* NCDO 581 suşlarının en düşük koagregasyon değerleri *Bacillus subtilis* ile tespit edilmiştir.

Enterococcus faecalis RI 6, *Enterococcus faecalis* RI 21, *Enterococcus faecium* RI 41 ve *Enterococcus faecalis* RT 122 suşlarının en yüksek koagregasyon değerleri *S. enteritidis* ile elde edilmiştir (Çizelge 4.5., Çizelge 4.6. ve Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7.).

Çizelge 4.5. *Enterococcus faecalis* suşlarının test bakterileri ile % koagregasyon değerleri

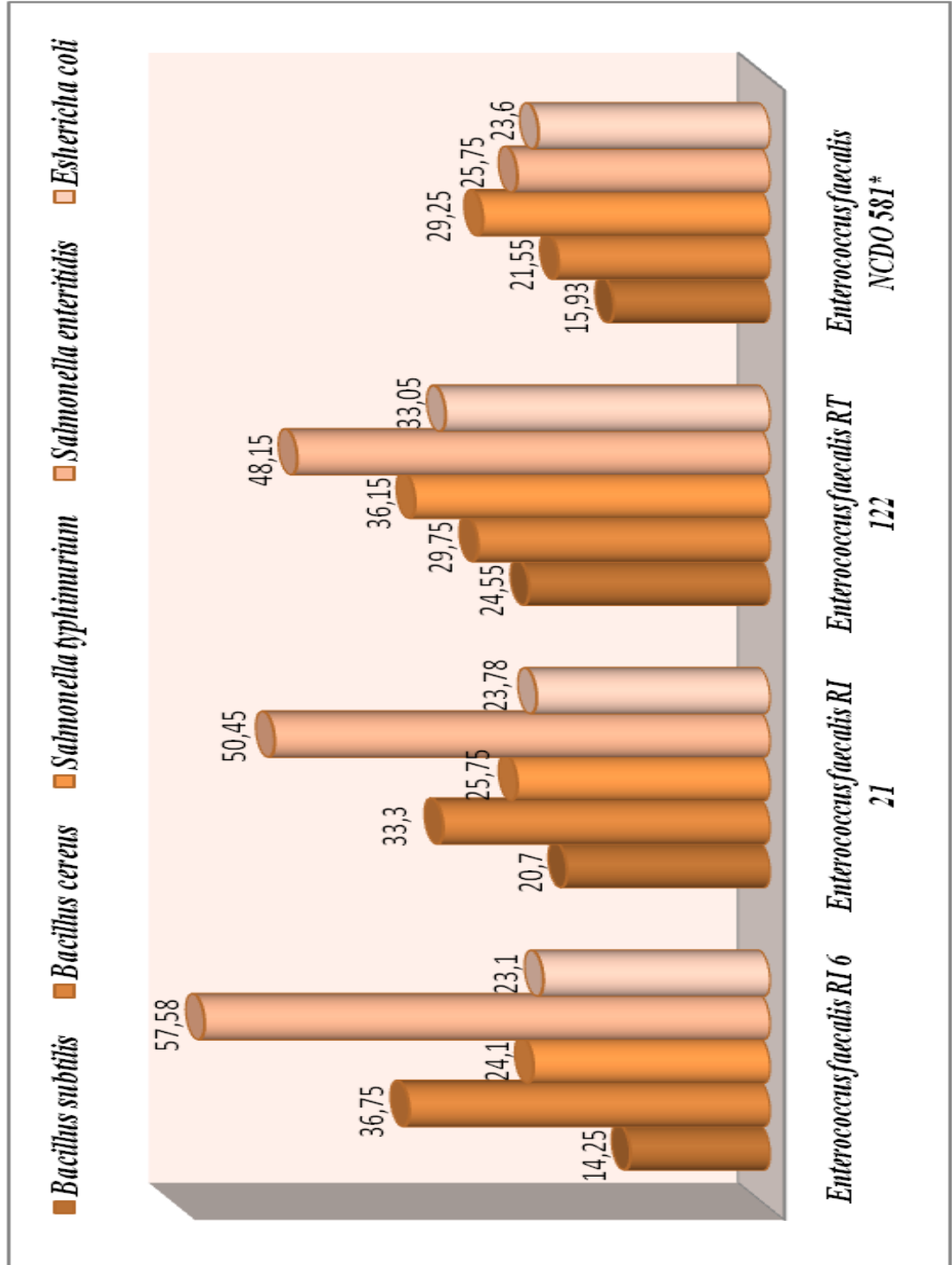
		Test Bakterileri İle % Koagregasyon				
No.	<i>Enterococcus</i> Suşları	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Eshericha coli</i>
1.	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	14,25±0,07	36,75±0,21	24,10±0,14	57,58±0,32	23,10±0,14
2.	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	20,70±0,14	33,30±0,28	25,75±0,21	50,45 ±0,35	23,78±0,18
3.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	24,55±0,07	29,75±0,07	36,15±0,07	48,15±0,21	33,05±0,07
4.	<i>Enterococcus faecalis</i> NCD0 581*	15,93±0,04	21,55±0,07	29,25±0,07	25,75±0,07	23,60±0,07

*; Standart kültür

Çizelge 4.6. *Enterococcus faecium* suşlarının test bakterileri ile % koagregasyon değerleri

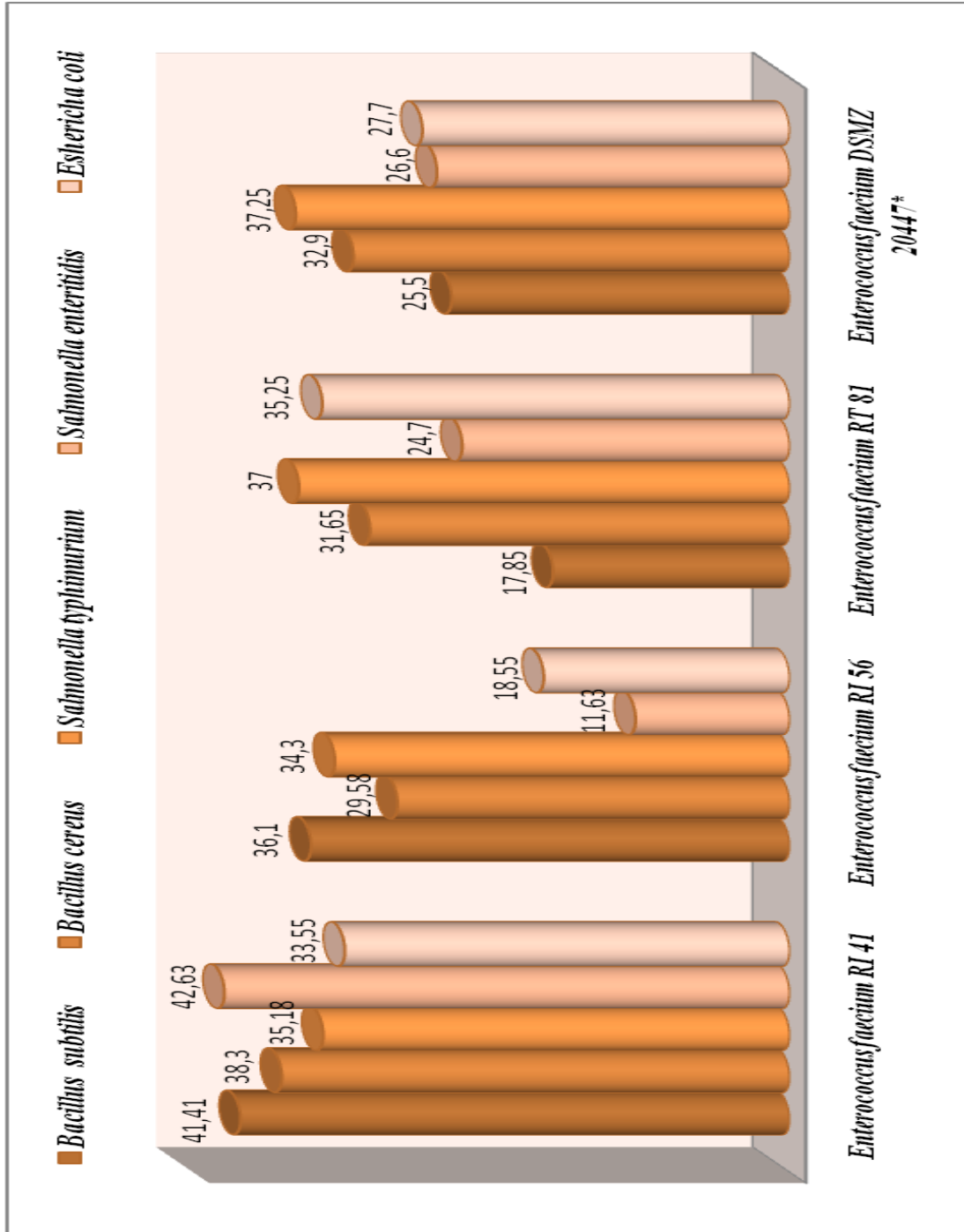
		Test Bakterileri İle % Koagregasyon				
No.	<i>Enterococcus</i> Suşları	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Eshericha coli</i>
1.	<i>Enterococcus faecium</i> RI 41	41,40±0,14	38,30±0,14	35,18±0,11	42,6 ±0,11	33,55±0,07
2.	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	36,10±0,14	29,58± 0,11	34,30±0,14	11,63±0,04	18,55±0,07
3.	<i>Enterococcus faecium</i> RT 81	17,85±0,07	31,65±0,21	37,0±00,14	24,70±0,14	35,25±0,21
4.	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447*	25,50±0,14	32,90±0,14	37,25±0,21	26,60±0,14	27,70±0,14

*; Standart kültür



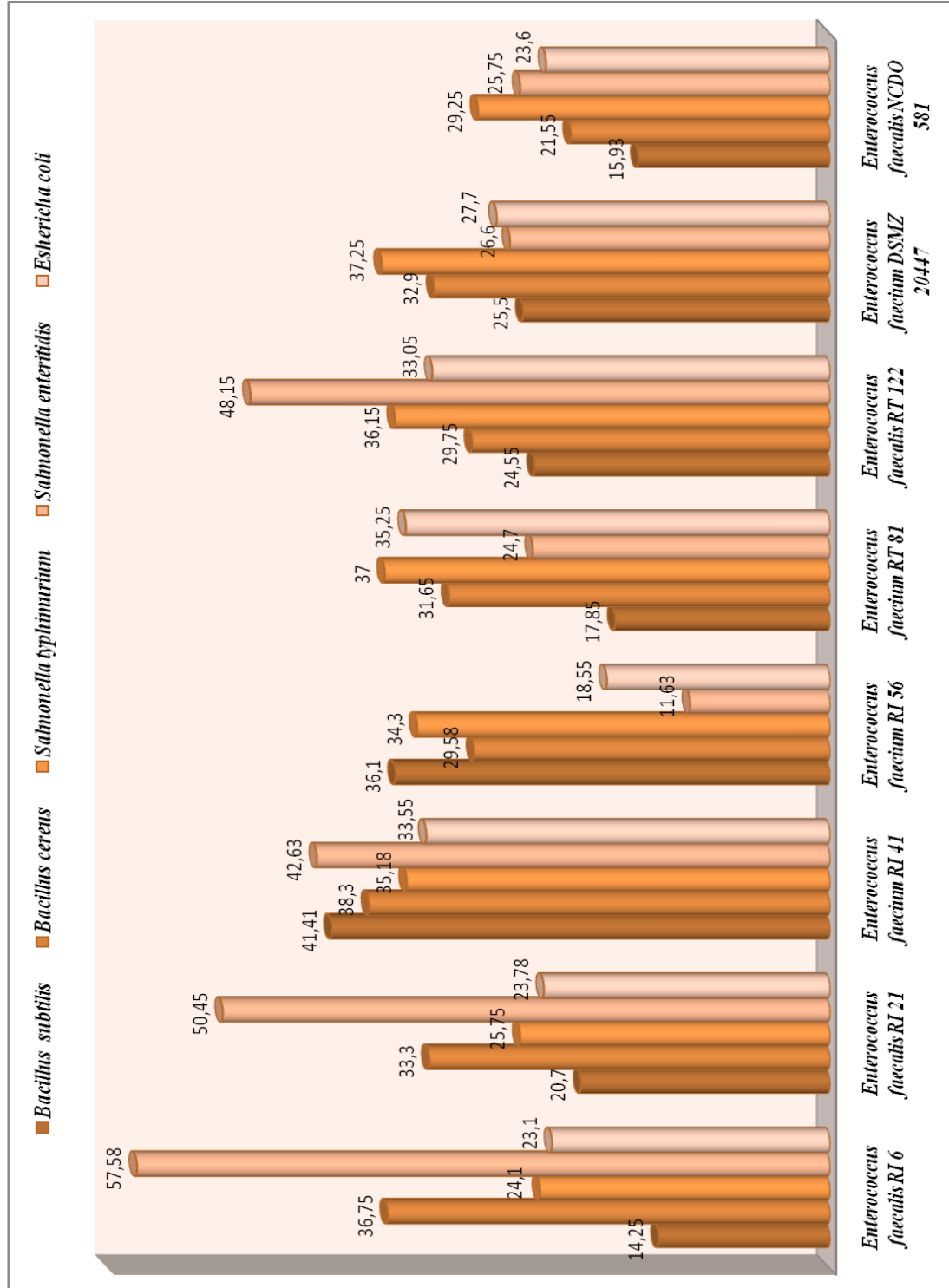
*; Standart kültür

Şekil 4.5. *Enterococcus faecalis* suşlarının test bakterileri ile % koagregasyon değerleri



*; Standart kültür

Şekil 4.6. *Enterococcus faecium* suşlarının test bakterileri ile % koagregasyon değerleri



*; Standart kültür

Şekil 4.7. *Enterococcus* suşlarının test bakterileri ile % koagregasyon değerleri

4.4. *Enterococcus* Bakterilerinin Asit Toleransı

Enterococcus suşlarının asit toleransı Bölüm 3.2.3.' de anlatıldığı gibi yapılmış olup, *Enterococcus* suşlarının farklı pH' larda spektrofotometrik olarak hücre yoğunlukları ölçülmüş ve kontrol grubunun (pH 6,2) hücre yoğunluğuna göre düşüşler % inhibisyon olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7., Çizelge 4.8. ve Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10.).

