



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORTA TOROSLAR YÖRESİNDE ÜRETİLEN
TULUM PEYNİRLERİNDEN İZOLE EDİLEN
ENTEROCOCCUS FAECIUM VE
ENTEROCOCCUS FAECALIS SUŞLARININ
PROBİYOTİK POTANSİYELLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Nusiba Alsiddig BADAWI BABEKER

DOKTORA TEZİ

Şubat -2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Nusiba Alsiddig BADAWI BABEKER tarafından hazırlanan “**ORTA TOROSLAR YÖRESİNDE ÜRETİLEN TULUM PEYNİRLERİNDEN İZOLE EDİLEN ENTEROCOCCUS FAECIUM VE ENTEROCOCCUS FAECALIS SUŞLARININ PROBİYOTİK POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışması 14/02/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Nihat AKIN

Danışman

Prof. Dr. Nihat AKIN

Üye

Prof. Dr. Mehmet AKBULUT

Üye

Doç. Dr. Durmuş SERT

Üye

Doç. Dr. Sultan ARSLAN TONTUL

Üye

Dr. Öğr. Üy. Hale İnci ÖZTÜRK

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Sait GEZGİN
FBE Müdürü

Bu tez çalışması **BAP** tarafından **20211017** nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Nusiba Alsiddig BADAWI BABEKER

Şubat - 2022

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ORTA TOROSLAR YÖRESİNDE ÜRETİLEN TULUM PEYNİRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS FAECIUM* VE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* SUŞLARININ PROBİYOTİK POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Nusiba Alsiddig BADAWI BABEKER

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nihat AKIN

2022, 92 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Nihat AKIN

Prof. Dr. Mehmet AKBULUT

Doç. Dr. Durmuş SERT

Doç. Dr. Sultan ARSLAN TONTUL

Dr. Öğr. Üy. Hale İnci ÖZTÜRK

Bu tez çalışmasında çeşitli tulum peynirlerinden izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* türlerinden toplam 13 adet suşun probiyotik ve teknolojik özellikleri araştırılmıştır. *Ent. faecium* ve *Ent. faecalis* izolatlarının probiyotik potansiyelleri, gastrointestinal direnç (safra tuzu ve simüle mide asidi toleransı), yapışma yeteneği (oto-agregasyon ve hücre yüzeyi hidrofobisitesi), fonksiyonel özellikler (antibakteriyel aktivite, β -galaktosidaz aktivitesi, ekzopolisakkarit üretimi ve kolesterol uzaklaştırma) ve güvenlik testleri (hemolitik aktivite, antibiyotik direnci, biyojen amin üretimi ve bazı virülans faktörlerinin PCR tespiti) ile karakterize edilmiştir. Bu çalışmada, 13 suşun tümü, safra tuzuna karşı ve 11 suşun ise pH 3 değerinde simüle mide ortamına dirençli olduğu kanıtlanmıştır. 656 ve 28 izolatları dışında tüm *Ent. faecium* izolatlarının, vankomisine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak izolatların çoğunun yüksek ekzopolisakkarit (123.01 ± 1.33 ve 456.82 ± 3.19 $\mu\text{g} / \text{ml}$ arasında) üretme kapasitesine sahip olduğu ve 270 kodlu suşun ise kolesterol inhibisyon yeteneğinin yüksek olduğu (41.67 ± 0) tespit edilmiştir. Ayrıca, tüm *Ent. faecium* ve *Ent. faecalis* izolatları, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 25923'e karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Daha sonra izolatları, agregasyon maddesi (asa1), sitolizin (CylLL, CylLS, CylM, CylB, CylA), jelatinaz (gelE) ve hyaluronidaz (hylefm) için kodlayan yokluk veya varlık virülans genleri açısından incelenmiştir. 436 izolatı için gelE ve CylA ve 28 izolatı için gelE dahil olmak üzere iki ve bir virülans determinantı barındırdığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, tüm izolatlar arasında 436 ve 28 kodlu örneklerin umut verici probiyotik özellikler ve bazı parametrelerle ilgili olarak iyi güvenlik özellikleri gösterdiği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus*, Probiyotik, Güvenlik, Teknolojik.

ABSTRACT

Ph.D THESIS

DETERMINATION OF PROBIOTIC POTENTIALS OF *ENTEROCOCCUS FAECIUM* AND *ENTEROCOCCUS FAECALIS* STRAINS ISOLATED FROM TULUM CHEESE MANUFACTURED IN THE CENTRAL TAURUS REGION

Nusiba Alsiddig BADAWI BABEKER

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES OF
SELCUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN FOOD ENGINEERING

Advisor: Prof. Dr. Nihat AKIN

2022, 92Pages

Jury

Prof. Dr. Nihat AKIN

Prof. Dr. Mehmet AKBULUT

Doç. Dr. Durmuş SERT

Doç. Dr. Sultan ARSLAN TONTUL

Dr. Öğr. Üy. Hale İnci ÖZTÜRK

In this thesis, the probiotic and technological properties of 13 strains of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from various Tulum cheeses were investigated. *Ent. faecium* and *Ent. faecalis* isolates, gastrointestinal resistance (bile salt and simulated gastric acid tolerance), adhesion ability (auto-aggregation and cell surface hydrophobicity), functional properties (antibacterial activity, β -galactosidase activity, exopolysaccharide production and cholesterol removal) and safety tests (hemolytic activity, antibiotic resistance, biogenic amine production and PCR detection of some virulence factors). In this study, all 13 strains proved resistant to bile salt and 11 strains were resistant to simulated gastric environment at pH 3. All *Ent. faecium* isolates were found to be sensitive to vancomycin. In addition, most of the isolates were found to have high exopolysaccharide production capacity (between 123.01 ± 1.33 and 456.82 ± 3.19 $\mu\text{g/ml}$) and the 270-coded strain had a high cholesterol inhibition ability (41.67 ± 0). Also, all *Ent. faecium* and *Ent. faecalis* isolates showed antibacterial activity against *Staph. aureus* ATCC 25923 and *L. monocytogenes* ATCC 7644. The isolates were then examined for absence or presence virulence genes encoding for aggregation agent (*asa1*), cytolysin (*CylLL*, *CylLS*, *CylM*, *CylB*, *CylA*), gelatinase (*gelE*), and hyaluronidase (*hylefm*). contained two virulence determinants, including *gelE*, for the isolate. In conclusion, it was evaluated that among all isolates, samples coded 436 and 28 showed promising probiotic properties and good safety properties regarding some parameters.

Keywords: *Enterococcus*, Probiotic, Safety, Technologic.

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında; bilgi, yardım, inanç ve anlayışını benden esirgemeyen, hayalimi gerçek kılmamda rehberim olan ve bu tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde bana yol gösteren, her daim desteğini hissettiğim ve kendisinden daha çok şey öğreneceğime inandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Nihat AKIN'a,

Bu süreçte gösterdikleri destek ve yardımlardan dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet AKBULUT ve Doç. Dr. Durmuş SERT'e

Bu süreçte manevi desteğini gösteren ve her konu da bana yardımcı olan değerli hocam Mehtap AKIN'a, bilgi ve tecrübelerini çalışmamın her aşamasında sunan Arş. Gör. Dr. Talha DEMİRCİ'ye ve Gıda Mühendisi Dr. Edibe Rabia ÖZKAN'a,

Bana hayallerimin peşinden gitmeyi öğretten ve bu yolda ilerlerken benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan sevgili anneme, babama, dayıma ve teyzeme, her konuda destek olan kardeşlerime ve arkadaşlarıma, maddi ve manevi büyük desteğini benden esirgemeyen değerli eşim Tilal ELMAHI'YE,

Laboratuvar çalışması sırasında yardımlarını esirgemeyen Gıda Mühendisi Merve GÜLAÇAN, Meryem Kübra SATILMIŞ ve Merve ÇALMAZ'a, Gıda Mühendisliği Bölümündeki diğer kıymetli hocalarıma ve bu süreçte desteklerini esirgemeyen Konya'da yükseköğrenimlerini sürdüren Sudanlı öğrencilere, bana bu eğitim fırsatını sağlayan Türkiye Burslarına, Bilimsel Araştırma Projelerine (BAP) ve Türkiye Cumhuriyeti Devleti'ne en içten teşekkürlerimi sunarım.

Nusiba Alsiddig BADAWI BABEKER

KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Tulum Peyniri	3
2.2. Laktik Asit Bakterileri Sınıflandırılması (Taksonomisi)	3
2.3. <i>Enterococcus</i> Bakterileri	4
2.4. Probiyotik Bakteriler	6
2.6. <i>Enterococcus</i> Probiyotik Karakterizasyonunda Kullanılan Özellikler	8
2.6.1. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Gastrointestinal Sistemde Canlılığı	8
2.6.1.1. Lizozim toleransı	8
2.6.1.2. Safra tuzuna ve sit toleransı	9
2.6.2. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Adhezyon Yeteneği	10
2.6.2.1. Otoagregasyon	10
2.6.2.2. Hücre yüzeyi hidrofobisitesi	11
2.6.3. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Fonksiyonel Özellikleri	12
2.6.3.1. Serum kolesterolünün Düşürülmesi	12
2.6.3.2. β -galaktosidaz	12
2.6.3.3. Antimikrobiyal aktivite (Enterosin üretimi)	13
2.6.3.4. Ekzopolisakkarit üretimi (EPS)	14
2.6.4. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Güvenlik Özellikleri	15
2.6.4.1. Antibiyotik direnci	15
2.6.4.2. Virülans genleri	15
2.6.4.3. Hemolitik aktivite	17
2.6.4.4. Biyojen amin	18
2.7. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Teknolojik Özellikleri	19
2.7.1. Farklı sıcaklıklarda gelişme	19
2.7.2. Farklı alkol konsantrasyonlarında gelişme	19
2.7.3. Dondurmaya dayanıklılık	20
2.7.4. Tuz toleransı	21
2.7.5. Hidrojen peroksida (H_2O_2) dayanıklılık	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1 Materyal	22
3.2. Analiz Yöntemleri	23
3.2.1. Lizozime dayanıklılık	23
3.2.2. Safra tuzuna dayanıklılık	23
3.2.3. Asit toleransı	23

3.2.4. Mide ve bağırsak özsuyuna dayanıklılık	24
3.2.5 Hidrofobisite	24
3.2.6. Otoagregasyon	25
3.2.7. Antibakteriyel aktivite	25
3.2.8. Bakteriyosin üretimi	26
3.2.9. β -galaktozidaz aktivitesi	26
3.2.10. Serum kolesterol düşürülmesi.....	27
3.2.11. Ekzopolisakkarit üretimi	28
3.2.12. Antibiyotik direnci	29
3.2.13. Hemolitik aktivite	29
3.2.14. Biyojen amin üretimi	30
3.2.15. Virülans genlerin saptanması	30
3.2.16. Sıcaklık toleransı	31
3.2.17. Alkole toleransı	31
3.2.18. Tuz toleransı.....	32
3.2.19. Hidrojen peroksit (H_2O_2) toleransı	32
3.2.20. Dondurma sıcaklığına toleransı	32
3.3. İstatistiksel Analizi	32
3.4. Temel Bileşenler Analizi (PCA)	33

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....34

4.1. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerin Değerlendirilmesi	34
4.1.1. <i>Enterococcus</i> suşlarının lizozim toleransı	35
4.1.2. <i>Enterococcus</i> suşlarının asit toleransı	36
4.1.3. <i>Enterococcus</i> suşlarının safra tuzuna toleransı	37
4.1.4. <i>Enterococcus</i> suşlarının <i>in vitro</i> şartlarda mide ve pankreas özsuyun dayanımı	38
4.1.5. <i>Enterococcus</i> suşlarının Hidrofobisite özellikleri.....	39
4.1.6. <i>Enterococcus</i> suşlarının otoagregasyon yeteneği.....	40
4.2. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Fonksiyonel Özelliklerin Değerlendirilmesi	41
4.2.1. <i>Enterococcus</i> suşlarının antibakteriyel özellikleri	41
4.2.2. <i>Enterococcus</i> suşlarının bakteriyosin üretimi	43
4.2.3. <i>Enterococcus</i> suşlarının β -galaktozidaz aktivite	44
4.2.4. <i>Enterococcus</i> suşlarının kolesterol asimilasyonu	44
4.2.5. <i>Enterococcus</i> suşlarının ekzopolisakkarit (EPS) üretimi	45
4.3. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Güvenlik Özelliklerin Değerlendirilmesi	46
4.3.1. <i>Enterococcus</i> suşlarının antibiyotik direnci	47
4.3.2. <i>Enterococcus</i> suşlarının hemolitik aktivite	50
4.3.3. <i>Enterococcus</i> suşlarının biyojen amin üretimi	51
4.3.4. <i>Enterococcus</i> suşlarının virülans faktörleri	53
4.4. <i>Enterococcus</i> Bakterilerinin Teknolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi	56
4.4.1. <i>Enterococcus</i> suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişim potansitelleri	56
4.4.2. <i>Enterococcus</i> suşlarının alkole konsantrasyonlarında gelişimi	57
4.4.3. <i>Enterococcus</i> suşlarının NaCl konsantrasyonlarında gelişim sonuçları.....	58
4.4.4. <i>Enterococcus</i> suşlarının farklı H_2O_2 Konsantrasyonlarında gelişimi.....	59
4.4.5. Dondurmaya Dayanıklılık testine ait sonuçlar	60
4.5. PCA Analizi Ait Sonuçlar ve Tartışma	61
4.5.1. Probiyotik özellikleri	61

4.5.2. Fonksiyonel özellikleri.....	64
4.5.3. Teknolojik özellikleri.....	66
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	69
5.1 Sonuçlar	69
5.2 Öneriler	73
KAYNAKLAR	74
EKLER.....	85



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μL	:	Mikrolitre
μm	:	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	:	Santigrat derece
CaCl_2	:	Kalsiyum klorür
Da	:	Dalton
dk	:	Dakika
g	:	Gram
g	:	Dakida dönüş hızı
H_2SO_4	:	Sülfirik asit
HCl	:	Hidroklorik asit
KCl	:	Potasyum klorür
KH_2PO_4	:	Potasyum dihidrojen fosfat
KOH	:	Potasyum hidroksit
L	:	Litre
M	:	Molar
mg	:	Miligram
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	:	Magnezyum sülfat heptahidrat
mL	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
N	:	Normal
Na	:	Sodyum
Na_2CO_3	:	Sodyum karbonat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	:	Di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat
NaCl	:	Sodyum klorür
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	:	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	:	Sodyum dihidrojen fosfat heptahidrat
NaHCO_3	:	Sodyum bikarbonat
NaOH	:	Sodyum hidroksit
nm	:	Nanometre
s	:	Saat
sn	:	Saniye
α	:	Alfa
β	:	Beta
γ	:	Gama
H_2O_2	:	Hidrojen peroksit

Kısaltmalar

AM	:	Amfisilin
B.	:	<i>Bacillus</i>
BA	:	Biyojen Amin
bç	:	Baz çifti
BHI	:	Brain Heart Infusion
BLAST	:	Basic local alignment search tool(s)
C	:	Kloramfenikol
CN	:	Gentamisin
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
E	:	Eritromisin
E.	:	<i>Escherichia</i>
EFSA	:	Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu
Ent.	:	<i>Enterococcus</i>
EPS	:	Ekzopolisakkarit
FAO	:	Gıda ve Tarım Örgütü
FTS	:	Fosfat tampon solüsyonu
GI	:	Gastrointestinal
GRAS	:	Genel olarak güvenli kabul edilen (Generally Recognized as Safe)
K	:	Kanamisin
kob	:	Koloni oluşturan birim
L.	:	<i>Listeria</i>
LAB	:	Laktik asit bakterisi
Lb.	:	<i>Lactobacillus</i>
MRS	:	de Man Rogosa Sharpe
MU	:	Miller unit
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
OD	:	Optik yoğunluk
onpg	:	o-nitrofenil- β -D-galaktozit
P	:	Penisilin
PCR	:	Polymerase chain reaction
QPS	:	Nitelikli Güvenlik Varsayımı (Qualified Presumption of Safety)
RNA	:	Ribo nükleik asit
rpm	:	Dakika devir sayısı (revolutions per minute)
S	:	Streptomisin
S.	:	<i>Streptococcus</i>
Salm.	:	<i>Salmonella</i>
SCFA	:	Kısa zincir yağ asidi (Short Chain Fatty Acid)
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
spp	:	Türler
Staph.	:	<i>Staphylococcus</i>
TCA	:	Triklorasetik asit
TE	:	Tetrasiklin
VA	:	Vankomisin
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Probiyotikler, yeterli miktarlarda alındığında bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek konakçı hücreye fayda sağlayan yararlı mikroorganizmalardır. Bu tür bakteriler insan bağırsağında bir koloni oluşturarak zararlı mikroorganizmalarla rekabet ederler. Probiyotiklerin olumlu etkileri 1900'ler başından beri, Metchnikoff'un yaptığı çalışmalar tarafından bilinmektedir. Metchnikoff, Kafkas toplumlarının uzun yaşam süresini ve sağlıklı olmasını fermente ürünler ve bu ürünlerde bulunan probiyotiklere bağlamıştır (Dogan ve Ozpınar, 2017). Mide özsuyu ve safra asidine karşı direnç, oto- ve ko-aggregasyon yetenekleri, virülans gen içermemesi ve patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite, probiyotik seçimi için önemli kriterler olarak kabul edilmektedir (Ankaiah ve ark., 2017).

Probiyotik bakterilerin canlılığı ve aktivitesi, gıdaların raf ömrü sırasında ve midenin asidik koşullarından geçiş sırasında hayatta kalması için önemlidir. Potansiyel olarak probiyotik olmaları için, bakterilerin ayrıca ince bağırsakta hidrolitik enzimler ve safra tuzları tarafından inaktivasyona dirençli olması gerekmektedir (Pieniz ve ark., 2014). Probiyotikler, kolondaki sindirilemeyen oligosakkarit diyet liflerini kısa zincirli yağ asitlerine fermente edebilir ve böylece kolon kanserini önleyebilir. Probiyotikler, laktozu fermente ederek laktoz sindirimine katkıda bulunurlar, Ig A üretimini ayarlayarak bağışıklığı artırır ve antijenleri parçalayarak bağırsakların emilimini engeller bundan dolayı alerjinin azalmasına neden olur. Probiyotiklerin fermente gıda ve gıda tamamlayıcı olarak tanıtılması halk sağlığı için önemlidir (Polewski ve ark., 2016). Gıdalarda en fazla kullanılan probiyotik bakteri türleri *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'dur. Ancak son yıllarda *Enterococcus* türleri sergiledikleri farklı probiyotik etkiler ile ön plana çıkmaktadır.

Enterokoklar çevre, gıda ve klinik mikrobiyolojide önemli rol oynayan Gram-pozitif, katalaz negatif, kok-şekilli, fakültatif anaerob ve spor üretmeyen laktik asit bakterileridir (LAB). Enterokoklar ayrıca, fermente gıdalarda doğal olarak bulunmakta veya stater kültür olarak sonradan ilave edilmektedir. *Enterococcus* cinsinin çeşitli suşları, gıda ürünlerinde lezzet bileşikleri geliştirmede ve raf ömrünü uzatmada, insanlarda ve hayvanlarda bağırsak mikrobiyal dengesini iyileştirmede ve gastroenterit tedavisinde önemli roller oynamaktadır (Khalkhali ve Mojgani, 2017).

Enterococcus türleri, sıkça bulunan bakteriler olup fermente süt, et ve sebze ürünlerinde gelişebilmektedir. *Enterococcus* türleri bakteriyosin üretmekte ve probiyotik özellik taşıyabilmektedir. Ayrıca, Enterococci farklı organik asit ve aromatik uçucu bileşik üretme yeteneğine sahip olduklarından fermente gıda ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır.

Tüm bunlara ilaveten *Enterococcus* türleri biyoaktif bileşikler ve vitaminler üreterek gıdaların yapı ve besin değerine katkıda bulunurlar. *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* ve *Enterococcus faecalis*, gıda fermente ürünlerinde bulunabilen en yaygın *Enterococcus* türleridir (Nascimento ve ark., 2019).

Enterokoklar, proteolitik ve lipolitik aktiviteleri, sitrat metabolizması, probiyotik özellikleri ve bakteriyosin üretimi nedeniyle gıda ve süt endüstrisinde önemli olan LAB arasındadır. Ayrıca, *Ent. faecium*'un insanlarda meydana gelen ishalin tedavisinde probiyotik olarak kullanılmasının, antibiyotik tedavisine bir alternatif olduğu düşünülmektedir. *Ent. faecium*'un bir başka probiyotik etkisi ise, kolesterolün emilimini sınırlandırmasıdır (Yerlikaya ve ark., 2020).

Enterococcus türleri bir çok fermente gıda ürününe doğal halde bulunmaktadır. Bu gıdalardan birisi de tulum peyniridir. Tulum peyniri, beyaz veya krem renkte, yüksek yağ içeriğine, gevrek ve yarı sert dokuya sahip oldukça aromatik bir peynir türüdür. Tulum adı, Türkçede "keçi veya koyun derisi torbası" anlamına gelmekte olup bu ismi peynirin paketlenmesi ve olgunlaştırması için kullanılan torbadan almaktadır. Genel olarak 2 çeşit Tulum peyniri vardır. Bunlardan birincisi Türkiye'nin batı bölgelerinde üretilen İzmir salamura tulumdur. İkincisi ise çoğunlukla Türkiye'nin doğu bölgelerinde üretilen Erzincan Savak tulumudur. Keçi derisi torbaları koyun derisinden daha sağlam olup gözenekli yapıları sayesinde peynire su ve hava geçirgenliği sağlamaktadır. Günümüzde, tulum peynirini olgunlaştırmak için sertleştirilmiş plastik variller kullanılmaktadır (Hayaloglu ve ark., 2007).

Geleneksel süt ürünleri yıllardır kullanılmakta olup potansiyel olarak probiyotik bakterilerin ana kaynağıdır. Geleneksel gıda üretim ve tüketiminin Türkiye'de hala yaygın olduğu, endüstriyel kullanımda probiyotik mikroorganizmalar için önemli bir kaynak olarak görülmektedir. Bu doktora tez çalışmasında, farklı yörelerden toplanan geleneksel deri tulum peynirlerinden izole edilen ve moleküler yöntemlerle tanımlanan *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* suşlarının probiyotik özelliklerinin, starter potansiyellerinin ve kritik virülans faktörlerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Tulum Peyniri

Tulum peyniri, Türkiye'de en yaygın peynirlerinden birisidir. Türkiye'de en popüler peynir çeşitleri beyaz, kaşar ve tulum, olmakla beraber 50'den fazla peynir çeşidi bulunmaktadır (Tuncer, 2009). Tulum peynir, beyaz veya krem renkli yüksek yağ içerikli, gevrek ve yarı sert dokulu ve keskin tada sahip bir peynir çeşididir. Geleneksel tulum peyniri genellikle çiğ koyun sütünden üretilmekte ve keçi derisi torbalarda (tulumlarda) veya plastik kaplarda 150 gün olgunlaştırılmaktadır. Geleneksel peynirlerin özellikleri hayvan ırkından, peynir üretiminde kullanılan teknolojiye ve çiğ sütün fiziko-kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinden önemli ölçüde etkilenmektedir (Hayaloglu ve ark., 2007).

2.2. Laktik Asit Bakterileri Sınıflandırılması (Taksonomisi)

Laktik asit bakterileri (LAB) kavramı, 1900'lü yılların başında gelişmiş ve 19. yüzyılın son dönemlerinde bilimsel ve teknik gelişmelere bir grup organizma öncülük etmiştir. LAB, tipik olarak insan gastrointestinal sistemi ile ilişkili en önemli probiyotik mikroorganizmalar arasındadır.

Geleneksel olarak, laktik asit bakterilerinin morfolojisi, glikoz mayalanma modu, farklı sıcaklıklarda gelişme, laktik asit çeşitli karbonhidratların fermentasyonu gibi fenotipik özelliklere göre sınıflandırılmıştır (Olasupo ve ark., 2001).