Enterococcus suşlarının besiortamında asitlik oranının artışına bağlı olarak hücre yoğunluğunda azalma meydana gelmiştir. Suşların genelinde pH 4,0' den sonra bakteri yoğunluğunda önemli bir düşüş gözlenmiş, inhibisyon değerleri % 97' nin üzerine çıkmıştır. Genel olarak pH 2,0, 3,0 ve 4,0' de tüm bakterilerin hücre yoğunluğunda yaklaşık aynı oranlarda (%94,85 -97,68) düşüş tespit edilmiştir (Çizelge 4.7., Çizelge 4.8. ve Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10.).

Suşların % inhibisyon değerleri incelendiğinde pH'ı 5,5 olan besiortamına en toleranslı olan suş *Enterococcus faecium* RT 81 (% 12,98) gözlenirken, en duyarlı suş ise *Enterococcus faecalis* RI 21 (%31,25) olarak tespit edilmiştir. pH 5,5' a yüksek tolerans gösteren suşlar sırasıyla, *Enterococcus faecium* RT 81 (%12,98), *Enterococcus faecalis* NCDO 581(% 13,82) , *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 (%19,25), *Enterococcus faecalis* RT 122 (%19,93), *Enterococcus faecium* RI 56 (%21,85) ve *Enterococcus faecium* RI 41 (%24,11) olarak belirlenmiştir. *Enterococcus faecalis* RI 6 (%29,62) ve *Enterococcus faecalis* RI 21 (%31,25) suşları pH 5,5'a orta derecede tolerans göstermişlerdir (Çizelge 4.7., Çizelge 4.8. ve Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10.).

pH 5,0' a en yüksek toleransı *Enterococcus faecium* RI 56 suşu (% 62,25), en düşük toleransı ise *Enterococcus faecalis* RI 6 (% 93,84) suşu göstermiştir (Çizelge 4.7., Çizelge 4.8. ve Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10.).

pH 5,0' a yüksek tolerans gösteren suşlar sırasıyla, *Enterococcus faecium* RI 56 (% 62,25) , *Enterococcus faecalis* NCDO 581 (% 67,76), *Enterococcus faecium* RT 81(% 73,68) , *Enterococcus faecalis* RT 122 (% 75,21), *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 (% 75,65) ve *Enterococcus faecium* RI 41 (% 76,34) suşları olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7., Çizelge 4.8. ve Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10.).

Çizelge 4.7. *Enterococcus faecalis* suşlarının farklı pH derecelerindeki % inhibisyon değerleri

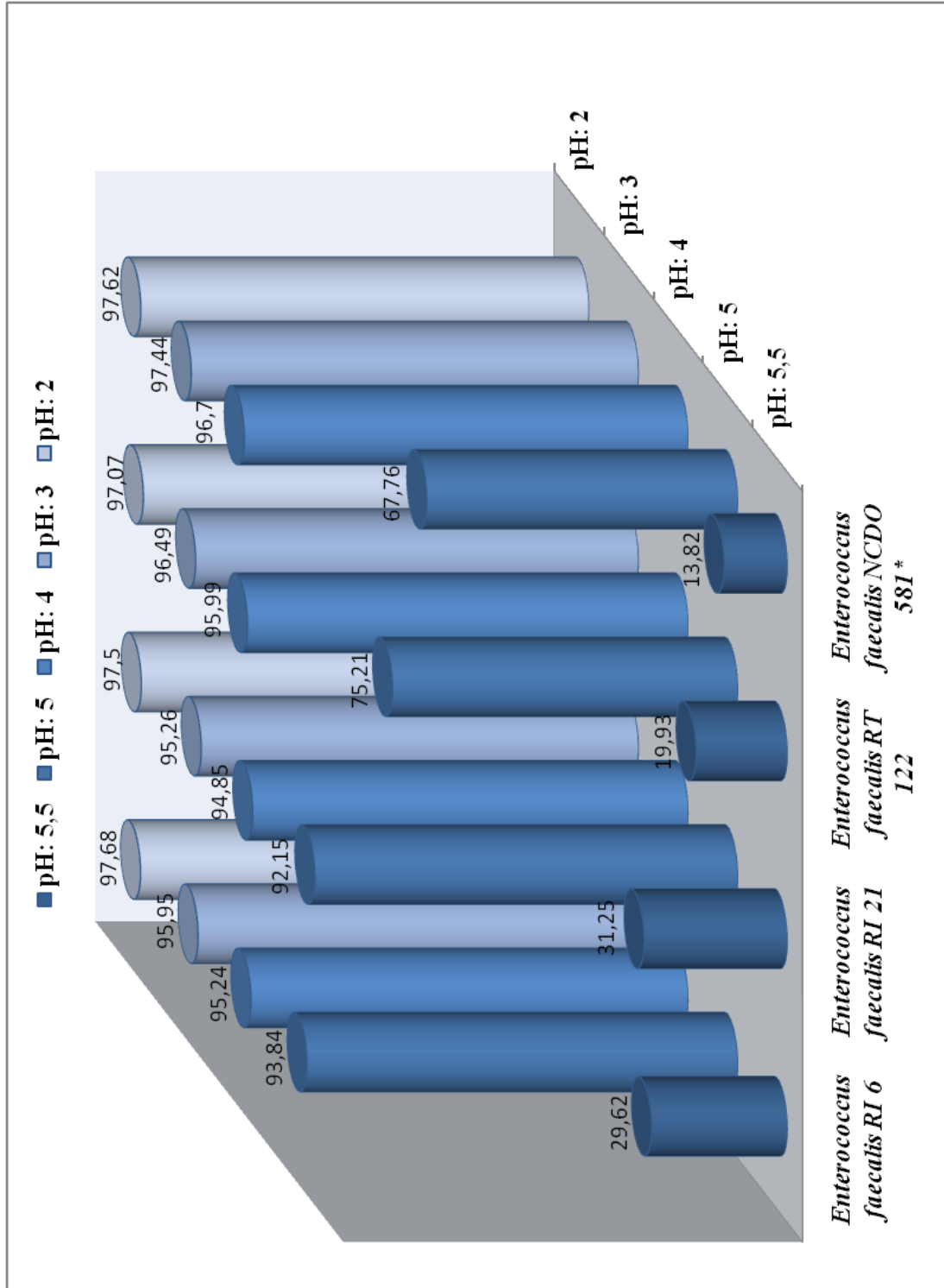
No.	<i>Enterococcus faecalis</i> Suşları	pH: 2	pH: 3	pH: 4	pH: 5	pH: 5,5
1.	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	97,68±0,06	95,95±0,00	95,24±0,18	93,84±0,00	29,62±0,11
2.	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	97,50±0,06	95,26±0,00	94,85±0,06	92,15±0,00	31,25±0,19
3.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	97,07±0,00	96,49±0,06	95,99±0,00	75,21±0,06	19,93±0,17
4.	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581*	97,62±0,00	97,44±0,05	96,70± 0,05	67,76±0,00	13,82±0,00

*; Standart kültür

Çizelge 4.8. *Enterococcus faecium* suşlarının farklı pH derecelerindeki % inhibisyon değerleri

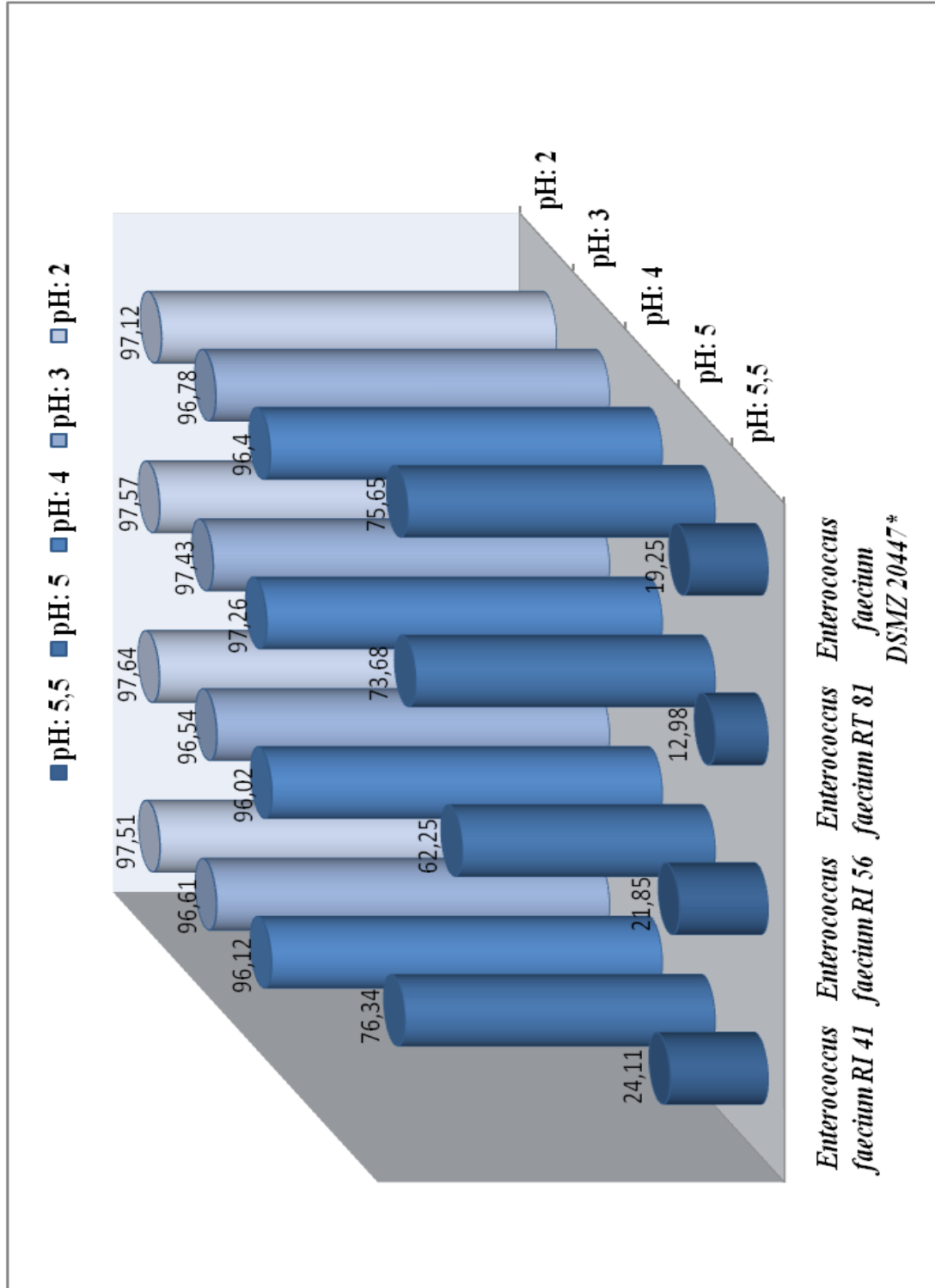
No.	<i>Enterococcus faecium</i> Suşları	pH: 2	pH: 3	pH: 4	pH: 5	pH: 5,5
1.	<i>Enterococcus faecium</i> RI 41	97,51±0,00	96,61±0,00	96,12±0,06	76,34±0,11	24,11±0,00
2.	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	97,64±0,00	96,54±0,00	96,02±0,06	62,25±0,16	21,85±0,06
3.	<i>Enterococcus faecium</i> RT 81	97,57±0,00	97,43±0,00	97,26±0,05	73,68±0,20	12,98±0,00
4.	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447*	97,12±0,00	96,78±0,06	96,40±0,06	75,65±0,16	19,25±0,43