LAB; gram pozitif, katalaz negatif, çiğ sütün doğal mikrobiyotası olarak oluşan bakterilerdir (Aspri ve ark., 2017). Süt bazlı ürünlerde gelişim yeteneği yüksek LAB, organik asitler, hidrojen peroksit, antifungal peptidler ve bakteriyosinler gibi çeşitli antimikrobiyallerin üretimi yoluyla gıda fermentasyon işlemlerinde ve gıdaların korunmasında önemli rol oynamaktadır (Quigley ve ark., 2013). LAB önceden birçok probiyotik süt ürünlerinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, son çalışmalarda, GI sisteminin aşırı koşullarına direnç (midede düşük pH, sindirim enzimleri, safra tuzları), bağırsak mukozasına yapışma, bağırsakta uzun süreli ve sabit kalıcılık, antimikrobiyal aktivite ve immünomodülatör özelliklerine karşı bir direnç aracı olarak probiyotik potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. Düşük pH, yüksek etanol konsantrasyonu gibi faktörlere karşı direnç, geleneksel probiyotiklere ait diğer bakteri gruplarına yapısal ve işlevsel benzerliği ile birlikte, LAB'yi insan sağlığı üzerinde faydalı etkiler gösterecek potansiyel aday probiyotiklere

dönüştürür (García-Ruiz ve ark., 2014). LAB, sert koşullara karşı dayanma yeteneklerinden dolayı insan mide asidi ve safra tuzları koşullarında stabil mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır. Ayrıca *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp ve *Listeria monocytogenes* gibi birçok patojenik bakteriye karşı bakteriyosinler gibi antimikrobiyal bileşikler üretmektedir (Bin Masalam ve ark., 2018). En önemli LAB cinsleri *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Bifidobacterium*' dur. Ayrıca LAB arasında probiyotik olarak yaygın kullanılan cinsler *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* olmakla birlikte *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Enterococcus* spp gibi diğer LAB ve bazı maya türleri de probiyotik olarak kullanılmaktadır (Garcia-Ruiz ve ark., 2014). LAB, yüksek endüstriyel ilgiye yol açan çeşitli gıda ürünlerinin fermantasyon işlemlerinde yer almaktadır. Bu laktik asit bakterileri, ilk asitleştirmeyi gerçekleştirmekten ve fermente ürünlerin viskozitesine, aroma gelişimine, proteolizine ve lipolizine katkıda bulunmaktan sorumludur. Bununla birlikte LAB gıdaların asitlik değerini yükselterek gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmaktadır (Mercha ve ark., 2020).

2.3. *Enterococcus* Bakterileri

'Entérocoque' terimi ilk olarak Jouhaud (1899) tarafından bir bağırsak Gram-pozitif diplokok grubunu adlandırmak için kullanılmıştır. Aynı yıl MacCallum ve Hastings (1899), *Micrococcus zymogenes*'i bir akut endo kardit vakasından tanımlamıştır. İzole edilen türler gram pozitif, çift ve kısa zincirler halinde dizilmiş uzamış koklar oluşturan, ısıya ve antiseptiklere karşı toleranslı kültürler olup aylarca hayatta kalabilmektedir. Gram pozitif koklar, 1980'lere kadar streptokok olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Devriese ve ark. (1993) Devriese ve Pot (1995) ve Schleifer ve Kilpper-Bälz (1984), tarafından *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Enterococcus* cinsleri olarak yeniden sınıflandırılmıştır. *Enterococcus* cinsini oluşturmaya yönelik ilk girişim Thiercelin ve Jouhaud (1903), tarafından gerçekleşmiş; ancak bu öneri genel olarak kabul edilmemiştir. Birkaç yıl sonra, Andrewes ve Horder (1906), *Enterococci* kısa zincir oluşturma yeteneklerine dayanarak *Streptococcus faecalis* olarak yeniden adlandırmıştır. Daha sonra enterokoklar, *Streptococcus* cinsi içinde barındırılmış bir alt grup olarak muamele görmüştür. *Enterococcus* spp. temsil eden bakteriler, doğada yaygın olarak bulunur ve genellikle kuşların gastrointestinal kanallarında ve ayrıca hayvansal ve kentsel kanalizasyon ile gübrelenmiş topraklarda bulunmaktadır. İnsanların ve hayvanların gastrointestinal sisteminde ve aynı zamanda çeşitli diğer habitatlarda bulunabilen fekal streptokoklar, yeni *Enterococcus* cinsinde gruplandırılmıştır. Şu anda, 16S rRNA gen benzerliği temelinde yedi tür grubuna giren 37 *Enterococcus* suş geçerli olarak

olduğu belirtilmelidir. Ayrıca bazı enterokoklarda bu faktörlerin varlığının aktif virülansı mı temsil ettiği yoksa sadece belirli ortamlarla eski ilişkilerinin bir sonucu olarak ortaya çıkan konakçı-adaptif fonksiyonların evrimini mi yansıttığı henüz kesin değildir (Cámara ve ark., 2020).

2.4. Probiyotik Bakteriler

"Probiyotik" kelimesi, Yunanca "yaşam için" anlamına gelmektedir. Probiyotikler, patojen olmayan ve yeterli miktarlarda alındıklarında konakçıya yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2002; Ozyurt ve Ötles, 2014; Shah, 2007). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* dahil olmak üzere farklı bakteri türleri probiyotik olarak sınıflandırılmaktadır. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait türler, süt ürünleri üretiminde uzun ve güvenli bir geçmişe sahiptir ve ayrıca gastrointestinal mikrobiyotik bir parçası olarak bulunmaktadır (Ashraf ve Shah, 2014). Probiyotikler doğrudan infantil diyare (bebekte ishal), antibiyotik ilaçlarından kaynaklanan diyare, tekrarlayan *Clostridium difficile* kolit, *Helicobacter pylori* enfeksiyonları, inflamatuvar (iltihabı) bağırsak hastalığı ve kadın üro-genital enfeksiyonları gibi rahatsızlıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır (Reid ve ark., 2003). Bu bakterilerin probiyotik etkileri ise patojenlerin baskılanması, alerjik tepkinin hafifletilmesi, kolon kanserinin önlenmesi, bağışıklık tepkisinin modülasyonu ve kolesterol asimilasyonudur (Nueno-Palop ve Narbad, 2011). Probiyotiklerin sağlığa faydalı bu etkileri, organik asit, diasetil, asetoin, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi çok çeşitli antimikrobiyal metabolitleri sayesinde ortaya çıkmaktadır (Murry ve ark., 2004). Bu aktiviteler, patojen mikroorganizmaların büyümesini ve gelişimini engellediğinden mikrobiyolojik güvenliğe katkıda bulunmaktadır (Osuntoki ve Korie, 2010; Pyar ve Peh, 2014).

Probiyotikler, genellikle fermente gıda üretiminde kullanılmakta, gıda dışında ise tıbbi ve veterinerlik faaliyetlerinde uygulanmaktadır. Yoğurt, peynir ve fermente süt ürünleri starter probiyotik kaynaklarıdır. Laktozun fermentasyonu ile üretilen laktik asit, pH değerini düşürerek yoğurdun ekşi tadına katkıda bulunur ve süt proteinlerine etki ederek karakteristik dokunun oluşmasını sağlamaktadır. Geleneksel süt ürünleri, yerliler tarafından uzun zamandır kullanılmaktadır ve potansiyel olarak probiyotik bakterilerin ana kaynağıdır (Prabhurajeshwar ve Chandrakanth, 2019). Probiyotiklerin diğer faydalı etkileri arasında laktoz intoleransının iyileştirilmesi, yüksek serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi, besin maddelerinin kullanımının artırılması ve antibiyotik kullanımının azaltılması yer almaktadır (Guo ve ark.,

2010). Genel olarak, sağlık faydasının sergilenmesi için ml veya g gıda başına günlük 6- 7 log probiyotik bakteri önerilmiştir (Lhteinen ve ark., 2010).

Fonksiyonel gıdalar olarak da adlandırılan probiyotik içeren gıda ürünleri, antihipertansiyon, antikanser, hipoglisemik özellikler, antioksidan ve immünomodülatör etkiler dahil olmak üzere birkaç iyileştirici (terapötik) faydaya sahiptir (Clare ve Swaisgood, 2000; Khan, 2014). Bu nedenle, sağlığı geliştiren faydaları olan yeni probiyotik suşların izole edilmesi tıbbi ve endüstriyel açıdan önem taşımaktadır (Khan, 2014). Probiyotik olarak kullanılan bir bakteri suşunun temel özelliklerinden bazıları safra tuzlarında hayatta kalma, gastrik direnç ve konak bağırsak hücrelerine bağlılıktır (Dunne ve ark., 2001). Probiyotik iyi bir suş seçme kriterleri birkaç yazar tarafından kapsamlı bir şekilde listelenmiştir. Suşlar tercihen insan kaynaklı olmalı, Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilen (GRAS) statüsüne sahip olmalı ve gastrointestinal (GI) yol boyunca hayatta kalabilmelidir. Suşların insan bağırsak hücrelerine yapışması da faydalı bir özellik olarak kabul edilmektedir. Probiyotik suşlar ayrıca arzu edilen antibiyotik direncine ve duyarlılık modellerine sahip olmalı, potansiyel olarak patojenik mikroorganizmalara karşı antagonistik olmalı ve konakcının iyiliği için faydalı metabolik aktivitelere sahip olmalıdır. Probiyotik bağlamında immnostimlasyon, antimitajenite ve antikanserojeniteden de bahsedilmektedir. Diyete ek olarak kullanılması amaçlanan bir mikrobiyal suş, doğal olarak iyi teknolojik özelliklere de sahip olmalıdır.

Bir suşun bağırsak mukusuna tutunma yeteneği, probiyotiklerin gastrointestinal kanalda kalma süresini uzatabilir ve konakyı etkileyebilir, probiyotiklerin karşılaması gereken gereksinimlerden birinin, geniş spektrumlu antibiyotiklere dirençli olmaları gerektiği bilinmektedir. Bu nedenle, umut verici olan probiyotik suşun istenen özelliğinin güvenlik değerlendirmesi için antibiyotik duyarlılık testi dahil edilmeli, patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermesi gerekmektedir (Osmanagaoglu ve ark., 2010).

Suşların otoagregasyon yeteneği bakteri hücrelerinin bağırsak epiteline yapışması için bir ön koşul olduğu belirtilir, patojenlerle coagregasyon yetenekleri, epitelin zararlı bakteriler tarafından kolonizasyonunu önlemekte ve etkili bariyerin oluşturulmasını sağlamaktadır.

Enterokokların virülans faktörleri, suşların patojenitesinde rol oynaması, konak dokuların kolonizasyonu ve invazyonu ile ilgili faktörlerin yanı sıra spesifik ve spesifik olmayan konak savunma mekanizmalarına karşı direnci içermektedir. Ayrıca, bu tür öldürücü suşlar, ya doğrudan toksin üretimi ile ya da dolaylı olarak iltihaplanma yoluyla patolojik değişiklikler üretmelidir (Franz ve ark., 2011).

Günümüzde kullanılan probiyotik suşların çoğu, laktobasil veya bifidobakterilere aittir. Buna karşın Enterokoklar ise çok daha az oranda probiyotik olarak kullanılmaktadır. Ancak tıbbi ve gıda mikrobiyolojisi açısından, *Ent. faecium* ve *Ent. faecalis* en önemli enterokok suşlarıdır. Her iki suşda insan kullanımı için onay verilen tek enterokok suşları olma özelliği taşımaktadır.

Gıda fermentasyonu için stater kültür seçilirken dikkat edilecek en önemli husus bu kültürlerin virülans faktörlerinden arındırılması ve herhangi bir antibiyotiğe direnç göstermemesidir (Vogel ve ark., 2002). *Enterococcus* klasik bir gıda kaynaklı patojen olarak görülmemekle birlikte, bazı peynirlerin ve sosislerin olgunlaştırılmasında bir probiyotik starter kültür olarak kullanıldığı belirlenmiştir (Franz ve ark., 2011; Hammad ve ark., 2015; Moreno, 2006).

Bazı yayınlar *Enterococcus* spp'nin bazı olgunlaşmış peynirlerde olgunlaşmış veya fermente gıda ürünlerinde starter kültür olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Hammad ve ark., 2015; Martín-Platero ve ark., 2009; Serio ve ark., 2007).

Enterococcus bakterileri, yüksek sıcaklıklar, düşük pH ve yüksek tuzluluk gibi sert koşullara yüksek toleranslarından dolayı geleneksel peynirlerin üretiminde kullanılmaktadır. *Ent. faecium*, *Ent. faecalis* ve *Ent. durans* suşlarının, peynirin olgunlaştırılması sırasında proteoliz, lipoliz ve sitrat parçalanması yoluyla arzu edilen tat ve aromanın ortaya çıkmasını sağladıkları bilinmektedir. Çalışmaların çoğu, *Enterococcus* izolatlarının ve zeytin, sosis ve peynir gibi fermente gıdaların duyuşal özelliklerinin gelişiminde önemli bir rol oynadığını belirtmektedir.

2.6. *Enterococcus* Bakterilerinin Probiyotik Karakterizasyonunda Kullanılan Özellikler

2.6.1. *Enterococcus* Bakterilerinin Gastrointestinal Sistemde canlılığı

2.6.1.1. Lizozim toleransı

Potansiyel probiyotik adaylarının seçimine yönelik uygulanan ilk test adımı, GI sistemin aşırı koşullarına dayanımıdır. Tüketilen probiyotik mikroorganizmaların aşması gereken ilk bariyer, insan tükürüğünde yüksek konsantrasyonda bulunan lizozim enzimidir. Lizozim direnci, hücrenin fizyolojik durumunda hücre duvarındaki peptidoglikan yapıya ve ortamdaki lizozim yapısına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (García-Ruiz ve ark., 2014).

Yapılan çalışmalarda *Enterococcus* hücrelerinin lizozim enzimine karşı olağanüstü bir direnç kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Enterokokların bu direnci diğer bakteri türleri gibi lizozim direncine dahil olan iki ana mekanizmada karakterize edilmiştir. İlk mekanizma,

NAM kalıntılarının C-6 hidroksil parçası üzerinde meydana gelen O asetilasyonu veya N-asetilglukozamin kalıntılarının deasetilasyonu yoluyla PG omurga yapısının modifikasyonu ile ilgilidir. İkinci mekanizma ise koruyucu işlevi olan lizozim inhibitörlerinin üretimine dayanmaktadır (Hebert ve ark., 2007).

2.6.1.2. Safra tuzuna ve asit tolerans

Probiyotiklerin gastrointestinal (mide-bağırsak) sistemde canlı kalabilme özelliği, probiyotiklerin en çok arzu edilen özelliklerinden biridir. Probiyotiklerin, kolondan peristaltik hareketler ile ayrılmasını önlemek için bağırsak mukozasına tutunması gerekmektedir (Nami ve ark., 2019). Potansiyel probiyotik suşlarının seçimine yönelik ilk adım, gastrointestinal sistemin sert koşullarına karşı dirençlerini değerlendirmektir. İnsan tükürüğünde bulunan yüksek konsantrasyonda lizozim aşılması gereken ilk engeldir ; sonra midede düşük pH ve sindirim enzimleri (örnek pepsin) ; ve bağırsakta safra asitleri aşılması gerekmektedir (Garcia-Ruiz ve ark., 2014). Probiyotik bakterilerin gastrointestinal sistemde, canlı kalması, konakçı üzerinde faydalı etki gösterme kabiliyetini değerlendirmek için önemli bir özelliktir (Jeronymo-Ceneviva ve ark., 2014).

Asit ve safra toleransı, probiyotik suşların seçiminde kullanılan önemli kriterlerden bazılarıdır. Probiyotikler ilk olarak sert gastrointestinal koşullarla karşılaştığından, bu aşırı asidik koşullar ve yüksek konsantrasyonlarda safra tuzları altında hayatta kalabilmeleri gerekir. Çoğu *in vitro* denemeleri, 2.0-3.0 arasında düşük pH değerlerinde (Chandran ve ark., 2013; Kaushik ve ark., 2009) ve % 0.3 safra konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir. Probiyotik bakteriler ayrıca spesifik yapışma proteinleri (40-200 kDa) üreterek mukus ve epitel hücrelerine yapışma için bağırsak mikroorganizmaları ile rekabet eder. Mukoza tabakasına yapışma, özellikle bağırsağın alt kısmında uzun ömürlü probiyotik hücrelerin çoğalması için de önemlidir (Chandran ve ark., 2013).

İzolatların yüksek asidik koşullar altında hayatta kalma ve insan bağırsağındaki safra tuzlarına karşı kabul edilebilir tolerans gösterme yeteneği, bir suşun probiyotik olarak kabul edilebilmesi için iki temel özelliktir (Ayyash ve ark., 2018). Safra tuzu, probiyotiklerin hücre zarının yapısına zarar verdiğinden safra tuzunu tolerans bağırsakta hayatta kalabilmek için önemli bir faktördür (Rajoka ve ark., 2018). Çeşitli stres faktörleri arasında, probiyotiklerin canlılığını en fazla etkileyen pH ve safra tuzlarıdır. Bu nedenle, *in vitro* çalışmalarda probiyotik potansiyel taraması için asit ve safra tuzları tolerans testleri yaygın olarak uygulanmaktadır. Genel olarak Enterokok suşları, safra tuzu koşulları altında iyi gelişme kabiliyetine sahiptir. Enterokok suşlarının safra tuzu koşulları altında gelişebilme yetenekleri,

daha önce önerildiği gibi safra tuzu hidrolaz aktiviteleri ile ilişkilendirilebilir (Ispirli ve ark., 2017). Zoumpopoulou ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada, beş izolatın ortam pH 3'e maruz kaldıktan sonra asitliğe karşı yüksek tolerans sergilediğini ve ayrıca safra tuzlarına karşı toleranslı olduğunu göstermiştir.

Probiyotik olarak kabul edilecek aday, yüksek asidik koşullar altında canlı kalabilmeli ve midede 2-3 saatlik geçiş sırasında yüksek bakteri popülasyonunu koruyabilmelidir. Asidik ortamın H⁺ iyonu konsantrasyonu bakterilerin hücre duvarı ve izolatların metabolizmaları üzerinden negatif etki göstermektedir (Ayyash ve ark., 2018). Asit direnci ve safra toleransı artık potansiyel probiyotik suşların taranması için temel kriterler olarak kabul edilmektedir. LAB suşları, canlı bakteri sayımlarında büyük düşüşler olmaksızın yüksek asitli taşıyıcı gıdalarda daha uzun süre hayatta kalmaktadır (Ren ve ark., 2014). *Enterococcus* bakterileri farklı pH içeriğine sahip gıdalarda canlılıklarını koruyabilmektedir. *Enterococcus* bakterileri yüzyıllar boyunca çeşitli fermente süt ve et ürünlerinin mikroflorasında yer almış ve peynir ürünlerinin olgunlaşmasında proteoliz, lipoliz ve diasetil üretimi nedeniyle aromalarının geliştirilmesinde önemli rol oynamıştır (dos Santos ve ark., 2015).

2.6.2. *Enterococcus* Bakterilerinin Adhezyon Yeteneği

Hücre adhezyon yeteneği, bakteri hücre zarı ve epitel yüzeyler arasındaki teması içeren karmaşık bir süreçtir. Epitel hücrelere ve mukozal yüzeylere yapışma yeteneğinin, probiyotik olarak kullanılan birçok bakteri suşunun önemli bir özelliği olduğu öne sürülmüştür. Birkaç araştırmacı, bağırsak epitel hücrelerine ve mukusa bakteriyel yapışma ile ilgili etkileşimin bileşimi, yapısı ve kuvvetleri hakkında araştırmalar bildirmiştir (Collado ve ark., 2008). Hücre agregasyon özellikleri, potansiyel bir probiyotik suşun en önemli fenotipik özelliklerinden birini temsil eder. Zommiti ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada, “Dried Ossban”dan izole edilen enterokok suşlarının agregasyon yetenekleri değerlendirildi. Sonuçlar, elde edilen otoagregasyon değerlerinin %50 ile %96 arasında değiştiğini göstermiştir.

2.6.2.1. Otoagregasyon

Otoagregasyon, biyofilm oluşumu için bir ön koşuldur ve bağırsak epitel hücrelerine yapışma ile ilişkilidir. Bu olay enfeksiyona karşı bir konakçıya savunma mekanizması oluşturur ve patojenin mukoz tabakaya yapışmasını sınırlandırmaktadır. LAB'nin patojenlerle birlikte agregasyon yeteneği, patojen mikroorganizmaların bağırsağa kolonizasyonunu önleyen etkili bir bariyer oluşturmaktadır. İnsan bağırsağında probiyotiklerin gelişimi,

gastrointestinal sistemdeki bakteriyel dengeyi arttırmaktadır (Taheur ve ark., 2016). Ayrıca, Rastogi ve ark. (2020), yapıları çalışmada, test edilen her iki izolatın otoagregasyon oranı, 4 saatlik inkübasyon sonrasında, % 48'den fazla olduğu için iyi yapışma kabiliyetleri göstermiştir. Otoagregasyon veya intra-agregasyon özelliği önemli hücre yüzeyi özelliği olup insan GIT'inde probiyotik bakterilerin yapışması ve kolonizasyonuna yardımcı olmaktadır. Maldonado ve ark. (2012), tarafından yapılan çalışmada, bazı izolatların aynı tür olmasına rağmen, aynı derecede otoagregasyon sergilememiş, dolayısıyla bu özelliğin aynı türün suşları arasında farklı olduğu kanıtlanmıştır.

2.6.2.2. Hücre yüzeyi hidrofobisitesi

Mikroorganizmaların bağırsak epitel hücrelerine yapışmasında çeşitli mekanizmalar yer almaktadır. Mikroorganizmaların en dıştaki yüzeyinin hidrofobik doğası, bakterilerin konakçı dokuya bağlılığında rol oynamaktadır.

Hücre yüzeyi hidrofobisitesi, mikrobiyal hücreler ve konakçıları arasında spesifik olmayan bir etkileşimdir. İlk etkileşim zayıf ve genellikle geri dönüşümlüdür. Hidrokarbonlara yapışma, otoagregasyon ve pıhtılaşma mekanizmalarıyla ilişkilerindeki rollerini anlamak için bakteriyel hücre duvarı bileşimlerini ve özelliklerini belirlemek ve karakterize etmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (Collado ve ark., 2008).

Hidrofobisite yapışmaya yardımcı olmakla birlikte güçlü agregasyon için bir ön koşul değildir. Hidrofobisite genetik olarak yakından ilişkili türler arasında ve hatta aynı suşun türleri arasında değişiklik göstermektedir (Schär-Zammaretti ve Ubbink, 2003). Yüksek hidrofobisiteye sahip bakteri hücreleri genellikle mukozal hücrelerle güçlü etkileşimler gösterir. Beyaz peynirden izole edilen *Ent. faecium* için %7,92 ile %10,23 arasında hidrofobisite değerleri tespit edilmiştir (Favaro ve ark., 2014).

Bir suşun epitel hücrelerine yapışabilme yeteneğini tahmin etmenin bir yolu olarak hekzadekan yaygın olarak kullanılmaktadır (Kiely ve Olson, 2000). Probiyotik suşlar genellikle, konakçı bağırsağında doğal olarak varlığı ve bakteri hücre yüzeyinin hidrofobikliği, epitel hücreleri adhezyon kapasitesi, agregasyon yeteneği ve safra tuzlarına tolerans olan maddelerin varlığı (örn. polisakkaritler, lektinler) gibi çeşitli faydalı özellikleri temelinde seçilir. Probiyotik suşların otoagregasyonu, bağırsak epitel hücrelerine yapışmaları için gerekli görünmekte ve patojenik mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonu önleyen bir bariyer oluşturmaktadır (Aslim ve ark., 2007). Hücre yüzeyi hidrofobisitesi, probiyotik bakterilerinin önemli hücre yüzeyi özelliklerinden birisi olup gastrointestinal konakçı hücrelerle probiyotik yapışmasını ve etkileşimini etkilemektedir (Xu

ve ark., 2009). Bu nedenle, daha yüksek hidrofobisite, probiyotiklerin epitel hücrelerine yapışma kabiliyetini ve sağlık yararlarını artırmasıyla sonuçlanmıştır.