*; Standart kültür



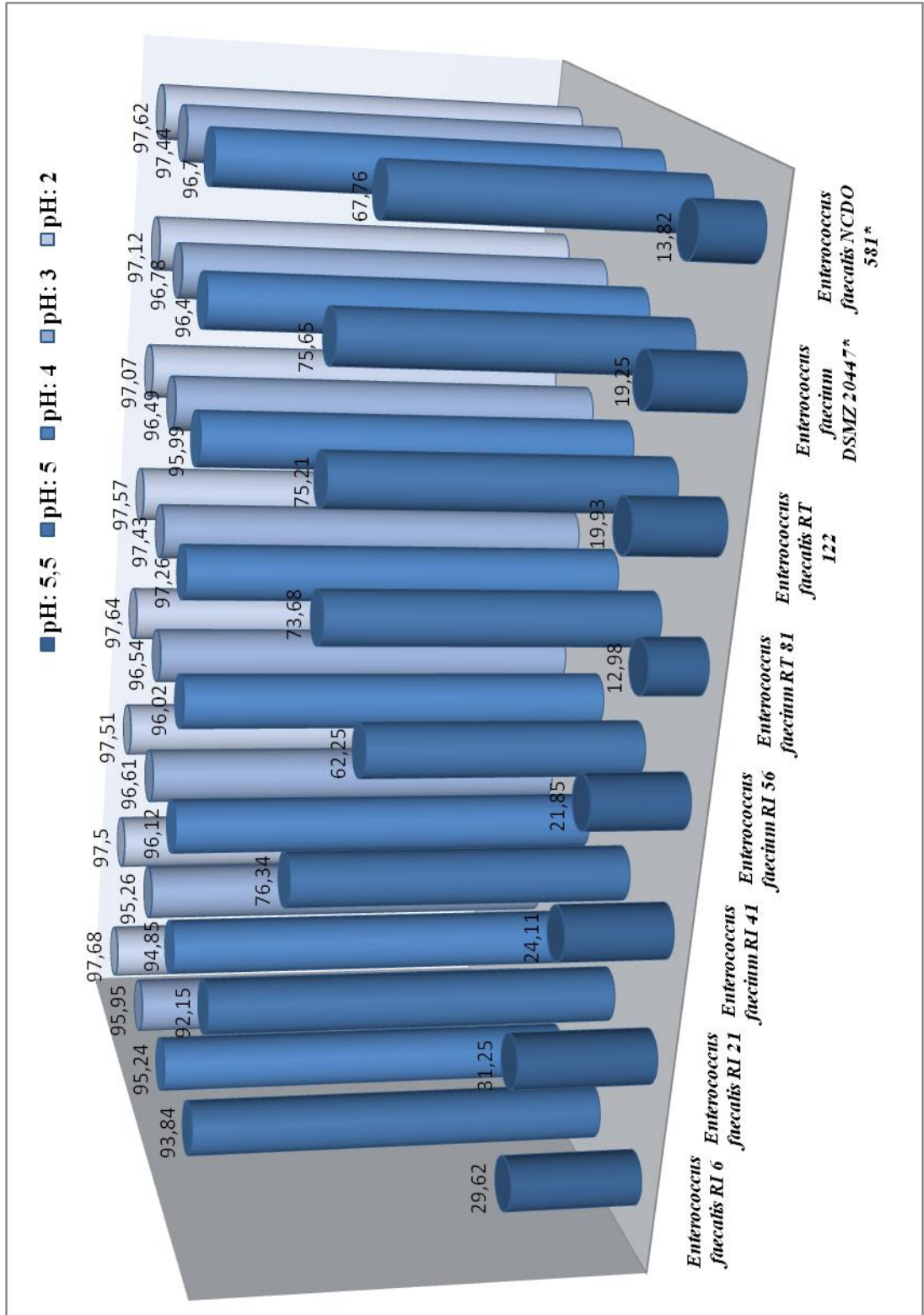
*; Standart kültür

Şekil 4.8. *Enterococcus faecalis* suşlarının farklı pH derecelerindeki % inhibisyon değerleri



*; Standart kültür

Şekil 4.9. *Enterococcus faecium* suşlarının farklı pH derecelerindeki % inhibisyon değerleri



*; Standart kültür

Şekil 4.10. *Enterococcus* suşlarının farklı pH derecelerindeki % inhibisyon değerleri

4.5. *Enterococcus* Bakterilerinin Safra Toleransı

Enterococcus suşlarının %0,06, %0,15 ve %0,30' luk safra konsantrasyonlarında safraya olan toleransı Bölüm 3.2.4.' de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve % inhibisyon değerleri Çizelge 4.9. ve Çizelge 4.10.' da verilmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlardan, *Enterococcus* cinsi bakterilerin bağırsakta bulunan safraya olan toleransları, safra oranına göre değişmekte olup, safranin %0,06, %0,15 ve %0,30 konsantrasyonlarında, artan konsantrasyona bağlı olarak bakterilerin gelişiminde azalma gözlenmiştir. *Enterococcus*' lar ortamda bulunan safrayı belirli bir seviyeye kadar tolere edebilmektedir. Ancak safra konsantrasyonu yükseldikçe, özellikle %0,30 oranındaki safranin varlığında birçok *Enterococcus* suşunun üreme yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir (Çizelge 4.9., Çizelge 4.10. ve Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13.).

Enterococcus' ların farklı safra konsantrasyonlarından üretildiğinde yüzde inhibisyon değerleri farklı bulunmuştur. %0,06 safra konsantrasyonunda % inhibisyon değerlerinin % 0,60 ile % 10,22 arasında bulunmuştur. %0,15 safra konsantrasyonunda % inhibisyon değerleri % 2,35 ile % 19,19 arasında ve % 0,30 safra konsantrasyonunda % inhibisyon değerleri % 20,50 ile % 47,62 arasında tespit edilmiştir. En yüksek yüzde inhibisyonun % 0,30 safra konsantrasyonunda gözlenmiştir (Çizelge 4.9. ve Çizelge 4.10.).

% 0,06 safra konsantrasyonunda *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 suşu % 10,22 oranında en yüksek inhibisyonu gösterirken, %0,15 ve %0,30 safra konsantrasyonu bakterilerin üremelerini önemli derecede etkilediği ve inhibisyon oranının bazen %20' nin üstüne çıktığı gözlenmiştir. Suşlar arasında safraya karşı en toleranslı suşlar *Enterococcus faecium* RI 41, *Enterococcus faecium* RI 56 ve *Enterococcus faecalis* NCDO 581 suşları olarak belirlenmiştir. Bu bakteriler ortamda bulunan safrayı tolere ederek olumlu yönde gelişim göstermişlerdir. *Enterococcus faecalis* RI 6 ve *Enterococcus faecium* RT 81 suşlarında belli orandaki safrayı tolere edebildiği ve olumlu yönde gelişim gösterdikleri tespit edilmiştir.

Buna karşılık ortamdaki safraya karşı en duyarlı suşlar, *Enterococcus faecalis* RI 21 ve *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 suşları olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.9., Çizelge 4.10. ve Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13.).

Çizelge 4.9. *Enterococcus faecalis* suşlarının farklı safra konsantrasyonlarında % inhibisyon değerleri

		% İnhibisyon		
No.	<i>Enterococcus faecalis</i> Suşları	% 0,06 Safra	% 0,15 Safra	% 0,30 Safra
1.	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	0,60±0,00	-	-
2.	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	5,92±0,00	19,19±0,1	42,51±0,00
3.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	6,33±0,18	18,47±0,06	20,50±0,06
4.	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581*	-	-	-

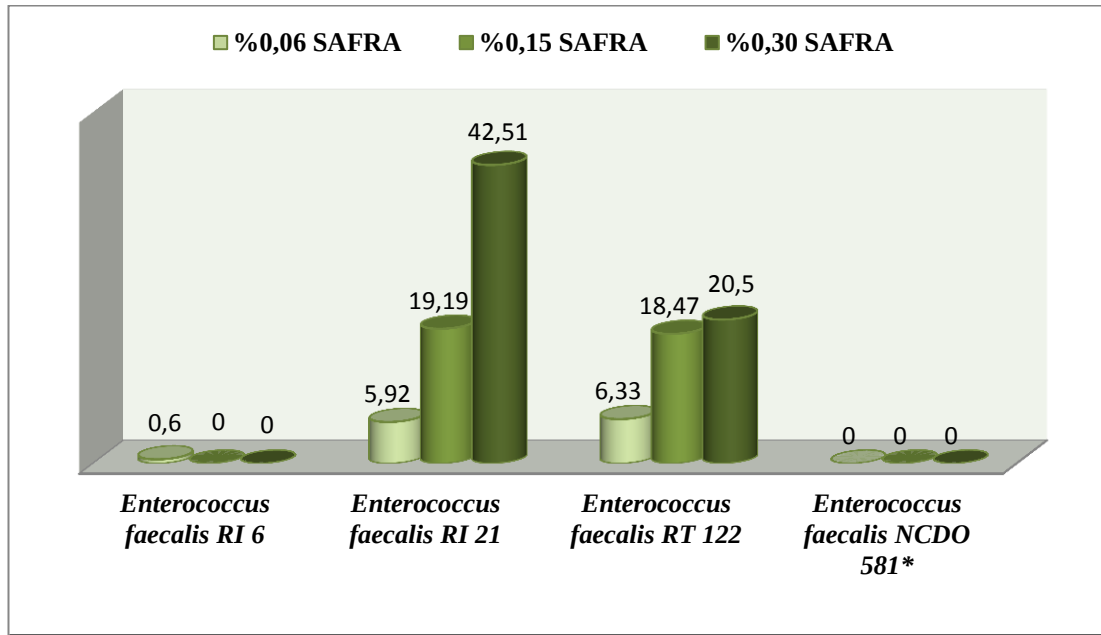
*; Standart kültür

Çizelge 4.10. *Enterococcus faecium* suşlarının farklı safra konsantrasyonlarında % inhibisyon değerleri

		% İnhibisyon		
No.	<i>Enterococcus faecium</i> Suşları	%0,06 Safra	%0,15 Safra	%0,30 Safra
1.	<i>Enterococcus faecium</i> RI 41	-	-	-
2.	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	-	-	-
3.	<i>Enterococcus faecium</i> RT 81	-	2,35±0,31	26,05±0,57
4.	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447*	10,22±0,23	17,64±0,08	47,62±0,08

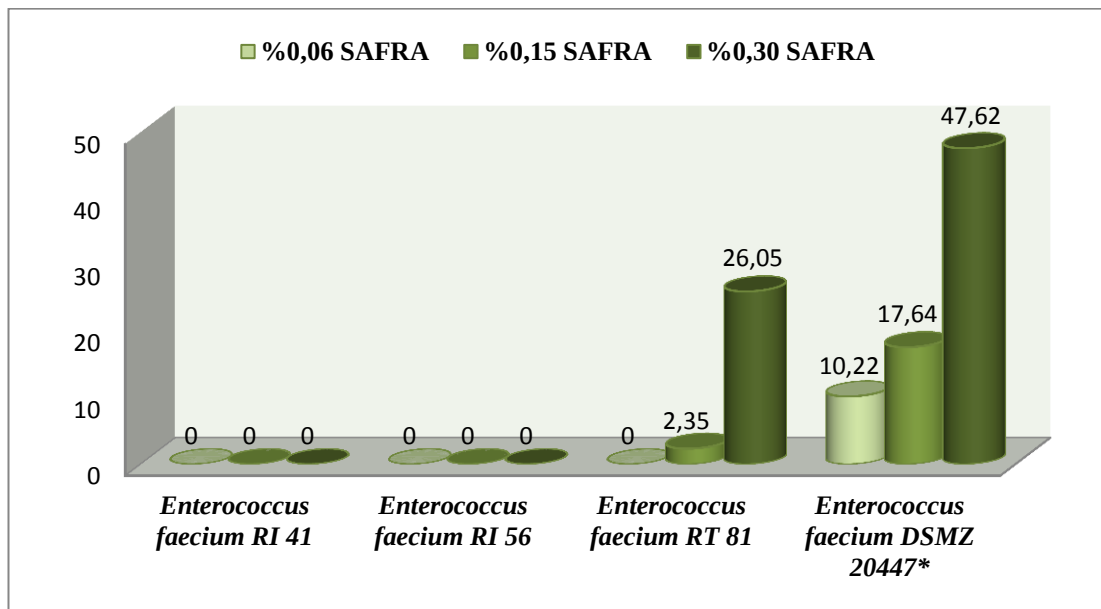
*; Standart kültür

- ; *Enterococcus* suşlarında inhibisyon gözlenmemiştir.