2.6.3. *Enterococcus* Bakterilerinin Fonksiyonel Özellikleri

2.6.3.1. Serum kolesterolünün düşürülmesi

Uygun bakteri suşları ile fermente edilmiş süt ürünlerinin kan kolesterol konsantrasyonlarını düşürmesi ve böylece Koroner Kalp Hastalığı (CHD) riskini azalttığı yönünde çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bununla birlikte, kullanılan bakteri suşları safraya toleranslı olmalı, safra asitlerini dekonjuge etme ve kolesterolü bağlama yeteneğine sahip olmalıdır. Bu kriterler karşılanırsa, fermente süt ürünleri yüksek kolesterol konsantrasyonlarını düşürmede 'fonksiyonel' gıdalar olarak görülebilmektedir. Probiyotiklerin kolesterol düşürücü etkisi için önerilen bir dizi mekanizma olduğundan söz edilmiştir. Bunlar, safra tuzlarının safra tuzu hidrolaz (BSH) ile dekonjugasyonu, kolesterolün bakteri hücre zarlarına asimilasyonu, probiyotiklerin büyümesi sırasında kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA'lar) üretimi gibi probiyotikler tarafından kolesterolün uzaklaştırılması için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Safra asitlerinin bağırsak bakterileri tarafından dekonjugasyonu, bunların atılma oranlarını arttırmaktadır. Bu nedenle karaciğer tarafından safra asitlerinin sentezi için daha yüksek kolesterol yıkımı gerekmekte ve dolayısı ile serum kolesterolünde bir azalma olmaktadır.

Yüksek serum kolesterol seviyelerinin genellikle kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklarda önemli bir faktör olduğuna inanılmaktadır. Serum kolesterolünün düşürülmesi için güvenli ve daha etkili alternatif yollar aranmaktadır. Çünkü kolesterolü düşürmek için kullanılan ilaçların bazı yan etkileri mevcuttur. Önceki çalışmalar *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium* suşlarını içeren fermente gıdaların tüketimi, insanlarda kan kolesterol konsantrasyonlarının düşürülmesine yardımcı olabileceğini doğrulamıştır. Ancak kesin mekanizmalar hakkında araştırmalara ihtiyaç vardır (Ren ve ark., 2014).

2.6.3.2. β -galaktosidaz

β -galaktosidaz, laktozu, glukoza ve galaktoza hidrolize eden faydalı bir enzimdir. Enzimler arasında en önemlisi, laktoz sindirimine yardımcı olan ve tersine ürünlerin substrat ile oligomerizasyonunu sağlayan β -galaktosidazdır. Bu, laktoz intoleransı hastaları için geliştirilen gıdalarda kullanılmaktadır (Hussain ve ark., 2008). Öte yandan, β -galaktosidaz üreten kültürler ile fermente edilen ürünler, laktoz intoleransının tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (Vasiljevic ve Jelen, 2001). Mikroorganizmaların sütte laktozu fermente etme

yeteneği, süt endüstrisinde potansiyel uygulamaları olan laktik asit bakterilerinin önemli bir teknolojik özelliğidir. Süt ve süt türevlerine tat, doku ve besin değerı kazandıran laktozun hidrolizi β -D-galaktosidaz (EC 3.2.1.23) ve/veya fosfo- β -D-galaktosidaz (EC 3.2.1.85) enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Teknolojik önemlerine ek olarak, hem saf enzimler hem de onları içeren canlı mikroorganizmalar, laktoz intoleransı gibi bağırsak rahatsızlıklarını hafifletmek için kullanılmıştır. Bu durum dünya çapında yetişkin popülasyonda görülür ve laktozun intra-intestinal hidrolizi ve kolon mikrobiyotasının modülasyonu için bir β -galaktosidaz kaynağı olarak başta laktobasiller ve/veya bifidobakteriler olmak üzere mikroorganizmaların süt ürünlerine dahil edilmesiyle başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir. β -galaktosidaz aktivitesi, süt endüstrisinde uygulama ile probiyotikler veya LAB için faydalı bir özelliktir (dos Santos ve ark., 2015).

2.6.3.3. Antimikrobiyal aktivite (Enterosin retimi)

Seçilen probiyotik türünün potansiyel patojenik bakterilerin gelişmesini nleme yeteneğine sahip olması gerektiğinden antimikrobiyal aktivite özellikle probiyotikler için önemlidir (Fijan, 2016).

LAB'nin bazı suşları, farklı antimikrobiyal bileşiklerin üretimi nedeniyle fermente ürünlerin güvenliğini ve kalitesini arttırmakta ve patojenik ve bozulma bakterilerinin gelişmesini engellemektedir. LAB'nin antimikrobiyal metabolitleri arasında organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil ve ayrıca ilave metabolitler bakteriyosin adı verilen küçük proteinler veya peptitler bulunmaktadır. Bakteriyosinler, diğer bakterilere yönelik genel bakterisidal aktivitelere sahip ribozomal olarak sentezlenmiş antimikrobiyal proteinlerdir (Ahmadova, 2013).

Enterosinler, enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler olup gıdalarda bozulmaya yol açan veya patojen bakterilere karşı aktiviteleri nedeniyle önemli bir potansiyele sahiptir (Glvez ve ark., 1998; Hugas ve ark., 2003; Leroy ve ark., 2003). Bu nedenle, gıda fermantasyonu sırasında enterosinlerin ya gıda katkı maddeleri olarak ya da ek bir starter kültür ile yerinde üretim yoluyla uygulanmaktadır (Aymerich ve ark., 2000; G Giraffa ve ark., 2000). Nisin, LAB'de tanımlanan ilk antibakteriyel polipeptittir (Rogers, 1928). Nisin'in yanı sıra *Pediococcus acidilactici* H ve *L. plantarum* WHE tarafından üretilen pediocin AcH (Bhunia ve ark., 1987) ve *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* (Ennahar ve Deschamps, 2000) tarafından üretilen enterosinler gibi, diğer bakteriyosinler (García ve ark., 2004), ticari uygulamalarda potansiyel kullanım açısından değerlendirilmiştir. Enterosinlerin, gıdaların raf ömrünü uzatan ve bakterilerin çoğalmasını engelleyen doğal katkı

maddeleri olarak kullanılması üzerine odaklanmıştır (Ben Braiek ve ark., 2017). Enterokoklar peynirler, sosisler ve fermente et gibi çeşitli fermente teknolojilerde yardımcı/starter kültürler olarak uygulanır (Jaouani ve ark., 2015).

2.6.3.4. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

Polisakkaritler hayatımızdaki en önemli biyolojik polimerlerden biridir. Bu biyopolimerlerin birçok yaşamsal biyolojik fonksiyonu vardır. Bu polimerler, enerji depolama maddesi olarak kullanılmakta ve bakteriler de olmak üzere canlı organizmaların hücre duvarı maddesinin ana bileşenlerinden biridir. Algler, archaea, funguslar, mayalar ve bakteriler gibi birçok ökaryotik ve prokaryotik organizma polisakkarit üretme yeteneğine sahiptir. Son dönemlerde, EPS'lerin bağışıklık sistemini uyarabileceği veya modüle edebileceğini, antitümör, antiviral, anti-inflamatuvar ve antioksidan ajanlar olarak rol oynayabileceğini gösteren raporlar bulunmaktadır. LAB tarafından üretilen EPS, yoğurt, peynir ve ekmek gibi gıda ürünlerinin reolojik, dokusal ve duyuşal özelliklerini geliştirmek için gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca süt ürünlerinde gelişmiş bir tat algısını modüle ederek formülasyonda yağ ikamesi olarak kullanılabilirler (Dertli, 2013).

Probiyotik suşlar tarafından üretilen EPS, birçok probiyotiğin yüzeyinde bulunan mikrobiyal polisakkaritler olarak hücre dışı salgılanmaktadır. EPS'nin kapsüler yapısının probiyotik suşları olumsuz ortamlardan koruduğu bildirilmiştir. Örneğin EPS, antibakteriyel bileşenlere, bakteriyofaj saldırısına ve fagositoza karşı koruyucu bir ajan görevi görmektedir. Ayrıca, EPS üretme kabiliyeti yüksek probiyotik suşların yüksek asit ve safra toleransı sergilediği tespit edilmiştir (Ren ve ark., 2014).

EPS, mikroorganizmalarda çözünen maddelerin taşınmasına katılabilen iyonlarla etkileşimler yoluyla hücrelere sayısız hayatta kalma avantajı sunan, böylece adsorpsiyon ve değiş tokuşta rol oynayan hücre dışı şeker polimerleridir. Gıdada kullanılacak EPS güvenilirliği tescil edilmiş LAB tarafından üretilmek zorundadır. Süt ürünleri üretiminde kullanılacak starter LAB'nin EPS üretmesi bir ön koşuldur (Mercha ve ark., 2020). Ayrıca bazı çalışmalarda, EPS üretebilen LAB izolatlarının otoagregasyon kapasitelerinin yüksek olduğu ve böylelikle gastrointestinal sistemin mukozal yüzeylerinde daha kolay tutunabildiği bildirilmiştir (Kansandee ve ark., 2019).

2.6.4. *Enterococcus* Bakterilerinin Güvenlik Özellikleri

2.6.4.1. Enterokokların antibiyotik direnci

LAB'nin antibiyotik direnci hakkında bilgiler hala sınırlıdır ve bu grubun heterojenliği nedeniyle direnç profillerini değerlendirmek zordur. Basbulbul ve ark. (2015), bulgularında *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella*, *Enterococcus* cinsine ait LAB suşlarının genellikle tetrasiklin ve kloramfenikol gibi klinik antibiyotiklere dirençli olduğunu göstermektedir.

Antibiyotik direnci *Enterococcus* türlerinin gıda ürünlerinde kullanım için güvenlik değerlendirmesinde esas bir konudur. Plazmidlerde ve transpozonlarda bulunan kazanılmış direnç esas endişe kaynağıdır (Giorgio Giraffa, 2002). Ayrıca, bazı antibiyotiklere karşı direnç gösteriler ki bu durum gıdalardan izole edilen *Enterococcus* suşları arasında yaygın olarak bulunan bir özelliktir (Franz ve ark., 2003).

Fermente gıdalarda enterokokların uygulanması, genellikle konjugatif plazmidlerinde veya genetik değişime eğilimli transpozonlarında bulunan bu bakterilerinin genetik belirleyicilerinin olası yayılmasından dolayı endişe yaratmaktadır (Hasman ve ark., 2005; Zanella ve ark., 2006). *Ent. faecalis* için antibiyotik dirençli genleri elde etme ve aktarma kabiliyeti nedeniyle multi- direnç daha yaygın olarak bildirilmiştir (Çitak ve ark., 2004; McBride ve ark., 2007). Ayrıca Gomes ve ark. (2008), *Ent. faecalis* için antibiyotik direnci görülme sıklığının *Ent. faecium* izolatlarına göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir.

Basbulbul ve ark. (2015), çalışmalarında izole edilen *Enterococcus faecium* suşlarının farklı antibiyotiklere dirençli olduğunu tespit etmiştir. Bozadan izole edilmiş *Ent. faecium* GL-21 eritromisine (32 ug / ml) ve kloramfenikole direnç göstermiş fakat erm (A), erm (B), erm (C) veya cat genlerinin hiçbirini tespit edilmemiştir. Dört *Ent. faecium* suşundan ikisi, tetrasikline dirençli olan GL-83 ve GL-89 ve tet (M) genini taşımaktadır. Temmerman ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada, farklı probiyotik ürünlerinden toplam 29 *Ent. faecium* suşu izole etmiş ve izolatlarda tetrasiklin (izolatların %24'ü), eritromisin (izolatların %97'si) ve kloramfenikole (izolatların %34'ü) karşı antibiyotik direnci tespit etmişlerdir. Türk beyaz peynir örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinin 13 antibiyotiğe direnci Çitak ve ark. (2004) tarafından incelenmiş ve *Ent. faecium* izolatlarının %96'sının eritromisine %76'sının kloramfenikole ve %44'nünün ise tetrasikline karşı dirençli olduğu belirtilmiştir.

2.6.4.2. *Enterococcus* bakterilerinin virülans faktörleri

Virülans faktörleri bazı enterokok suşlarında genetik olarak kodlanan, spesifik ve spesifik olmayan savunma mekanizmalarına karşı direnç sağlayan ve memeli dokularında patojenik etki gösteren faktörlerdir. Sonuç olarak, virülans faktörleri bakterilerin “fırsatçı

patojenler” olarak hareket etmesini sağlar. Agregasyon maddesi, enterokok yüzey proteini, sitolizin, yapışma gibi çeşitli virülans faktörleri enterokok için bildirilmiştir (Omar ve ark., 2004).

Virülans belirleyici faktörleri araştırmalar temelinde risk değerlendirmesiyle ilgili bir sorun, patojenik potansiyel için belirleyici olabilen virülans faktörünün türü ve kombinasyonları ile ilgili bilginin sınırlı olmasıdır. Çeşitli enfeksiyon aşamaları (kolonizasyon/bağlanma, translokasyon, bağışıklık tepkisi ve patolojik değişikliklerin indüklenmesi) ile ilişkili çoklu virülans faktörlerine sahip olan suşların, tek bir virülans faktörlerine sahip suşlardan daha tehlikeli olduğu iddia edilmiştir. Antimikrobiyal direnç genlerini veya virülans faktörlerini kodlayan genlerin gastrointestinal sistemdeki probiyotik suşlara aktarılabileceği önemli bir konudur (Franz ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda Enterokoklarda birçok virülans geni ve onların fonksiyonları tanımlanmıştır. Enterokoklarda tanımlanan ilk virülans faktörü, translasyon sonrası modifiye edilmiş bir protein-toksin olan sitolizindir. Belirli kan eritrositlerinde β -hemolitik reaksiyona neden olan ve ayrıca çok çeşitli bakterilere karşı bakterisidal aktiviteye sahip olan *cylL_LL_SMBAI* operonu tarafından kodlanır. *CylL_L* ve *cylL_S* genleri, sitolizin yapısal alt birimlerini kodlar ve geri kalan genler, translasyon sonrası modifikasyonlar (*cylM*), taşıma (*cylB*), aktivasyon (*cylA*) ve kendini koruma (*cylI*) ile ilgili proteinleri kodlar. Konak dokulara yapışma, enfeksiyon sürecinde çok önemli bir adım olduğundan, adezinlerin kolonizasyonun kurulması ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynaması beklenir. Birkaç adezin enterokokal patojenite ile ilişkilendirilmiştir. Enterokokal yüzey proteini (*Esp*, *esp* geni tarafından kodlanır), idrar yolunda kolonizasyona ve kalıcılığa katkıda bulunan yüksek moleküler ağırlıklı bir hücre dışı yüzey proteinidir ve *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium* türlerinin artan virülansı ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. *EfaA_{fs}* ve *EfaA_{fm}*, endokardit hastalarının serumunda tespit edilen yapışkan benzeri *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium* antijenleridir (Carlos ve ark., 2010).

Kim ve ark. (2020), yaptıkları çalışma sonuçlarına göre çeşitli Kore gıdalarında yedi *Enterococcus* suşu ve bu her bir suşta virülansla ilişkili beş gen tespit etmişlerdir. Bu sonuç, gıdalardaki *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium* dışındaki *Enterococcus* cinsine ait türlerin potansiyel bir gıda kaynaklı patojen olabileceği fikrini desteklemektedir. Ancak, gıda kaynaklı virülans belirleyicilerini barındıran *Enterococcus* spp’nin insanlarda patojenite varlıkları doğrudan çalışılmamıştır. Bu nedenle, virülans belirleyicilere sahip gıda kaynaklı *Enterococcus* türlerinin çok türünü mümkün olduğunca izole etmek ve gıda kaynaklı *Enterococcus* spp potansiyel tehlikenin büyüklüğü hakkında fikirbirliğine varılması için gerçek patojenikliklerini hem *in vitro* hem de *in vivo* doğrulamak için deneyler yapmak çok

önemlidir. *Ent. faecium* ve *Ent. faecalis*, gıda ve yemlerde probiyotik içeren starter veya koruma kültürleri olarak uygulanır. Güvenlik yönleri, antibiyotik direncinin ve özellikle direncin aktarılabilirliğinin (örneğin glikopeptidler için) dikkatli bir şekilde incelenmesini içermelidir. Son zamanlarda, vankomisine dirençli enterokoklar, nozokomiyal enfeksiyonların sık bir nedeni olarak ortaya çıkmıştır (Mundy ve ark., 2000). Agregasyon maddesi proteini, jelatinaz, sitolizin, enterokok yüzey proteinleri, hiyalüronidaz gibi virülans faktörleri ve endokardit antijenleri enterokoklarda tanımlanmıştır (Martin-Platero ve ark., 2009; Vankerckhoven ve ark., 2004).

Enterokoklar birçok nozokomiyal enfeksiyonuna ve bakteriyemi (kanda bakteri oluşması) ve idrar yolu enfeksiyonları gibi hastalıklara neden olan insanlar için fırsatçı patojenler olarak kabul edilir (Aran ve ark., 2015). Bu nedenle, starter kültür veya probiyotik olarak kullanılabilecek bu bakterilerin güvenlik yönünü değerlendirmek gerekir. Bu değerlendirmenin amacı, agregasyon maddesi, sitolizin ve jelatinaz gibi potansiyel virülans faktörlerinin olmadığını kanıtlamaktır (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2016; Morandi ve ark., 2013).

Enterococcus suşlarının güvenliği geçerli bir endişe kaynağıdır. Bir yandan *Enterococcus* suşlarının açık yararlı, sağlığı geliştirici etkileri tanımlanmıştır ve bazı probiyotik suşların uzun bir güvenli kullanım geçmişi vardır. Öte yandan *Enterococcus* fırsatçı patojenler olduğu ve hastane enfeksiyonlarının yaygın bir nedeni olduğu bilinmektedir. Ayrıca, antibiyotik dirençleri, hatta çoğu zaman çoklu antibiyotik dirençleri taşımakta ve bunlar belirli durumlarda aktarılabilir genetik elementler tarafından kodlanmaktadır. Bu zararlı özellikler, enterokokların probiyotik olarak güvenli uygulamaları için geçerli endişeler doğurmaktadır (Franz ve ark., 2011). *Enterococcus* spp, virülans genleri taşıyabilmekte ve bunları gıda ürünlerinde ifade ederek tüketiciler için tehlike oluşturmaktadır. LAB, ayrıca farklı antibiyotiklere direnç gösterebilir ve bu özellik ile ilgili genleri taşıyarak virülans potansiyellerini arttırmaktadır (Perin ve ark., 2014).

2.6.4.3. Hemolitik aktivite

Potansiyel insan sağlığı uygulamaları için, bir aday antimikrobiyal bileşiğin insan hücrelerini benzer zararlı bir şekilde etkileyip etkilemediğinin açıklığa kavuşturulması gerekmektedir. Hemoliz, bakterilerin kan hücrelerini parçalama yeteneğini temsil etmektedir. Hemolizin, virülans artışında ve bunun sonucunda enfeksiyon olasılığının artmasında önemli bir rol oynamaktadır (ZommitiBouffartigues ve ark., 2018). Bazı bileşikler, örneğin kuaterner amin bileşikler, antimikrobiyal oldukları gibi ayrıca sitotoksiktir. Buna göre, memeli

hücreleri üzerinde bakteri hücrelerine yönelik özgünlüklerinin bir ilk testi olarak polimerlerin kırmızı kan hücrelerini parçalama (hemoliz) kabiliyetini de test etmiştir. Hemoliz adı verilen bu test, bu tür polimerlerin toksisitesini değerlendirmek için standart bir uygulamadır. Ayrıca, polimerlerin kırmızı kan hücrelerinin birikmesine (hemagglütinasyon) neden olma eğilimini de değerlendirilmiştir (Locock ve ark., 2013). Bir suşun, gıda endüstrisinde kullanılması için konakçı sağlığı için faydalı olarak nitelendirilmesinden önce güvenlik açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. Hemolitik aktivitenin olmaması ve antibiyotik direnci, güvenli probiyotik suşların seçimi için temel gerekliliklerdir (Oh ve Jung, 2015).

2.6.4.4. Biyojen amin

Biyojen aminler (BA), çeşitli gıdalarda bulunmakta ve esas olarak amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonu ile üretilmektedir. BA, amino asit dekarboksilaz aktivitesine sahip mikroorganizmaların aktivitesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. (Agüero ve ark., 2020). BA, olgunlaştırılmış peynir gibi fermente gıdalarda yüksek düzeyde bulunduğu toksik bileşikler ve potansiyel sağlık risk faktörleri olarak kabul edilir (Perez ve ark., 2019). BA farklı gıda türlerinde görülmekte ancak genellikle fermantasyon sonucunda ortaya çıkmaktadır (Aspri ve ark., 2017). İnsan organizmasındaki fizyolojik rollerine rağmen, yüksek miktarlarda BA alınması sağlık üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir. 850-1870 mg/kg histamin konsantrasyonları, sözde "peynir reaksiyonu" salgınlarıyla ilişkilendirilmiştir. Bir substrat olarak serbest amino asitlerin mevcudiyeti nedeniyle peynir, potansiyel olarak yüksek seviyelerde BA, özellikle tiramin, histamin ve putresin biriktirebilir. Bunlar arasında histamin ve tiramin en zehirli ve dolayısıyla gıda güvenliği için kritik olarak kabul edilir. Ayrıca, biyojen aminler, belirli gıda türlerinde kalite ve kabul edilebilirlik indikatörleri olarak kullanılmaktadır.

Enterokoklar iyi bilinen biyojen amin üreticileridir. Geleneksel peynirler yüksek oranda biyojen amin içeriğine sahip olabilir. Çünkü bu tip peynirlerden izole edilen enterokoklarda BA üretimi tespit edilmiştir. Enterokoklarda biyojen amin ile ilgili genlerin tanımlanması toksisite potansiyelini gösterebilir, ancak bu toksinlerin üretimini doğrulamak için fenotipik testlerin kullanılması gerekmektedir (Cámara ve ark., 2020). *Enterococcus* izolatları amino asit dekarboksilasyon aktivitelerini değerlendirmek için L-lizin, L-tirozin ve L-ornitin kullanıldığında amin oluşumu sonucu renk değişimi ile biyojen amin üretimini göstermektedir.

2.7. *Enterococcus* Bakterilerinin Teknolojik Özellikleri

Son on yılda, probiyotik bakterileri içeren LAB, deniz ürünleri endüstrisinde gıda ürünlerinin muhafazası için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çok çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmadan önce, probiyotik bakteriler büyük ölçekli fermantasyonla üretilir ve ardından dondurularak kurutma işlemi kullanılarak korunur. *Enterococcus faecium* suşunun, bazı fermente gıdaların aromasının iyileştirilmesi gibi önemli teknolojik özelliklere sahip olduğu uzun zamandır bilinmektedir, ancak bazen termal işlenmiş gıdaların bozulmasıyla da ilişkilendirilmiştir. Bu mikroorganizma, ısıya en dayanıklı spor oluşturmeyen bakterilerden biridir ve tuz varlığında, düşük pH değerlerinde ve geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilmektedir (Shin ve ark., 2019). LAB'lerinin gıda endüstrisinde starter kültür olarak endüstriyel kullanımı, canlılık ve fonksiyonel aktivite açısından stabil kültür elde edilmesi ve uzun süreli kullanım garanti etmek için gerekli olan konsantrasyon ve koruma teknolojilerine bağlıdır.(Zhao ve Zhang, 2005).