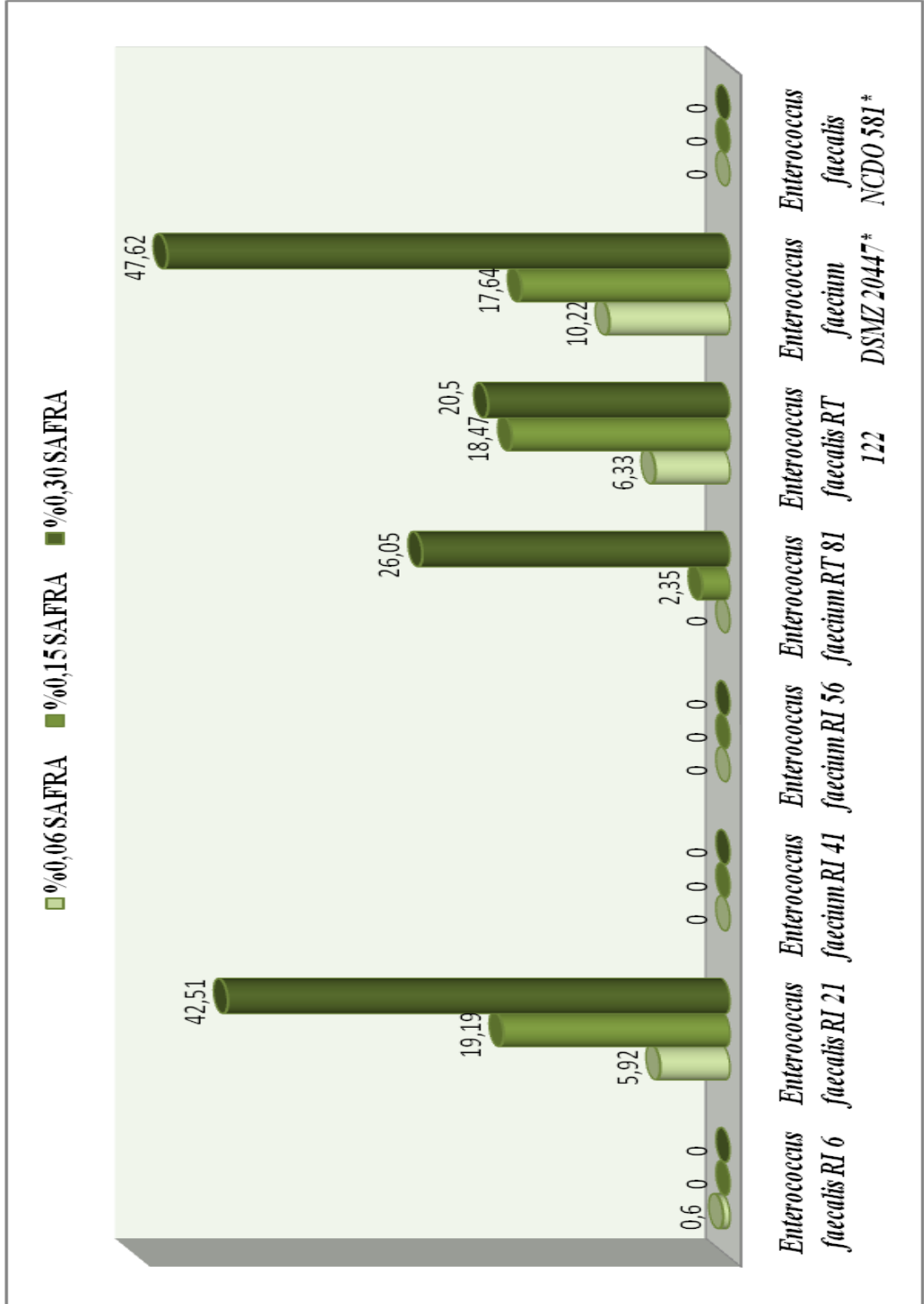
*; Standart kültür

Şekil 4.11. *Enterococcus faecalis* suşlarının farklı safra konsantrasyonlarında % inhibisyon değerleri



*; Standart kültür

Şekil 4.12. *Enterococcus faecium* suşlarının farklı safra konsantrasyonlarında % inhibisyon değerleri



*; Standart kültür

Şekil 4.13. *Enterococcus* suşlarının farklı safra konsantrasyonlarında % inhibisyon değerleri

4.6. *Enterococcus* Bakterilerinin Farklı Hidrokarbonlara Tutunma Özellikleri

Enterococcus suşlarının etil asetat, kloroform, tolüen ve ksilen gibi farklı hidrokarbonlara karşı mikrobiyal tutunma özelliği Bölüm 3.2.5.' de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve % hidrofobisite değerleri Çizelge 4.11. ve Çizelge 4.12.' de verilmiştir.

Suşların hidrofobisite sonuçları değerlendirildiğinde *Enterococcus* suşlarının her dört çözücüde de hidrofobisite özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bu suşların her dört çözücüde hidrofobisite özelliği göstermesi yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir.

Bu sonuçla birlikte *Enterococcus* suşlarının kloroform ve etil asetat kimyasallarına karşı daha fazla tutunma özelliği gösterdiği, ksilen ve tolüen kimyasallarına ise daha az tutunma özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Kloroform ve etil asetat kimyasallarına karşı en fazla tutunma özelliği gösteren *Enterococcus* suşu; *Enterococcus faecium* RI 56 suşu (kloroform;% 84,92 / etil asetat ; % 80,17) iken, en az tutunma özelliği gösteren suş ise *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 (kloroform; %54,34 / etil asetat ; % 47,92) suşudur. Ksilen kimyasalına karşı en fazla tutunma özelliği gösteren suş *Enterococcus faecalis* RT 122 (% 46,67) iken, en az tutunma özelliği gösteren suş ise *Enterococcus faecium* RI 41 (% 17,60) olarak tespit edilmiştir. Tolüen kimyasalına karşı en fazla tutunma özelliği gösteren suşlar *Enterococcus faecium* RI 56 (% 49,67) ve *Enterococcus faecalis* RI 6 (% 49,09) olup, en az tutunma özelliği gösteren suş ise *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 (%20,17) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11., Çizelge 4.12. ve Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16.).

Çizelge 4.11. *Enterococcus faecalis* suşlarının farklı hidrokarbonlara % tutunma değerleri

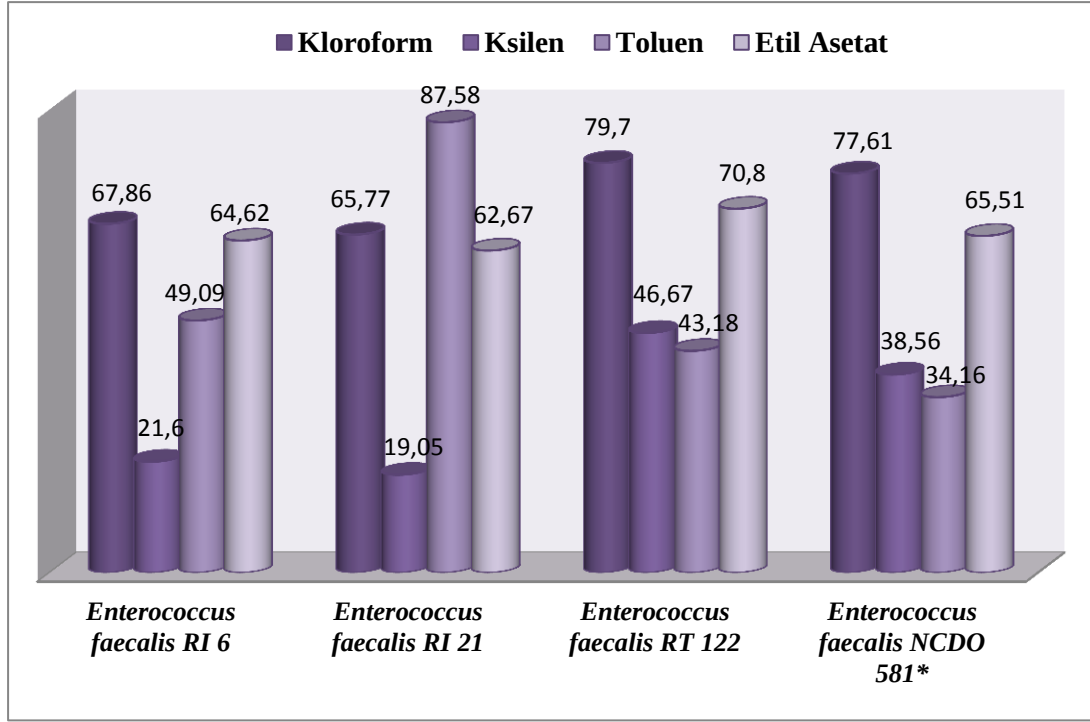
		% Tutunma			
No.	<i>Enterococcus faecalis</i> Suşları	Kloroform	Xylene (Ksilen)	Toluen	Etil asetat
1.	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	67,86±0,35	21,60±0,23	49,09±0,12	64,62±0,23
2.	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	65,77±0,24	19,05±0,12	87,58±0,36	62,67±0,12
3.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	79,70±0,23	46,67±0,12	43,18±0,12	70,80±0,12
4.	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581*	77,61±0,23	38,56±0,12	34,16±0,23	65,51±0,23

*; Standart kültür

Çizelge 4.12. *Enterococcus faecium* suşlarının farklı hidrokarbonlara % tutunma değerleri

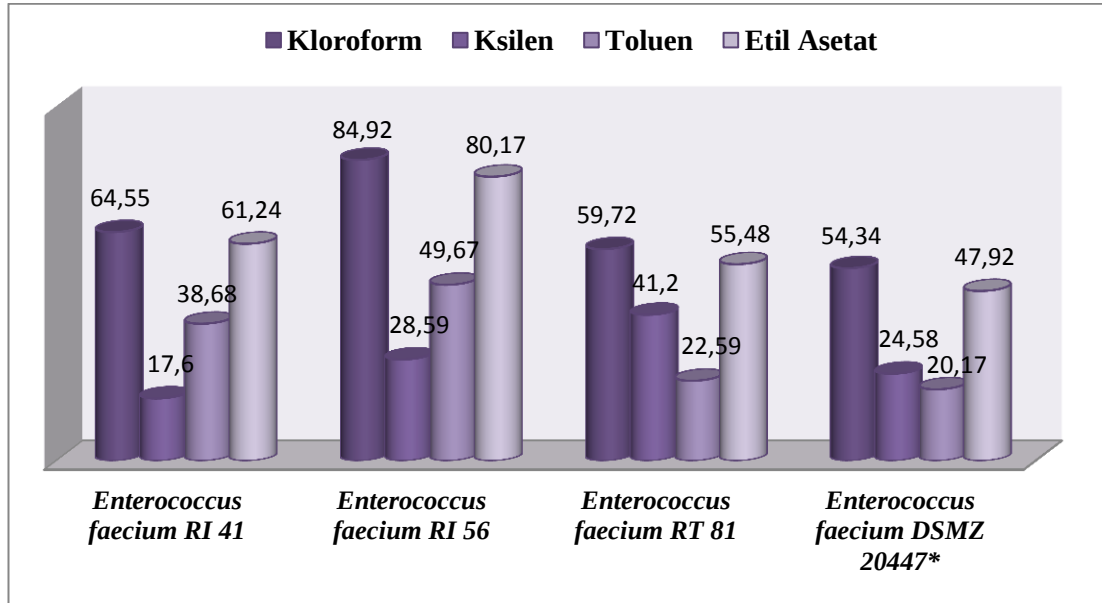
		% Tutunma			
No.	<i>Enterococcus faecium</i> Suşları	Kloroform	Xylene (Ksilen)	Toluen	Etil asetat
1.	<i>Enterococcus faecium</i> RI 41	64,55±0,12	17,60±0,12	38,68±0,23	61,24±0,12
2.	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	84,92±0,36	28,59±0,12	49,67±0,23	80,17±0,23
3.	<i>Enterococcus faecium</i> RT 81	59,72±0,12	41,20±0,23	22,59±0,23	55,48±0,00
4.	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447*	54,34±0,47	24,58±0,35	20,17±0,24	47,92±0,12

*; Standart kültür



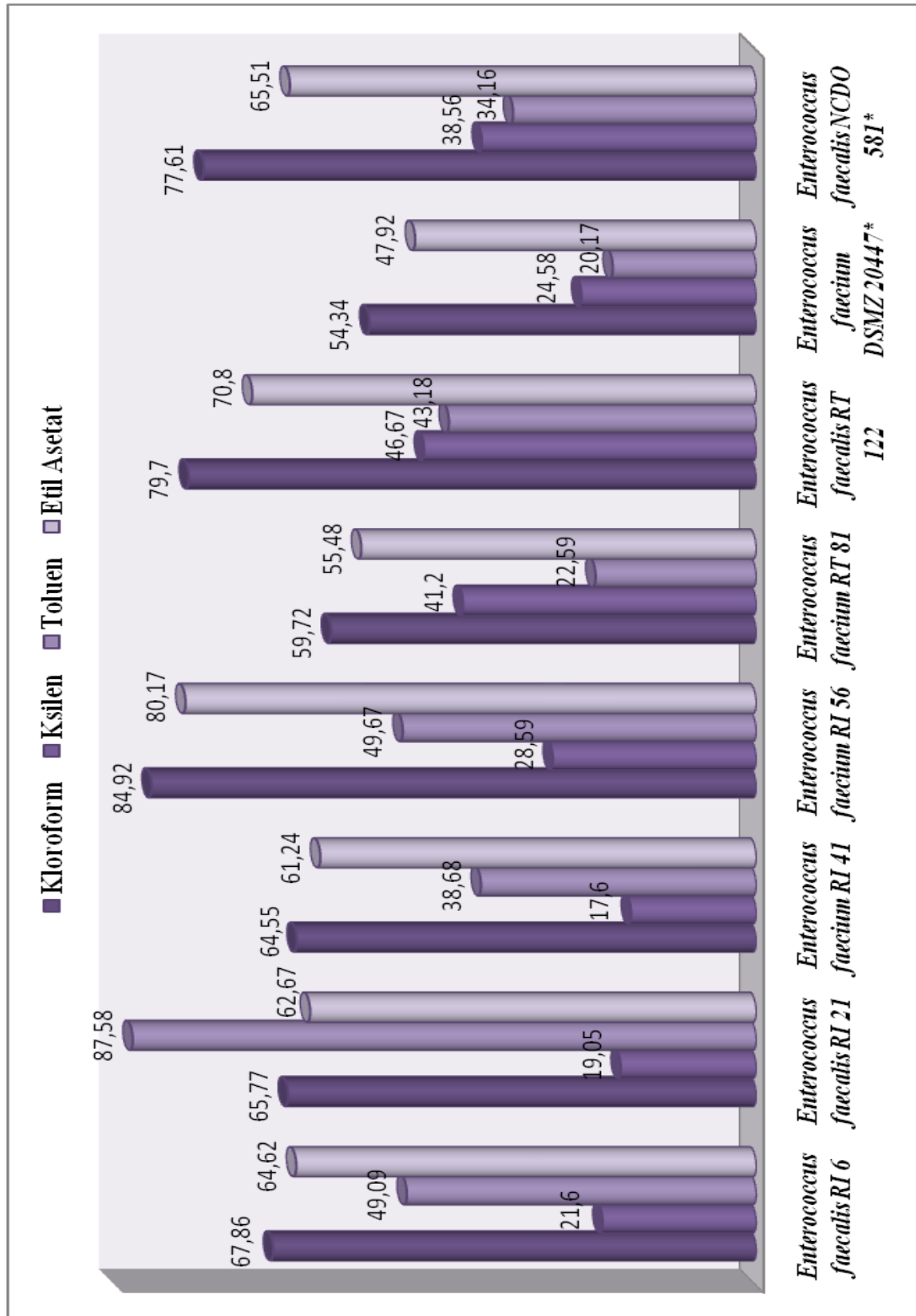
*; Standart kültür

Şekil 4.14. *Enterococcus faecalis* suşlarının farklı hidrokarbonlara % tutunma değerleri