2.7.1. Farklı sıcaklıklarda gelişme

Probiyotik bir mikroorganizmanın, safra, sıcaklık ve NaCl gibi stres koşullarına karşı dirençli olması gerekmektedir. Bakterilerin stresle karşılaştıklarında sergiledikleri hayatta kalma mekanizmalarına genellikle stres yanıtı denir. Hayatta kalma mekanizması uyarlanabilir bir yanıttır, yani hücreler orta düzeyde bir strese maruz kaldıklarında, aynı stresin daha şiddetli bir seviyesine daha sonra maruz kalmaya karşı artan direnç kazanmaktadır. Bu stres tepkisi modu, bakterilerin normalde ölümcül olabilen strese hayatta kalmasına izin verir. Bir başka stres mekanizması çapraz korumadır, yani hücreler bir strese maruz kaldıklarında, sadece bu strese değil, diğer ilgisiz streslere de direnç geliştirmektedir. Bakteriler sürekli olarak değişen çevrelerinde mevcut olan streslerle karşı karşıya kaldıklarından, stresi tespit eden, izleyen ve tepki veren, adaptasyonu ve hayatta kalmayı kolaylaştıran ayrıntılı bir sistem geliştirmiştir (Kim ve ark., 2001). Sıcaklık, bakteri gelişmesini etkileyebilecek önemli bir faktördür. Farklı sıcaklık aralığının seçilmesinin nedeni, izole edilen kültürlerin normal vücut sıcaklığı aralığında gelişip gelişmediğini tespit etmektedir. Çünkü izolatlar seçilen sıcaklık aralığında gelişemezlerse mi insan bağırsağında da gelişemezler (Pundir ve ark., 2013) .

2.7.2. Farklı alkol konsantrasyonlarında gelişme

Mikroorganizmalar üzerine bakterisit etkisi gösteren alkol, heterofermantatif LAB tarafından üretilmektedir. Alkolün konsantrasyonu, muamele süresi ve molekül ağırlığına bağlı olarak etkisi değişmektedir. Etil alkol ise proteinlerini denatüre edici etkisi bununla birlikte stoplazma zarındaki lipid yapıyı bozup zarın işlevine de üzerine etki edebilmektedir

(Karasu, 2006). Etanol genellikle bakteri üremesinin temel inhibitörlerinden biri olarak kabul edilir. Etanol direnci, ortamdaki bir çok koşula (yani pH ve sıcaklık) göre değişir ve *Oenococcus oeni* suşunun uzun zamandır şarapta etanol varlığına en dirençli LAB suşu olduğu rapor edilmiştir (G-Alegría ve ark., 2004). Etanol, çoğu fermantasyon prosesinde ana ürünlerden biri olmaktadır. LAB, fermantasyon sırasında etanol stresini tolere etmesi gerekebilir. Fermantasyon işleminde sadece etanol stresine karşı yüksek toleranslı LAB kullanılabilir. Isıya adapte edilmiş hücreler, %20 etanol içinde 2 saatlik inkübasyondan sonrası %80.8 hayatta kalma oranı ile yüksek etanol toleransı sergilerken, aynı muamele altında adapte edilmemiş hücrelerin sadece %0.084 hayatta kalma oranı göstermiştir (Shin ve ark., 2019).

2.7.3. Dondurmaya dayanıklılık

Donma işlemi, onlarca yıllık araştırmalardan sonra bile tam olarak anlaşılmayan karmaşık fenomenleri içermektedir. Bakteri hücresi donduğunda, farklı oranlarda buz kristalleri oluşmaktadır. Yavaş soğutma sırasında, hücre içi buz kristalleri oluşmaya başlamadan önce hücrenin dışında donma meydana gelmektedir. Buz kristalleri oluştuğu, su hücre dışı ortamdan uzaklaştırılır, çözünenlerin konsantrasyonu artar ve hücre zarı boyunca ozmotik bir dengesizlik meydana gelir, bu da hücreden su göçüne yol açmaktadır (Zhao ve Zhang, 2005). Dondurma ve liyofilizasyon işlemleri, laktik kültürlerin genetik stabilitesinin korunmasına izin vererek, istenen teknolojik özelliklerin kaybını önlemektedir (Karasu ve ark., 2010). Dondurma ve dondurarak kurutma teknikleri, hassas proteinlerin denatürasyonu ve birçok hücre tipinin canlılığının azalması gibi istenmeyen yan etkilere neden olur. Isıl ön stres uygulanan kültürlerin dondurarak kurutmada daha az etkilendiği bildirilmektedir. Çünkü bu adaptasyonun dehidrasyon hasarı için birincil bölge olan bakteri zarını koruduğu düşünülmektedir. Dondurarak kurutma işleminden önce 15 dakikalık 52°C'de ısı adaptasyonu, dondurarak kurutma sırasında *E. faecium* HL7 üzerinde koruyucu bir etki sağlamıştır. Dondurmada kontrol probiyotik kültürlerinin hayatta kalma oranları %35.86 iken, ısıya uyarlanmış kültürlerin benzer koşullar altında hayatta kalma oranları %69.19 seviyesindedir. Dondurarak kurutma sırasında hücresel inaktivasyon, çoğunlukla dondurma aşamasında meydana gelmektedir. Hücrenin yüzey alanı ne kadar fazla olursa, donma sırasında hücre dışı buz kristali oluşumu nedeniyle zar hasarının o kadar yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, enterokoklar gibi küçük küresel hücreler donmaya karşı daha dirençlidir ve dondurarak kurutma sırasında daha büyük çubuk şekilli laktobasillerden daha yüksek canlılık oranı gösterir (Shin ve ark., 2019).

2.7.4. Tuz toleransı

NaCl, belirli bakteri türlerinin gelişmesini engelleyebilen inhibitör bir maddedir. LAB NaCl'ye karşı dirençli olmaların, NaCl içeren gıdalarda canlılıklarını korumalarını sağlamaktadır. Bu nedenle NaCl toleransı, test bedilmesi gereken bir özellikler (Pundir ve ark., 2013). LAB'nin peynirde starter kültür olarak uygulanması için, bu mikroorganizmaların asitlik, sıcaklık, tuz ve dondurarak kurutma gibi stresli koşulları tolere edebilmesi gerekmektedir. (Bremer, 2000). Enterokoklar, yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere etme kapasiteleri nedeniyle deniz ortamında daha uzun süre hayatta kalabilirler. Sıcaklık ve tuz, fermantasyon işleminde en önemli iki parametre olarak bilinmektedir. Her iki faktör de (i) mikrobiyal popülasyonların sayısını kontrol etmesi (ii) fermantasyonu yöneten farklı mikrobiyal grupları seçmesi (iii) hakim laktik asit bakterisi türlerini seçmesi ve (iv) son ürünlerin gelişimini etkilemesinde belirleyici olabilmektedir. Aslında, fermantasyon sırasında tuzlu sularda artan tuz konsantrasyonu ile mikroorganizmaların nihai popülasyonunun kademeli olarak azaldığı bulunmuştur (Tassou ve ark., 2002).

2.7.5. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), canlı organizmaların metabolizmasında önemli bir bileşiktir (Forman, 2008). Oksidaz enzimleri tarafından katalize edilen birçok biyokimyasal reaksiyonun ürünüdür. Hidrojen peroksit reaktif bir tür ve diğer zararlı oksijen türlerinin öncüsü olabilir dolayısıyla dikkatle izlenmelidir. Bazı durumlarda, H_2O_2 'nin ekzojen (hücre dışı) üretimi, probiyotik mikroorganizmaların patojenlere karşı savunma mekanizmalarından biri olarak yararlıdır.

H_2O_2 , LAB tarafından üretilen ve antagonistik etki gösterebilen birincil metabolitlerden biridir. H_2O_2 üretiminin gıdaların korunması ve patojen gelişiminin önlenmesi için faydalı olduğu düşünülmektedir (Yuksekdag ve ark., 2004). LAB tarafından üretilen H_2O_2 miktarı, suşa ve oksijenin mevcudiyetine bağlı olarak değişmektedir. LAB' nin çoğunlukla insan ve hayvan bağırsak sisteminde sağlığı geliştirici etkileri olduğu söylenir. Probiyotik etkilerinin H_2O_2 , laktik asit, alkoller ve diğer metabolitler gibi antimikrobiyal maddelerinin ürettikleri de bildirilmiştir. Bu metabolitler, insan bağırsağında ishale veya diğer hastalıklara neden olan istenmeyen patojenleri inhibe etmektedir (Temmerman ve ark., 2003). Gastrointestinal sistem bazı enterokoklara konakçı olur, bunların arasında en yaygın olanı *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium*'dur. *Ent. faecium*'u ayıran şey, hücresel hasara neden olan konsantrasyon seviyelerinde ekzojen H_2O_2 üretme yeteneğidir. Literatür, *Ent. faecium*'un diğer bazı bakteriyel patojenlerin öldürülmesine aracılık ettiğini bildirmektedir (Moy ve ark., 2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Sunulan tez çalışmasında kullanılan *Enterococcus* suşları Karaman, Mut, Ereğli, Anamur gibi Orta Toroslar bölgesinde geleneksel yollarla üretilen deri tulum peynirlerinden saflaştırılmış ve moleküler tanımlaması yapılmıştır. Çalışma kapsamında daha önce tanımlaması yapılan 10 adet *Enterococcus faecium* ve 3 adet *Enterococcus faecalis* suşlarının probiyotik ve teknolojik özellikleri incelenmiştir.

Stok *Enterococcus* suşları; % 25 gliserol içeren M17 (Merck 1.15029) sıvı besiyerlerinde, -20°C’de depolanmıştır. Bu stok kültürlerden M17 sıvı besiyerine %3 oranında inoküle edilerek 30°C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan enterokok suşlarının, antimikrobiyal aktivitesi ve bakteriyosin üretiminin test edilmesi için *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 patojen mikroorganizmalar indikatör olarak kullanılmıştır. Patojen mikroorganizmalar Konya İl Kontrol Laboratuvarı’ndan temin edilmiştir. Bu patojen mikroorganizmalar analizde kullanmadan önce aktif hale getirilmesi için Brain Heart Infusion (BHI Merck 1.10493) sıvı besiyerine % 2 oranında inoküle edilmiş olup 37°C’de 18 saat inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *Enterococcus* suşları ve kaynakları

Bakteri türü
<i>Enterococcus faecium</i> strain T110 (192)
<i>Enterococcus faecium</i> strain WVS439 (258)
<i>Enterococcus faecium</i> strain 536 (262)
<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU7142 (270)
<i>Enterococcus faecium</i> strain V9-159 (427)
<i>Enterococcus faecium</i> strain HTBS-010(436)
<i>Enterococcus faecium</i> strain 2A4 (455)
<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU 1703 (656)
<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU8797 (736)
<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU:1578 (1130)
<i>Enterococcus faecalis</i> strain mashak 99 (28)
<i>Enterococcus faecalis</i> strain Unknown39 (367)
<i>Enterococcus faecalis</i> strain OS10 (388)

3.2. Analiz Yöntemleri

3.2.1. Lizozime dayanıklılık

Bu çalışmada izole edilen *Enterococcus* bakterilerinin lizozim toleransının test edilmesi için steril elektrolit çözeltisi hazırlanmış (0.22 g/L CaCl₂, 6.2 g/L NaCl, 2.2 g/L KCl, 1.2 g/L NaHCO₃) ve içerisine 100 mg/L lizozim (Sigma-Aldrich 62970) enzimi ilave edilmiştir.

Bakteri kültürü 18 saat inkübasyona bırakılmış sonrasında santrifüj edilmiş (6000rpm'de 15dk 4°C) (Nüve, NF 800R, Türkiye) ve elde edilen pelet 2 kez FTS (fosfat tampon solüsyonu) ile yıkandıktan sonra 2 mL ringer çözeltisi içinde süspanse edilmiştir. Bu süspansiyondan lizozim içeren elektrolit çözeltisine %10 oranında inoküle edilmiş ve 0, 30 ve 120.dk'da örnekleme yapılarak M17 agar üzerine ekim yapılmıştır. Ardından aerobik ortamda 30°C'de 48 saat inkübasyon sonrası sayım yapılmış ve sonuçlar log kob/mL şeklinde verilmiştir (Zago ve ark., 2011).

3.2.2. Safra tuzuna dayanıklılık

Çalışmada, *Enterococcus* suşlarının safra tuzuna toleransı Sabir ve ark. (2010), tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. 18 saat inkübasyon sonrasında enterokok izolatları, %0.06, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 oranında sığır safrası (Sigma-Aldrich B3883) içeren ve kontrol olarak safra içermeyen M17 sıvı besiyerine %2 oranında inoküle edilmiştir. Ardından 30°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve spektrofotometrede (Optizen POP, Kore) 600nm'de ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar % gelişme olarak ifade edilmiştir.