*; Standart kültür

Şekil 4.15. *Enterococcus faecium* suşlarının farklı hidrokarbonlara % tutunma değerleri



*; Standart kültür

Şekil 4.16. *Enterococcus* suşlarının farklı hidrokarbonlara % tutunma değerleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki faydalı etkileri ilk defa 20. yüzyılın başlarında, Rus bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından öne sürülmüştür. Metchnikoff, Bulgar çiftçilerin fermente süt ürünlerini tüketmesi sonucunda daha sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını, bunun nedeninin ise bu ürünlerde bulunan çubuk şeklindeki bakterilerin (*Lactobacillus* spp.) bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi ve aynı zamanda toksik mikrobiyal aktiviteyi azaltması olduğunu belirtmiştir. Sağlıklı bir yaşam ile fermente gıdalar arasındaki bu bağlantı bugünde geçerliliğini korumakta olup, fermente ürünler üzerine yapılan çalışmalar ancak son 10–15 yılda hız kazanmıştır [Çakır, 2003].

Özellikle son 5 yıllık zaman içerisinde tüketicilerin fonksiyonel gıdalara olan ilgisi ve buna bağlı araştırma ilgisinin artması, probiyotik özelliklere sahip olan Enterokok suşlarının gıdalara ilave edilmesi fikrini oldukça popüler hale getirmiştir. Enterokokların biyolojik koruyucu kültür ve olgunlaşmayı hızlandırıcı ajan olarak kullanım potansiyelleri de bulunmakta ve konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalardan olumlu sonuçlar alınmaktadır.

Bu çalışmada probiyotik bakterilerde bulunması gereken bu özellikler dikkate alınarak, çalışmada kullanılan *Enterococcus* suşlarının otoagregasyon-koagregasyon özellikleri, farklı pH değerlerindeki ve farklı safra konsantrasyonlarındaki gelişmeleri ve farklı hidrokarbonlara mikrobiyal tutunma yüzdeleri Bölüm 3'te anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçları Bölüm 4'te değerlendirilmiştir (Bkz. Bölüm 3 ve Bölüm 4).

Çalışmada *Enterococcus faecalis* NCDO 581 ve *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 standart suşları ile Türkiye ve İran' ın farklı bölgelerinde üretilen beyaz peynirlerden daha önce Hajikhani (2011) tarafından izole edilen ve tanımlanan EPS üretimi yüksek olarak belirlenen *E. faecium* RI 41, *E. faecium* RI 56 ve *E. faecalis* RT 122 suşları ile EPS üretimi bakımından düşük olan *E. faecalis* RI 6, *E. faecalis* RI 21 ve *E. faecium* RT 81 suşları kullanılmıştır.

Laktik asit bakterilerinin agregasyon madde üretimleri mide-bağırsak sisteminde yaşama ve kolonize olabilme şanslarını artırır. Bu da bakterilerin bağırsağın peristaltik hareketlerinden dolayı elimine olmaları engeller ve bağırsak ekosisteminde avantajlı olmaları sağlamaktadır [Nikolic ve ark., 2008]. *Enterococcus* suşlarının potansiyel yapışma yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla bu suşların otoagregasyon ve koagregasyon özellikleri incelenmiştir. *Enterococcus* suşlarının agregasyon ve koagregasyon özellikleri üzerine yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [Rosenberg ve ark., 1980; Brassart ve ark., 1994].

Bir araştırmada ise 12 adet probiyotik bakteri türünden, 20°C' de 20 saatlik inübasyondan sonra *L. rhamnosus* GG ve *L. fermentum* ME-3 suşlarını %25 otoagregasyon oranıyla yüksek otoagregasyon türleri olarak belirlenirken, *Bifidobacterium longum* 46 suşunu %8,9 ve *B. lactis* 420 suşunu %5 otoagregasyonla en düşük otoagregasyon türleri olarak belirlenmiştir.Çalıştıkları 12 adet probiyotik bakteri türünden 9' u 37°C' de yüksek otoagregasyon (%28,8-63,2) göstermiştir [Collado ve ark., 2008].

Enterococcus suşların otoagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde (Bkz. Çizelge 4.3., Çizelge 4.4. ve Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4.), *Enterococcus faecalis* RT 122 en yüksek (%57,5) otoagregasyon özelliği gösterirken, *Enterococcus faecalis* RI 6 suşu ise en düşük (%25,40) otoagregasyon özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Genel olarak EPS üretimleri yüksek olan *Enterococcus*' ların % otoagregasyon değerleri de yüksek bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizde suşlarının EPS üretimleri ile otoagregasyon özelliği arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Enterococcus suşlarının bağırsak patojeni ve gıda kontaminantı olan *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ve *Salmonella typhimurium* MU 80 bakterileri arasındaki % koagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde, en yüksek % koagregasyon *Enterococcus faecalis* RI 6 ile *Salmonella enteritidis* ATCC MU:80 arasında (%57,58) ve en düşük *Enterococcus faecium* RI 56 ile *Salmonella enteritidis* ATCC MU:80 arasında (%11,63) bulunmuştur.

Enterococcus faecalis RI 6, *Enterococcus faecalis* RI 21, *Enterococcus faecium* RT 81, *Enterococcus faecalis* RT 122, *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 ve *Enterococcus faecalis* NCDO 581 suşlarının en düşük koagregasyon değerleri *Bacillus subtilis* ile elde edilmiştir. *Enterococcus faecalis* RI 6, *Enterococcus faecalis* RI 21, *Enterococcus faecium* RI 41 ve *Enterococcus faecalis* RT 122 suşlarının en yüksek koagregasyon değerleri *S. enteritidis* ile elde edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.5., Çizelge 4.6. ve Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7.). *Enterococcus* suşlarının koagregasyon özellikleri ile patojen bakterileri inhibe ederek onları etkisiz hale getirebildikleri düşünülebilir.

Bazı araştırmacılar *Lactobacillus* türlerinin koagregasyon yeteneklerinin patojenlerin kolonizasyonunu engelleyen bir bariyer olabileceğini bildirmişlerdir [Boris, 1997; Schachtsiek, 2004].

Yapılan istatistiksel analizde suşlarının EPS üretimleri ile *Bacillus subtilis* ve *Salmonella typhimurium* bakterileriyle koagregasyon özellikleri arasındaki ilişki $P<0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Ancak suşların EPS üretimleri ile *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis* ve *Escherichia coli* bakterileriyle koagregasyon özellikleri arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Probiyotik bakterilerin mide-bağırsak yolunda canlılıklarını sürdürüp, ortamda kolonize olabilmeleri için midenin asidik pH'larına (2,5-3,5) ve bağırsağın safırlı ortamına tolerans gösterebilmeleri bu bakterilerin önemli özelliklerindendir [Mainville ve ark., 2005].

Gastrointestinal geçiş sırasında kültürlerin pepsin varlığını, düşük mide pH'sını, proteaz bakımından zengin duodenum içeriğini ve safra tuzları tolere edebilmesi gerekir. Mide pH'sı gıda alımı sonrasında 6,0'ya kadar artmasına rağmen, genellikle 2,5 ile 3,5 arasında değişmektedir. Midede açlık ile pH 1,5'a kadar düşebilir. Bu aşırı asidik koşullarda hayatta kalma probiyotiklerin karşılaştığı ilk fizyolojik sorunlardan biridir [Masco ve ark., 2007].

Mishra ve Prasad (2005)'ın yaptıkları çalışmada, kullanılan 7 adet laktik asit bakterisinden sadece 3 suşun pH 2,0 veya 3,0'e dirençlilik gösterdiği rapor edilmiştir. Yapılan diğer bir araştırmada, 44 adet *Lactobacillus* suşunun mide sıvısındaki asit dirençliliği test edilmiştir ve pH 2,5' da herhangi bir suşta üreme görülmemiştir [Jacobsen ve ark., 1999]. Probiyotik bakterilerin canlılık oranındaki azalmanın sebebi pepsinden dolayı veya pepsin ve yüksek pH'nın birlikte etkilerinden dolayı olabilir. Diğer taraftan, süt proteinleri bakteriler üzerinde koruyucu etki gösterip, midenin asidik ortamında bakterilerin canlı kalmalarını desteklemektedir. Bu yüzden, probiyotik bakterilerin genellikle süt veya etli gıdalarla birlikte kullanıldığında daha etkili oldukları bildirilmiştir [Fernandez ve ark., 2003].

Enterococcus suşlarının farklı pH' larda gösterdikleri asit toleransı incelendiğinde, bakterilerin üreme ortamında asitlik oranının artışına bağlı olarak hücre yoğunluğunda azalma gözlenmiştir. Genel olarak pH 2,0, 3,0 ve 4,0' de tüm bakterilerin hücre yoğunluğunda yaklaşık % 94,85 - % 97,68 oranlarında düşüş tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.7., izelge 4.8. ve şekil 4.8., şekil 4.9., şekil 4.10.).

Enterococcus suşları arasında asitli ortama (pH 5,5) en toleranslı olan suş *Enterococcus faecium* RT 81 (%12,98) ve en duyarlı suş ise *Enterococcus faecalis* RI 21 (%31,25) olarak tespit edilmiştir. pH 5,5' a yüksek tolerans gösteren suşlar sırasıyla, *Enterococcus faecium* RT 81 (%12,98) , *Enterococcus faecalis* NCDO 581(% 13,82) , *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 (%19,25) , *Enterococcus faecalis* RT 122 (%19,93), *Enterococcus faecium* RI 56 (%21,85) ve *Enterococcus faecium* RI 41 (%24,11) olarak belirlenmiştir.

pH 5,5' da *Enterococcus faecalis* RI 6 (%29,62) ve *Enterococcus faecalis* RI 21 (%31,25) inhibisyon ile orta derecede tolerans gösterdikleri tespit edilmiştir.

pH 5,0' de en yüksek toleransı *Enterococcus faecium* RI 56 suşu (% 62,25) gösterirken, en düşük toleransı *Enterococcus faecalis* RI 6 (% 93,84) suşu göstermiştir.

pH 5,0' a yüksek tolerans gösteren suşlar sırasıyla, *Enterococcus faecium* RI 56 (% 62,25) , *Enterococcus faecalis* NCDO 581 (% 67,76), *Enterococcus faecium* RT 81 (% 73,68) , *Enterococcus faecalis* RT 122 (% 75,21), *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 (% 75,65) ve *Enterococcus faecium* RI 41 (% 76,34) olarak belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.7., Çizelge 4.8. ve Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10.). *Enterococcus* suşlarının sahip oldukları asit toleransı, onların probiyotik olarak kullanımı sonucu midede canlılıklarını koruyacakları düşünülebilir.

Yapılan istatistiksel analizde suşların EPS üretimleri ile pH:2 ve pH:6,2 besiortamlarında bakteri gelişmeleri arasındaki ilişki $P<0,01$ düzeyinde, pH:5 besiortamlarında bakteri gelişmeleri arasındaki ilişki $P<0,05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Ancak, suşların EPS üretimleri ile pH: 3, pH: 4 ve pH 5,5 besiortamlarında bakteri gelişmeleri arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Probiyotik bakterilerin diğer özelliklerinden biri de bakterilerin mide sıvısından sonra ince bağırsak sıvısı ortamına da dirençlilik gösterebilmeleridir. İnce bağırsak mide geçişini takiben gastrointestinal sistemde ikinci büyük engeldir. İnce bağırsağın pH'ı bakterilerin yaşamasına daha uygun olmasına rağmen, pankreatin ve safra tuzları varlığı olumsuz etki yapabilir [Masco ve ark., 2007].

Safra toleransı probiyotik laktik asit bakterilerinin ince bağırsakta yaşama, gelişme ve etki gösterebilmeleri için gerekli ve önemli özelliklerinden biri olarak görülmektedir [Minelli ve ark., 2004; Walker ve Gillilve, 1993]. Probiyotik bakteriler safra toleransı açısından farklılık göstermekte ve bunların tolerans mekanizmaları tam olarak belirlenememiştir [Klaenhammer ve Kullen, 1999].

Yapılan bir çalışmada, geleneksel peynirlerden izole edilen 122 adet *Enterococcus faecium* suşundan 86'sının (suşların yaklaşık %70'i), %0,3 safra içeren ortama yüksek düzeyde dirençlilik gösterdikleri rapor edilmiştir ve *E. faecium* suşlarının diğer probiyotik bakterilere göre mide-bağırsak sisteminin zorlu şartlarına daha dayanıklı oldukları bildirilmiştir [Bhardwaj ve ark., 2010; Saavedra ve ark., 2003].

Strompfova ve ark. (2004), *Enterococcus* suşlarının (*E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. hirae*) %1 oranında safra içeren ortamda safra toleranslarını inceleyip, canlılık oranlarını %72 ile %98 değerleri arasında tespit etmiştir.

Wijaya (2003), *E. faecium* suşlarının safra asitlerine ve onikiparmak bağırsağı sıvısına *E. faecalis* suşlarına göre daha toleranslı olduklarını belirtmiştir.

Bhardwaj ve ark. (2010)'nın yaptıkları çalışmada, *E. faecium* KH 24 suşunun %1,0, %2,0 ve %3,0 safra konsantrasyonlarına tolerans gösterdiği ve hücre sayısında çok fazla düşüşün olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, tüm safra konsantrasyonlarında 1 saat inkübasyondan sonra KH 24 suşunun log sayısında artışın gözlemlendiğini bildirirken, suşun safrayı besin kaynağı olarak kullandığını düşünmüşlerdir.

Çalışmamızda *Enterococcus* suşlarının %0,06, %0,15 ve %0,30' luk safra konsantrasyonlarında safra toleransları ve % inhibisyon değerleri belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlardan, *Enterococcus* cinsi bakterilerin bağırsakta bulunan safraya olan toleransı, safra oranına göre değişmekte olup, safranin % 0,06, % 0,15 ve % 0,30 konsantrasyonlarında, artan konsantrasyona bağlı olarak bakterilerin gelişiminde azalma gözlenmiştir. Bazı *Enterococcus* suşları ortamda bulunan safrayı belirli bir seviyeye kadar tolere edebilmektedir. Ancak safra konsantrasyonu yükseldikçe ve özellikle % 0,30 oranındaki safranin varlığında genel olarak enterokokların üreme yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir. *Enterococcus*'ların farklı safra konsantrasyonlarında üretildiğinde yüzde inhibisyon değerleri de farklı bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.9., Çizelge 4.10. ve Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13.).

Enterococcus'ların %0,06 safra konsantrasyonunda % inhibisyon değerlerinin % 0,60 ile % 10,22 arasında olduğu tespit edilmiştir. %0,15 safra konsantrasyonunda % inhibisyon değerleri % 2,35 ile % 19,19 arasında ve % 0,30 safra konsantrasyonunda % inhibisyon değerleri % 20,50 ile % 47,62 arasında belirlenmiştir. En yüksek yüzde inhibisyon % 0,30 safra konsantrasyonunda gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.9., Çizelge 4.10. ve Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13.).

% 0,06 safra konsantrasyonunda *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 suşu % 10,22 oranında en yüksek inhibisyonu gösterirken, %0,15 ve %0,30 safra konsantrasyonunda inhibisyon oranının bazen %20' nin üstüne çıktığı gözlenmiştir. *Enterococcus* suşları arasında safraya karşı en toleranslı suşlar olarak *Enterococcus faecium* RI 41, *Enterococcus faecium* RI 56 ve *Enterococcus faecalis* NCDO 581 suşları olup bu bakteriler ortamda bulunan safrayı tolere ederek olumlu yönde gelişim göstermişlerdir. *Enterococcus faecalis* RI 6 ve *Enterococcus faecium* RT 81 suşlarında besiortamında bulunan belli orandaki safrayı tolere ederek olumlu yönde gelişim göstermişlerdir. Buna karşılık ortamdaki safraya karşı en duyarlı olarak *Enterococcus faecalis* RI 21 ve *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 suşları olarak tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.9., Çizelge 4.10. ve Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13.).

Yapılan istatistiksel analizde suşların EPS üretimleri ile % 0,06, % 0,15 ve % 0,30 konsantrasyonlarında safra tuzu içeren besiortamlarında bakteri gelişmeleri arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Probiyotik bakterilerin seçiminde bağırsak mukozasına adezyon özelliği en önemli kriterlerden biri olarak dikkate alınmıştır. Bağırsakta epitel hücrelere adezyon, spesifik olmayan (hidrofobisite) ve spesifik ligve-reseptör gibi kompleks işlemler gerektirmektedir. Bakteri hücrelerinin adezyonu genellikle hücre yüzey yapısı ile ilişkilendirilmiştir [Collado, 2006; 2008].

Bu amaçla *Enterococcus* suşlarının etil asetat, kloroform, tolüen ve ksilen gibi farklı hidrokarbonlara karşı mikrobiyal tutunma özelliği ve % hidrofobisite değerleri belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.11., Çizelge 4.12. ve Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16.).

Enterococcus suşların hidrofobisite sonuçları değerlendirildiğinde, suşların her dört çözücüde de hidrofobisite özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Suşların hidrofobisite özelliği göstermesi yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir. Bu sonuçla birlikte *Enterococcus* suşlarının kloroform ve etil asetat kimyasallarına karşı daha fazla tutunma özelliği gösterdiği, ksilen ve tolüen kimyasallarına ise tutunmanın daha az olduğu tespit edilmiştir.

Kloroform ve etil asetat kimyasallarına karşı en fazla tutunma özelliği *Enterococcus faecium* RI 56 suşunda (kloroform;% 84,92 / etil asetat ; % 80,17) belirlenirken, en az tutunma özelliği *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 suşunda (kloroform;% 54,34 / etil asetat ; % 47,92) tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.11., Çizelge 4.12. ve Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16.).

Ksilen kimyasalına karşı en fazla tutunma özelliği gösteren suş *Enterococcus faecalis* RT 122 (% 46,67) iken, en az tutunma özelliği *Enterococcus faecium* RI 41 suşunda (% 17,60) tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.11., Çizelge 4.12. ve Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16.).

Tolüen kimyasalına karşı en fazla tutunma özelliği gösteren suşlar *Enterococcus faecium* RI 56 (% 49,67) ve *Enterococcus faecalis* RI 6 (% 49,09) olup, en az tutunma özelliği gösteren suş ise *Enterococcus faecium* DSMZ 20447 (%20,17) olarak belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.11., Çizelge 4.12. ve Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16.).

Yapılan istatistiksel analizde suşlarının EPS üretimleri ile kloroform, etil asetat, ksilen ve tolüen kimyasallarına karşı tutunma özelliği arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada *Enterococcus* suşlarının otoagregasyon özellikleri, bazı gram-pozitif ve gram-negatif patojen ve kontaminant bakterilerle koagregasyon özellikleri, asit ve safra tuzuna karşı gösterdikleri tolerans ve hidrofobisite özellikleri araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *Enterococcus* suşlarının yüksek derecede otoagregasyon ve patojen bakterilerle koagregasyon özelliği, mide-bağırsak sistemindeki zor şartlara dayanıklılık gösterdikleri ve hücre yüzeylerinin hidrofobisite özelliklerinin kompleks olduğu tespit edilmiştir. Bu suşların diğer probiyotik özellikleri araştırıldıktan sonra potansiyel uygulamada kullanılabilirliği aydınlanacaktır.

Pearson korelasyonuna göre, *Enterococcus* suşlarının farklı pH (2, 3, 4, 5, 5,5 ve 6,2) derecelerinde gelişmeleri, farklı safra tuzu konsantrasyonlarında (% 0,06, % 0,15, % 0,30) gelişmeleri, hidrofobisite özellikleri, otoagregasyon ve koagregasyon özellikleri ile EPS üretimleri arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlardan;

- ✓ Suşların EPS üretimleri ile pH:2 ve pH:6,2 besiortamlarında bakteri gelişmeleri arasındaki ilişki $P < 0,01$ düzeyinde, pH:5 besiortamlarında bakteri gelişmeleri arasındaki ilişki $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Ancak, suşların EPS üretimleri ile pH: 3, pH: 4 ve pH 5,5 besiortamlarında bakteri gelişmeleri arasında bir ilişki bulunamamıştır.
- ✓ Suşların EPS üretimleri ile % 0,06, % 0,15 ve % 0,30 konsantrasyonlarında safra tuzu içeren besiortamlarında bakteri gelişmeleri arasında bir ilişki bulunamamıştır.
- ✓ Suşlarının EPS üretimleri ile otoagregasyon özelliği arasında bir ilişki bulunamamıştır.

- ✓ Suşlarının otoagregasyon özelliği ile *Bacillus subtilis* bakterisiyle koagregasyon özelliği arasındaki ilişki $P<0,05$ düzeyinde, *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* bakterileriyle koagregasyon özelliği arasındaki ilişki $P<0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.
- ✓ Ancak suşlarının otoagregasyon özelliği ile *Bacillus cereus* ve *Salmonella enteritidis* bakterileriyle koagregasyon özelliği arasında bir ilişki bulunamamıştır.
- ✓ Suşlarının EPS üretimleri ile *Bacillus subtilis* ve *Salmonella typhimurium* bakterileriyle koagregasyon özellikleri arasındaki ilişki $P<0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Ancak suşların EPS üretimleri ile *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis* ve *Escherichia coli* bakterileriyle koagregasyon özellikleri arasında bir ilişki bulunamamıştır.
- ✓ Suşlarının EPS üretimleri ile kloroform, etil asetat, ksilen ve toluen kimyasallarına karşı tutunma özelliği arasında bir ilişki bulunamamıştır.
- ✓ Suşlarının otoagregasyon özelliği ile ksilen kimyasalına karşı tutunma özelliği arasında ilişki $P<0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Ancak suşların otoagregasyon özelliği ile kloroform, toluen ve etil asetat kimyasallarına karşı tutunma özelliği arasında bir ilişki bulunamamıştır.

KAYNAKLAR

Aimutis, W.R., “Challenges in developing effective probiotic functional foods, including scientific and regulatory considerations,” ***Bulletin of the IDF***, 363: 30-38 (2001).

Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vascanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Swings, J., Dellaglio, F., “Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses”, ***J. Dairy Research***, 68: 303-316 (2001).

Anonymous, “Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları” , Halkman, A.K., ***Başak Matbaacılık Ltd. Şti.***, Ankara, 243-244, 246, 247, 250, 289, 261, 320, (2005).

Arizcun, C., Barcina, Y., Torre, P., “Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese”, ***Int. J. Food Microbiol.***, 38: 17-24 (1997).

Barbosa, J., Gibbs, P.A., Teixeira, P., “Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal”, ***Food Control***, 21: 651-656 (2010).

Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A., “Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells ve inhibition of enteropathogen-cell interactions”, ***Applied ve Environmental Microbiology***, 59: 4121-4128 (1993).

Bhardwaj, A., Gupta, H., Kapila, S., Kaur, G., Vij, S., Kumar Malik, R., “Safety assessment ve evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro ve in vivo conditions”, ***Int. J. Food Microbiol.***, 141: 156-164 (2010).

Bhardwaj, A., Malik, R.K., Chauhan, P., “Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods”, ***Indian J. Microbiol.***, 48: 317-325 (2008).

Birollo, G.A., Reinheimer, J.A., Vinderola, C.G., “Enterococci vs non- Lactic Acid Microflora as Hygiene Indicators for Swetened Yoghurt”, ***Food Microbiol.***, 18:597-604 (2001).

Boris S., Suarez J.E., Barbes C., “Characterization of the aggregation promiting factor from *Lactobacillus gasseri*, vaginal isolate”, ***J. Appl. Microbiol.***, 83: 413-420 (1997).

Boris S., Suárez J.E., Vázquez F., Barbés C., “Adherence of human vaginal *Lactobacilli* to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens”, ***Infect. Immun.***, 66 (5), 1985-1989, (1998).

Bouzar F., Cerning J., Desmazeaud M., “Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants”, *J. Dairy Sci.*, 79: 205-211 (1996).

Brassart, D., Neeser, J.R., Michetti, P., Sewin, A., “The selection of dairy bacterial strains with probiotic properties based on their adhesion to human intestinal cells”, *Proc. of Lactic Acid, Caen, France*, 19: 201-212 (1994).

Broadbent J. R., McMahon D. J., Ober, C. J. and Welker D. L., “Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese”, *International Dairy Journal*, 11: 433-439 (2001).

Buchanan, R.E, Gibbons, N.E., “Bergey’s manual of determinative bacteriology. Waver’y Press, Inc., Mt. Royal and Guilford Aves. Baltimores, Md., U.S.A., 21202, 1268p 1974.

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

Carrasco de Mendoza, M.S., Scarinci, M.S., Huerto-Garat, H.E., Simonetta, A.C., “Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities”, *Microbiol. Alimentos. Nutr.*, 10: 289-293 (1992).

Castagliuolo LM., Riegler MF., Valenick I., La Mont JT., Pathoulakis C., “*Saccharomyces boulardii*; protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa”, *Infect. Immun.*, 67: 302--307 (1999).

Centeno, J.A., Menendez, S., Rodriguez-Otero, J.L., “Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro cow’s-milk cheese (northwest Spain)”, *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 307-313 (1996).

Champe, P. C., Harvey, R. A., “Biyokimya”, Tokullugil, A., Dirican, M. and Ulukaya, E., *Nobel Tip Kitabevi*, İstanbul, (1997).

Cerning, J., Bouillanne C., London M., Desmazeaud M., “Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria”, *J. Dairy Sci.*, 75: 692-699 (1992).

Cerning J., Renard C.M.G.C., Thibault J.F., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M., Topisirovic L., “Carbon Source Requirement for Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (11), 3914-3919, (1994).

Coconnier, M.H., Klaenhammer, T.R., Kerneis, S., Bernet, M.F., Servin, A.L., “Protein- mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte ve mucus-secreting cell lines in culture”, ***Applied ve Environmental Microbiology***, 58: 2034-2039 (1992).

Collado M.C., Meriluoto, J., Salminen, S., “Development of New Probiotics by Strain Combinations: Is It Possible to Improve the Adhesion to Intestinal Mucus”, ***J. Dairy Sci.***, 90: 2710-2716, (2006).

Collado, M. C., Meriluoto, J., “Adhesion ve aggregation properties of probiotic ve pathogen strains” , ***Eur. Food Res Technol.***, 226: 1065-1073 (2008).

Çakır, İ., “*Lactobacillus* ve *Bifidobacter*lerde bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi”, ***Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi***, Ankara (2003).

Çakır, İ., “Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Gıda mikrobiyolojisi ders notları”, (2003).

Dave, R.I., Shah, N.P., “Viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurts made from commercial starter culture”, ***Int. Dairy Journal***, 7: 31-41 (1997).

Del Re B., Busetto, A., Vignola G., Sgorbati B., Palenzona D.L., “Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain”, ***Lett. Appl. Microbiol.***, 27: 307-310 (1998).

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D., “Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*”, ***Lett. Appl. Microbiol.***, 31: 438-442 (2000).

Demain, A. L., “Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms” , ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, 52: 455-463 (1999).

Devriese, L.A., Ceyssens, K., Rodrigues, M.D., Collins, M.D., “*Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines”, ***FEMS Microbiol. Lett.***, 71: 247-52 (1990).

De Vuyst, L., Foulquie’ Moreno, M.R., Revets, H., “Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins”, ***Int. J. Food Microbiol.***, 84: 299-318 (2003).

Domig, K. J., Mayer, H. K. & Kneifel, W., “Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Phenoand genotypic criteria”, ***International Journal of Food Microbiology***, 88: 165–188 (2003).

Dovat, A.M., Reinbold, G.W., Hammond, E.G., Vedamuthu, E.R., “Lipolytic and proteolytic activity of enterococci and lactic group streptococci isolated from young cheddar cheese”, **J. Milk and Food Technol.**, 33: 365-372 (1970).

Drago L., Gismondo M.R., Lombardi A., Haën C., Gozzini L., “Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin”, **FEMS Microbiol. Lett.**, 153: 455-463, (1997).

Duboc, P., Mollet, B., “Applications of exopolysaccharides in the dairy industry”, **Int. Dairy J.**, 11: 759-768 (2001).

Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O’Mahony, L., O’Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M. M., O’Sullivan, G. C., Shanahan, F., Collins, J. K., “Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials”, **Antonie van Leeuwenhoek**, 76: 279- 292 (1999).

Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., “Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw Ewes’ milk”, **J. Appl. Microbiol.**, 91: 861-870 (2001).

Ekinci F.Y., Barefoot S.F., “Fed-batch enhancement of jensenin G, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii* (jensenii) P 126”, **Food Microbiol.**, 23: 325-330 (2006).

El-Adaway, T. A., “Optimum production, stability, partial purification and inhibitory spectrum of antimicrobial compounds produced by *Pediococcus pentosaceus* D1”, **Nahrung/Food.**, 45: 118-124 (2001).

El Soda, M., “Selection of *Enterococcus faecium* strains for Egyptian cheesemaking” Presentations: **Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects**, European Commission Project FAIR-CT97-3078, 30-31 May 2002, Berlin, Germany (2002).

Erkkilä, S., Petäjä, E., “Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use”, **Meat Science**, 55: 297-300 (2000).

FAO/WHO “Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization”, **Working Group Report**, (2002).

Faye T., Brede D.A., Langsrud T., Nes, I.F., Holo, H., “An antimicrobial peptide is produced by extracellular processing of a protein from *Propionibacterium jensenii*”, **J. Bacteriol.**, 184: 3649-3656 (2002).

Fernández, M.F., Boris, S., Barbès, C., “Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract”, *Journal of Applied Microbiology*, 94: 449-455 (2003).

Fisher, K., Phillips, C., “The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*”, *Microbiology*, 155: 1749-1757 (2009).

Fortina, M.G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P.L., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M.Y., Grohmann, E., “A survey on biotechnological potential ve safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*”, *Int. J. Food Microbiol.*, 123: 204-211 (2008).

Fonden, R., Mogensen, G., Tanaka, R., Salminen, S., “Effect of culture-containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and healt-current knowledge and future perspectives”, *Bulletin of the IDF*, 352: 5-23 (2000).

Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., “The role ve application of enterococci in food ve health”, *Int. J. Food Microbiol.*, 106: 1-24 (2006).

Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzaphel, W.H., “Enterococci in Foods- A Coundrum for Food Safety”, *Int. J. of Food Microbiol.*, 88: 105-122 (2003).

Franz, C.M.A.P., Holzaphel, W.H., Stiles, M.E., “Enterococci at the crossroad of Food Safety”, *Int. J. of Food Microbiol.*, 47: 1-24 (1999).

Franz, C.M.A.P., Specht, I., Haberer, P., Holzapfel, W.H., “Bile salt activity of enterococci isolated from food: screening and quantitative determination”, *J. Food Prot.*, 64: 725-729 (2001).

Fuller, R., “Probiotics in man ve animals”, *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378 (1989).

Gardiner, G.E., Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jagers, P.P., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Stanton, C., “Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese”, *J. Agric. Food Chem.*, 47: 4907-4916 (1999).

Garsse J., Herreilers M., Loveren H. Vos J., “Opperhuizen A., Immunomodulation by probiotics: a literature survey”, *RIVM report 340320001*, Bilthoven, 6-33 (2003).

German, B., Schiffrin, E. J., Reniero, R., Mollet, B., Pfeifer, A., Neeser; J.R., “The development of functional foods: lessons from the gut”, *Tibtech December* 17: 492-499 (1999).

Gibson, G.R., Roberfroid, M., “Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics”, **J. Nutr.**, 125: 1401-1412 (1995).

Gibson, G., “Probiotics: a Growth Industry”, **Dairy Ind. Int.**, 18-20 (2002).

Giraffa, G., Carminati, D., Neviani, E., “Enterococci isolated from dairy products: a review of risks ve potential technological use”, **J. Food Prot.**, 60: 732-738 (1997).

Giraffa, G., Olivari, A.M., Nevianie, E., “Isolation of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* from Italian Cheeses”, **Food Microbiol.**, 17: 671-677 (2000).

Giraffa, G., “Enterococci from Foods”, **FEMS Microbiology Reviews.**, 26:163-171 (2002).

Giraffa, G., “Functionality of Enterococci in Dairy Products”, **Int. J. of Food Microbiol.**, 88: 215- 222 (2003).

Girsmondo, M. R., Dargo, L., Lombardi, A., “Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora”, **Int. J. Antimicro. Agents.**, 12: 287-292 (1999).

Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Zocchetti, A., De Angelis, M., “Production of Crescenza cheese by incorporation of Bifidobacteria”, **J. Dairy Sci.**, 81: 37-47 (1998).

Godfree, A.F., Kay, D., Wyer, M.D., “Faecal *Streptococci* as indicators of faecal contamination in water”, **Soc. Appl. Bacteriol. Sym. Series**, 26: 110-119 (1997).

Godward, G., Sultana, K., Kailasapathy, K., Peiris, P., Arumugaswamy, R., Reynolds, N., “The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods”, **Milchwissenschaft**, 55(8): 441-445 (2000).

Guarner, F., Schaafsma, G.J., “Probiotics”, **Int J Food Microbiol** 39: 237-238 (1998).

Guslandi, M., “Probiotics for Chronic Intestinal Disorders”, **Am. J. Gastroentol.**, 98: 520-521 (2003).

Gürsoy, O., Kınık, Ö., “Peynir üretiminde probiyotik bakterilerin kullanımı: Probiyotik peynir”, **Müh. Bilimleri Derg.**, 12: 105-116 (2006).

Halkman, K., Halkman, Z., “Kaşar peyniri starter kültür kombinasyonları üzerinde bir araştırma”, **Gıda**, 16 (2) : 99-105 (1991).

Halkman, A.K., “Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları”, Anonymous, **Başak Matbaacılık Ltd. Şti.**, Ankara, 243-246 (2005).

Hagrass, A.E., Fayed, E.O., Aly, A.A., el-Samragy, Y.A., "Growth characteristics of enterococci isolated from Laban Rayeb", **Nahrung**, 35: 209-213 (1991).

Hajikhani, R., "Türkiye ve İran'da üretilen beyaz peynirlerden izole edilen *Enterococcus* bakterilerinin probiyotik özelliklerinin araştırılması", Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 97-99-100 (2011).

Hirayama, K., Rafter, J., "The role of probiotic bacteria in cancer prevention", **Microbes and Infections**, 2(6): 681-686 (2000).

Hosono A., Lee J., Amentoni A., Natsume M., Hirayama M., Adachi T., Kaminogawa S., "Characterization of a water-soluble polysaccharides fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis*", **Biosci. Biochem.**, 61: 312-316 (1997).

Huang, Y., Adams, M. C., "In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria", **Int. J. Food Microbiol.**, 91: 253-260 (2004).

Hugas, M., Garria, M., Aymerich, M.T., "Functionality of *Enterococci* in Meat Products", **Int. J. of Food Microbiol.**, 88: 223-233 (2003).

Hwanhlem, N., Watthanasakphuban, N., Riebroy, S., Benjakul, S., H-Kittikun, A., Maneerat, S., "Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria", **Int. J. Food Sci. and Technol.**, 45: 594-601 (2010).

Ishibashi, N., Shimamura, S., "Bifidobacteria: Research and development in Japan", **Food Technology**, 46: 126-135 (1993).

Jacobsen, C.N., Rosenfeldt, N.V., Hayford, A.E., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Pærregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., Jakobsen M., "Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans", **Appl. Environ. Microbiol.**, 65: 4949-4956 (1999).

Jan, G., Leverrier, P., Proudly, I., Roland, N., "Survival and beneficial effects of propionibacteria in the human gut: in vivo and in vitro investigations", **Lait**, 82: 131-144 (2002).

Kabir, A., Aiba, M.A.Y., Takagi, A., Kamiya, S., Mirwa, T., Koga, Y., "Perventation of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model", **Gut**, 41: 49-55 (1997).

Karahan Z.C., Güvener E., "Probiotics", **J. Infect. Dis. Clin. Microbiol.**, 4: 156-162, (1999).

Kaur, I.P., Chopra, K., Saini, A., “Probiotic: potential pharmaceutical applications”, *European Journal of Pharmaceutical Science*, 15: 1-9 (2002).

Kavas, G., Kınık, Ö., “Hayvan beslenmesi ve gıda güvenliği açısından enterokoklar”, *Türk Tarım*, 152: 30-37 (2003).

Kılıç, S., “Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri”, *Ege Üni. Ziraat Fak. Yay.*, 542, İzmir (2001).

Klaenhammer, R.T., Kullen, J.M., “Selection ve design of properties” , *Int. J. of Food Microbiol*, 50: 45-57 (1999).

Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., Witte, W., “Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*”, *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 269- 290 (2003).

Klein, G., “Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of Enterococci from Food and Gastro-Intestinal Tract”, *Int. J. of Food Microbiol.*, 88:123-131 (2003).

Kocatürk U., *Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, Pp: 5, (1991).

Kognoff MF., “Immunology of the intestinal tract”, *Gastroenterology*, 105: 1275-1280 (1993).

Kos, B., Susković, J., Vuković, S., Simpraga, M., Frece, J., Matosić, S., “Adhesion ve aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92”, *J. Appl. Microbiol.*, 94: 981-987 (2003).

Kühn, I., Iversen, A., Möllby, R., “The Phene-Plate System for Studies of Diversity of Enterococcal Populations From The Food Chain and The Enviroment”, *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 189-196 (2003).

Leroy, F., Moreno M.R.F., De Vuyst, L., “*Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriosin producer to be used as a co-culture in food fermentatation”, *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 235- 240 (2003).

Lewenstein, A., Frigerio, G., Moroni, M., “Biological properties of SF 68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases”, *Curr. Therapeutic Res.*, 26: 967-981 (1979).

Lopez-Diaz, T.M., Santos, J.A., Gonzales, C.J., Moreno, B., Garcia, M.L., “Bacteriological quality of a traditional Spanish blue cheese”, *Milchwissenschaft* 50 (9): 503-505 (1995).

Lund, B., Adamson, I., Edlund, C., “Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin”, ***Int. J. Food Microbiol.***, 77: 109-115 (2002).

Mainville, I., Arcand, Y., Farnworth, E., “A dynamic model that stimulates the upper gastro-intestinal tract for the study of probiotics”, ***Int. J. Food Microbiol.***, 99: 287-296 (2005).

Man, J.C., Ragosa, M., Sharpe, M.E., “A medium for the cultivation of *Lactobacilli*”, ***J. Appl. Bact.***, 23: 130-138 (1960).

Marekova, M., Laukova, A., Devuyst, L., Skaugen, M., Nes, I.F., “Partial Characterization of Bacteriocins Produced by Environmental Strain *Enterococcus faecium* EK13”, ***J. Appl. Microbiol.***, 94: 523-530 (2003).

Marteu, P.R., Cellier, C.J., “Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics”, ***Am. J. Clin. Nutr.***, 73: 430-436 (2001).

Masco, L., Crockaert, C., Hoorde, V.K., Swings, J., Huys, G., “In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium*”, ***J. of Dairy Sci.***, 90: 3572-3578 (2007).

Mastromarino, P., Brigidi, P., Macchia, S., Maggi, L., Pirovano, F., Trinchieri, V., Conte, U., Matteuzzi, D., “Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets”, ***J. Appl. Microbiol.***, 93: 884-893 (2002).

Mathieu F., Sudirman I., Rekhif N., “Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc Mesenteroides* Ssp. *Mesenteroides* Fr 52”, ***J. Appl. Bacteriol.***, 74: 372- 379 (1993).

Minelli, E.B., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario, R., Hendriks, H., Dellaglio, F., “Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods”, ***Int. Dairy J.***, 14: 723-736 (2004).

Mishra, V., Prasad, D.N., “Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics”, ***Int. J. Food Microbiol.***, 103: 109-115 (2005).

Moreno, M.R., Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., “Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*”, ***J. Appl. Microbiol.***, 92: 147-157 (2002).

Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N., Topisirovic, L., "Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese", **Int. J. Food Microbiol.**, 122: 162-170 (2008).

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

Ocana, V. S., Pesce, A.A., Holgado, P.R., Nader-Macias, M.E., "Characterization of bacteriosin-like substances produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain", **Appl. Environ. Microbiol.**, 65: 5631-5635 (1999).

Ogier, J.C., Serror, P., "Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus", **Int. J. of Food Microbiol.**, 126: 291-301 (2008).

Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C., "Probiotics: mechanisms and established effects", **Int. Dairy J.**, 9: 43-52 (1999).

Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tölkö, S., Salminen, S., "Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus", **International Journal of Food Microbiology**, 64: 119-126 (2001).

Özer, D., Akın, M.S., "Probiyotik fermente süt ürünleri ve probiyotikler", **VI. Süt ve Süt Ürünleri Senpozyumu(Süt Mikrobiyolojisi ve katkı maddeler)** , 273-278 (2000).

Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S., Kim H.Y., "Probiotics and their fermented food pruducts are beneficial for health", **J.Appl. Microbiol.**, 100 : 1171-1185 (2006).

Pelto, L., Salminen, S.J., Isolauri, E., "*Lactobacillus* GG modulates milk induced immune inflammatory response in milk-hypersensitive adults", **Nutr. Today. Suppl.** 31: 454-455 (1996).

Rea, M.C., Cogan, T.M., "Citrate and pyruvate metabolism in enterococci. Presentations: Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects", **European Commission Project FAIR-CT97-3078**, 30-31 May , Berlin, Germany, (2002).

Rea, M.C., Cogan, T.M., "Glucose prevents citrate metabolism by enterococci", **Int. J. Food Microbiol.**, 88: 201-206 (2003).

Reid G., McGroarty J.A., Angotti A., Cook R.L., "*Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens", **Can. J. Microbiol.**, 34: 344-351 (1988).

Reid G., Jass J., Sebulsky MT., Mc Cormick JK., "Potential uses of probiotics Reid in clinical practice", **Clinic Microbiol. Rev.**, 16 : 658-672 (2003).

Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C., "Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization?", **Vet Microbiol.**, 92: 111-119 (2002).

Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., Ouwehve, A.C., "Interaction between probiotic lactic acid bacteria ve canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization?", **Vet. Microbiol.**, 92 : 111-119 (2003).

Roos , N. M., Katan, M.B., "Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism , and carcinogenesis:a review of papers published between 1988 and 1998", **Am. J . Clin . Nutr.**, 71: 405-11 (2000).

Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E., "Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity", **FEMS Microbiol. Lett.**, 9: 29-33 (1980).

Ross, P.R., Morgan, S., Hill, C., "Preservation and Fermentation: Past, Present and Future", **Int. J. of Food Microbiol.**, 79: 3-16 (2002).

Rossi, E. A., Vendramini, R. C., Carlos, I. Z., Pei, Y. C., DeValdez, G. F., "Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties", **Eur. Food. Res. Technol.**, 209: 305-307 (1999).

Ruas-Madiedo P., De los R.G., "Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria", **J. Dairy Sci.**, 88: 843-856 (2005).

Saaavedra, L., Taranto, M.P., Sesma, F., Valdez, G.F., "Hommade Traditional Cheeses for The Isolation of Probiotic *Enterococcus faecium* Strains", **Int. J. Food Microbiol.**, 88 : 241-245 (2003).

Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J., Mattila-Salholm T., "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties", **J. Biotechnol.**, 84: 197-215 (2000).

Sağlam, Ö. F., "Türk Gıda Mevzuatı", **Semih Ofset**, Ankara (2000).

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., Rowle, I., "Functional Food Science ve Gastrointestinal Physiology ve Function", **British Journal of Nutrition**, 80 : 147-171 (1998).

Salminen, S., Ouwehve, A. C., Isolauri, E., "Probiotics: an overview of beneficial effects" , **Anton Leeuw.**, 82 : 279-289 (2002).

Sarantinopoulos, P., Verighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Coga, T.M., Kalantzopoulos G., Tsakalidou, E., “Biochemical properties of Enterococci relevant to their technological performance”, *Int. Dairy J.*, 11: 621-647 (2001a).

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., “Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 5482-5487 (2001b).

Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leantopoulou, E., Georgalaki M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., Vuyst, L.D., “Bacteriocin Production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in View of Its Application as Adjunct Starter in Greek Feta Cheese Making”, *Int. J. of Food Microbiol.*, 72 : 125-136 (2001c).

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., “Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physiocochemical ve sensory characteristics of Greek Feta cheese”, *Int. J. Food Microbiol.*, 76: 93-105 (2002).

Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W., “Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16: 1-8 (2005).

Schachtsiek M., Hammes W.P., Hertel C., “Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001^T surface protein Cpf Mediating coaggregation with ve aggregation among pathogens”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 : 7078-7085 (2004).

Schleifer, K.H., Klipper-Balz, R., “Transfer of *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. ve *Enterococcus faecium* comb. nov.”, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 31-40 (1984).

Schrezenmeir, J. and de Vrese, M., “Probiotics, prebiotics and synbiotics: Approaching a definiton”, *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 : 361-364 (2001).

Settanni, L., Moschetti, G., “Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits”, *Food Microbiology*, 27: 691-697 (2010).

Shah, N.P., Jelen, P., “Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions”, *J. Food Sci.*, 55: 506-509 (1990).

Shah. N.P., “*Lactobacillus acidophilus* and lactose intolerance: A review”, *ASEAN Food J.*, 9: 47-54 (1994).

Shah, N., “Functional foods from probiotics and prebiotics”, *Food Technology*, 55: 46-53 (2001).

Shihata, A., Shah, N.P., "Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria", *Int. Dairy Journal*, 10: 401-408 (2000).

Sillanpää, J., "Tissue-adherence in lactic acid bacteria identification ve characterization of the collagen- binding S-layer protein of *Lactobacillus crispatus*", *Academic Disseration in General Microbiology*, 1-57 (2001).

Somkuti, G.A., Babel, F.J., "Hydrolytic breakdown of casein by a proteinase of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*", *J. Dairy Sci.*, 52 : 1186-1191 (1969).

Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G., Ross, R.P., "Probiotic Cheese", *Int. Dairy Journal.*, 8 : 491-496 (1998).

Strompfova, V., Laukova, A., Ouwehve, A. C., "Selection of enterococci for potential canine probiotic additives", *Veterinary Microbiol.*, 100: 107-114 (2004).

Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifino, F., Coppola, R., "Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolates from Parmigiano Reggiano cheese", *Fems Microbiol. Lett.*, 244: 129-137 (2005).

Sullivan A., Nord C.E., "The place of probiotics in human intestinal infections", *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 20, 313, (2002).

Svec, P., Vancanneyt, M., Sedlacek, I., Naser, S.M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Swings, J., "*Enterococcus silesiacus* sp. nov. ve *Enterococcus termitis* sp. nov.", *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.*, 56 : 577-581 (2006).

Sveers, M., "Probiotics", *Food Technology*, 53: 67-77 (1999).

Şimşek, O., Çon, A.H., "Laktik asit bakterilerinde ekzopolisakkarit üretimi ve ekzopolisakkaritlerin süt ürünlerindeki fonksiyonları", *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu*, İzmir, 87-94 (2003).

Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., "Bacteriosins of Gram-positive bacteria", *Bacteriol. Rev.*, 40 : 722-756 (1976).

Tanaka, H., Doesburg, K., Wasaki, T., Mierau, I., "Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity", *J. Dairy Sci.*, 82 : 2530-2535 (1999).

Tannock, G.W., "Microbial interference in the gastrointestinal tract", *Asean J. Clin. Sci.*, 2: 2-34 (1981).

Tekinşen, O.C., Atasever, M., "Süt ürünlerinde starter kültür", *Selçuk Üni. Veterinerlik Fak.*, no:150, Konya (1994).

Tsaikalidou, E., Monolopoulou, E., Kabarakis, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K., Kalantzopoulos, G., “The combined use of whole cell protein extracts for the identification and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products”, **Sys. Appl. Microbiol.**, 84: 444-458 (1994).

Vael, C., Goossens, H., “Enterococci as probiotics: Chances and challenges”. Presentations: Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects, European Commission Project FAIR-CT97-3078, 30-31 May 2002, Berlin, Germany (2002).

Valenzuela, A.S., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M.M., Gálvez, A., “Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances”, **Food Microbiol.**, 27: 955-961 (2010).

Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Bjorkroth, K.J., Franz, C.M.A.P., Moreno, M.R.F., Revets, H., Vuyst, L.D., Swings, J., Kersters, K., Dellaglio, F., Holzopfel, W.H., “Intraspecies Genomic Groups in *Enterococcus faecium* and Their Correlation with Origin and Pathogenicity”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 68 : 1381–1391 (2002).

Vandevoorde, L., Christiaens, H. and Verstraete, W., “Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli”, **Journal of Applied Bacteriology**, 72 : 214–219 (1992).

Vasiljevic, T., Shah, N.P., “Probiotics from Metchnikoff to bioactives”, **Int. Dairy J.**, 18 : 714-718 (2008).

Vernazza, C. L., Gibson, G. R., Rastal, R. A., “In vitro fermentation of chitosan derivatives by mixed cultures of human fecal bacteria”, **Carbohydr. Polym.**, 60: 539-545 (2005).

Vuyst, L.D., Moreno, M.R., Revets, H., “Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins”, **Int. J. of Food Microbiol.**, 84: 299-318 (2002).

Walker, D.K., Gilliland, S.E., “Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*”, **J. Dairy Sci.**, 76: 956 (1993).

Welman, D.A., Maddox, I.S., “Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges”, **Trends in Biotechnol.**, 21: 269-274 (2003).

Wendakoon N., Ozimek L., “Inhibition of *H. pylori* growth by *Lactobacillus casei* in fermented milk”, **Milchwissenschaft**, 57 : 506-508 (2002).

Wessels, D., Jooste, P.J., Mostert, J.F., “Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products”, *Int. J. Food Microbiol.*, 10 (3-4) : 349-352 (1990).

Wijaya, A., “Investigation into the influence of a bacteriocin-producing *Enterococcus* strain on the intestinal microflora”, Ph.D Thesis, *University of Karlsruhe, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften*, Germany, (2003).

Wood, B.J.B. and Holzapel, W.H., “The Genera of Lactic Acid Bacteria (The Lactic Acid Bacteria Volume: 2)”, *Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman&Hall, Wester Cleddens Road, Bishopbriggs*, Glasgow G64 2NZ, UK, 398p (1995).

Yıldırım Z., Yıldırım M., “Probiyotik özellik gösteren Bifidobakteriler”, *VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri)*, Tekirdağ, 266-271 (2000).

Yılsay, T.Ö., Kurdal, E., “Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerinde etkisi”, *VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu(Süt Mikrobiyolojisi ve katkı maddeler)* 279-286 (2000).

Yoon, M.Y., Kim, Y.J., Hwang, H.J., “Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product”, *LWT*, 41: 925-933 (2008).

Yücesan, S., “Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri”, *Türk Diyetisyenler Derneği Bülteni*, Sayı: 2, 1-13 (2002).

Zarate G., Pérez Chaia A., González S., Oliver G., “Viability ve β -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric ve intestinal fluids”, *J. Food Protect.*, 63 : 1214-1221 (2000).

Zarate G., Chaia A.P., Oliver G., “Some Characteristics of Practical Relevance of the β -Galactosidase from Potential Probiotic Strains of *Propionibacterium acidipropionici*”, *Anaerobe.*, 8 : 259-267 (2002).

Zarate G., Morata De Ambrosini V. I., Chaia A.P., González N.S., “Some factors affecting the adherence of *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 to intestinal epithelial cells”, *Can. J. Microbiol.*, 48 : 449-457 (2002a).

Zavaglia A.G., Kociubinski G., Pérez P., Disalvo E., Antoni G.D., “Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria”, *J. Appl. Microbiol.*, 93 : 794-799 (2002).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DİŞÇİOĞLU, Gülgün
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 24.01.1988/ANKARA
Medeni hali : Bekar
Telefon : 05327447119
e-mail : gulgun_06@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Kırıkkale Üniversitesi /Biyoloji	2009
Lise	Özel Bilim Lisesi	2005

Yabancı Dil

İngilizce