3.2.3. Asit toleransı

Enterococcus suşlarının asit toleransı testinde Mishra ve Prasad (2005), tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. Bu analizle sıvı besiyerleri farklı pH'larda kullanılmıştır. Bunun için M17 sıvı besiyerlerinin pH'ları 6 M HCl ile 2 ve 3'e ayarlanmıştır. Daha sonra otoklavda 121°C'de 15dk steril edilmiş ve kullanılabilecek kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. 18 saat inkübasyonun ardından pH ayarlaması yapılan sıvı besiyerlerine %1 oranında inokülasyon yapılmış ve inkübasyonun 0 ve 2.saatlerinde 1mL alınıp seri dilüsyonlar hazırlanarak M17 agara ekim yapılmıştır. Petri plaklar aerobik ortamda 30°C'de 72 saat inkübe edilmiş ve sayım yapılarak sonuçlar log kob/mL olarak verilmiştir.

3.2.4. Mide ve bağırsak özsuynuna dayanıklılık

Çalışmada *Enterococcus* izolatlarının gastrik sistem toleransını test etmek için, simule mide özsuyn; NaCl (2.05g/L), KH₂PO₄ (0.6g/L), CaCl₂ (0.11g/L) ve KCl (0.37g/L) içeren tampon çözeltisi hazırlanmıştır. pH değeri 1M HCl ile 2.5'e ayarlanan mide çözeltisi 121°C'de 15dk otoklavda steril edilmiştir. Kullanımdan hemen önce pepsin (0.0133g/L) (Sigma Aldrich 77160) ve lizozim (0.01g/L) (Sigma-Aldrich 62970) eklenmiştir. Test edilecek enterokok izolatları 1 gece geliştirildikten sonra 10.000 g'de (4°C) 10dk santrifüj edilmiş (VWR Micro Star 17R, Almanya) ve elde edilen pellet mide özsuyn ile 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra hücreler son konsantrasyonu >9 log kob/mL olacak şekilde sentetik mide özsuynunda yeniden süspanse edilmiştir. 37°C'de 3 saat peristaltik hareketi simule etmek amacıyla orbital karıştırıcılı inkübatörde (200 rpm) (Stuart SI500, İngiltere) inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0 ve 3. saatinde seri dilüsyonlar hazırlanarak M17 agara ekim yapılmıştır. Ardından aerobik ortamda sırasıyla 30°C'de 72 saat inkübe edildikten sonra sayım yapılmış ve sonuçlar log kob/mL şeklinde verilmiştir (Bautista-Gallego ve ark., 2013).

Simulebağırsak ortamı için NaCl (8.5g/L) ve NH₂PO₄.7H₂O (50.81g/L) içeren tampon çözelti hazırlanmış ve bu çözeltinin pH'sı KH₂PO₄ (1.27 g/L) kullanılarak 8.0'e ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15dk steril edilen çözeltiye kullanım öncesi safra (3.0g/L) ve pankreatin (0.1g/L) (Sigma-Aldrich P1750) eklenmiştir. Test edilecek suşlar bir gece geliştirildikten sonra 10.000g'de (4°C) 10dk santrifüj (VWR Micro Star 17R, Almanya) edilmiş ve elde edilen pellet FTS ile bir kez yıkanmıştır. Daha sonra simule pankreatik suda yeniden süspanse edilmiştir. 37°C'de 24 saat boyunca orbital karıştırıcılı inkübatörde (200 rpm) (Stuart SI500, İngiltere) inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0 ve 24. saatinde seri dilüsyonlar hazırlanarak M17 agara ekim yapılmıştır. Sonrasında aerobik ortamda 30 °C'de 72 saat inkübe edildikten sonra sayım yapılmış ve sonuçlar log kob/mL şeklinde verilmiştir (Bautista-Gallego ve ark., 2013).

3.2. 5. Hidrofobisite

Enterococcus suşlarının hidrofobisite özelliklerini belirlemek için Mishra ve Prasad (2005), tarafından belirlenen yöntem kullanılmıştır. Bunun için hidrokarbon olarak n-hekzadekan (Merck 820633) ve ksilen (Merck 108297) kullanılmıştır. M17 sıvı besiyerlerinde 18 saat inkübe edilen kültürler 7000 rpm'de (10dk, 4°C) santrifüj edilmiştir (Nüve, NF 800R, Türkiye). Elde edilen peletler FTS ile 2 kez yıkanmış ve en son aynı tampon çözeltide süspanse edilmiştir. Bu hücre süspansiyonunun A580 değeri spektrofotometrede (Optizen POP, Kore) ölçülmüş ve kaydedilmiştir (A0). Aynı hücre süspansiyonundan 2 mL alınarak 2 mL hidrokarbon (n-hekzadekan (Merck 820633) ve ksilen (Merck 1.08297)) ilave edilmiş ve

2 dk boyunca karıştırılmıştır. Bu karışım 30 dk oda sıcaklığında bekletilerek faz ayrımı sağlanmıştır. 30 dk sonunda sulu faz spektrofotometrede 580 nm dalga boyunda A₅₈₀ değeri ölçülmüştür (A). Spektrofotometre ölçümünde kör olarak, bakteri hücresi ilave edilmemiş FTS kullanılmıştır. Hidrofobisite değerleri Aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmış ve % şeklinde verilmiştir.

$$\text{Hidrofobisite (\%)} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

A₀: Kültürün A₅₈₀ değeri

A: n-hekzadekan ve ksilen uygulanmış örneğin A₅₈₀ değeri

3.2.6. Otoagregasyon

Yapılan çalışmada, enterokok suşlarının adezyon özelliğini belirlemek için otoagregasyon analizi yapılmıştır. Bu analizde enterokok suşları 18 saat inkübasyonun ardından santrifüj edilmiş (6000rpm, 15dk 4°C) (Nüve, NF 800R, Türkiye), elde edilen pelet 2 kez FTS ile yıkanmış ve aynı hacimde FTS içinde süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonunun spektrofotometrede (Optizen POP, Kore) A₆₀₀ değeri 0.8-0.9 olacak şekilde aynı çözelti ile ayarlanmış (A₀) ve 24 saat boyunca 30 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 3 ve 24. saatlerinde spektrofotometrede 600nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Aşağıdaki formül kullanılarak enterokok suşlarının otoagregasyon kabiliyeti sonuçları % olarak hesaplanmıştır (Mallappa ve ark., 2019).

$$\text{Otoagregasyon (\%)} = [1 - (AT/A_0)] \times 100$$

A₀ = Örneğin 0. saatteki A₆₀₀ değeri

AT = Örneğin 3 ve 24. saatteki A₆₀₀ değeri

3.2.7. Antibakteriyel aktivite

Enterococcus suşlarının antibakteriyel aktivitesi Ramadan ve ark. (2014) tarafından kullanılan Agar-well difüzyon metodu ile tespit edilmiştir. İndikatör mikroorganizma olarak *Salm. Typhimurium* ATCC 14028, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778 ve *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. Test edilecek enterokok bakterileri M17 sıvı besiyeri ve indikatör mikroorganizmalar BHI sıvı besiyerinde bir gece inkübe edilmiştir. Müeller Hinton agar (Merck 1.05437) içeren petrilere 100µL indikatör mikroorganizma yayılmıştır. Petriler 4’e bölünerek her bir bölmeye 6mm çapında kuyucuk açılmıştır. Her bir kuyucuğa 10µL enterokok ilave edilmiş ve 4°C’de bir saat bekletilmiştir.

Petri plaklar 37°C’de 24 saat inkübe edilmiş ve oluşan zon çapları ölçülerek sonuçlar milimetre şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.8. Bakteriyosin üretimi

Enterococcus suşlarının bakteriyosin üretimleri, indikatör patojen bakteriler kullanılarak belirlenmiştir. Antimikrobiyel etki gösteren enterokok suşları M17 sıvı besiyerlerinde 18 saat inkübe edilmiştir. Aktif kültürler 6500rpm’de 15dk 4°C’de santrifüj edilmiştir (Nüve, NF 800R, Türkiye). Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek süpernantlar yeni tüplere aktarılmıştır. İlk olarak organik asitlerden kaynaklanabilecek antibakteriyel etkiyi ortadan kaldırmak için süpernantların pH değerleri 6 N NaOH veya 6 N HCl kullanılarak 6.5-7.0’ye ayarlanmıştır. Daha sonra kalıntı hidrojen peroksiti parçalamak için nötralize edilmiş süpernantlara, son enzim konsantrasyonu 1mg/mL olacak şekilde katalaz enzimi (Sigma-Aldrich C9322) ilave edilerek 37°C’de 2 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda enzim aktivitesini sonlandırmak için 60 °C’lik su banyosunda 10 dk bekletilmiştir.

İndikatör patojen mikroorganizmalar BHI sıvı besiyerinde 18 saat inkübe edildikten sonra %0.7 agar içeren yarı katı besiyerine (5mL BHI yarı katı besiyeri) 100µL inoküle edilmiştir. Ardından bu besiyerleri MRS ve M17 agar bulunan petrilere homojen bir şekilde yayılmış ve katılaştıktan sonra her bir petri kutusunda 4 tane olacak şekilde 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Sonrasında kuyucukların dibi 10µL MRS ve M17 agar ile kapatılmıştır. Yukarıda anlatıldığı gibi elde edilen süpernantlardan 100µL alınarak kuyucuklara ilave edilmiştir. 37°C’de 24 saat inkübasyonun ardından kuyucuk etrafında zon oluşturan veya oluşturmeyen izolatlar sırasıyla pozitif veya negatif şeklinde değerlendirme yapılmıştır (Özlü, 2015).

3.2.9. β-galaktosidaz aktivitesi

Enterokok suşlarının β-galaktozidaz aktivitesini belirlemek için Shekh ve ark. (2016), tarafından bildirilen yöntem uygulanmıştır. Bu amaçla M17 sıvı besiyerinin bileşiminde şeker hariç tüm komponentleri mevcut kalmış, bu şeker yerine laktoz ilave ederek modifiye edilmiştir. Laktoz ilave edilmeden önce saf suda çözündürülüp 0.45µm’lik filtreden geçirildikten sonra son konsantrasyonu %1 olacak şekilde otoklavlanmış besi ortamına ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan besiyeri M17-lac sıvı besiyeri olarak adlandırılmıştır. Test edilecek kültürlerin 18 saat inkübasyonu sonrasında M17-lac sıvı besiyerine %2 oranında inoküle edildikten sonra bir gece inkübe edilmiştir. Analiz için Na₂HPO₄.2H₂O (16.1g/L), NaH₂PO₄.2H₂O (5.5g/L), KCl (0.75g/L), MgSO₄.7H₂O (0.25g/L), SDS (1.0g/L) ve β-

merkaptotanol (2.7ml/L) içeren tampon çözelti kullanılmıştır. M17-lac sıvı besiyerinde geliştirilen bakteri hücrelerinden 100µL alınarak, 2.7mL tampon çözeltisine ilave edilmiş ve 37°C’de 30dk bekletilmiştir. Sonrasında 0.6mL ONPG (4mg/mL) (Merck 8.41747) ilave edilerek sarı renk oluşumuna kadar 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Sarı renk oluşumundan sonra 2mL 1M Na₂CO₃ (soğuk) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Spektrofotometrede (Optizen POP, Kore) 420nm’de absorbans değeri ölçülmüştür. Aşağıdaki formül kullanılarak β-galaktozidaz aktivitesi hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Miller Unit (MU) şeklinde verilmiştir

$$MU = [(At-Ab)/t]*1000$$

At: Hücre içeren reaksiyon karışımının 420 nm’de ölçülen absorbans değeri

Ab: Hücre içermeyen reaksiyon karışımının 420 nm’de ölçülen absorbans değeri

t: Sarı renk oluşumuna kadar geçen süre (dk)

3.2.10. Serum kolesterolünün düşürülmesi

Bu çalışmada enterokok suşlarının serum kolesterolü asimilasyonu Tomaro-Duchesneau ve ark. (2014), tarafından tarif edilen yöntemle göre ölçülmüştür. Bunun için %0.3 sığır safrası ve %0.2 natioglikolat (Sigma-Aldrich T0632) içeren M17 sıvı besiyeri hazırlanmış ve otoklavda steril edilmiştir (121°C’de 15dk). Otoklav sonrası son konsantrasyon 100µg/mL olacak şekilde suda çözünür kolesterol (Sigma-Aldrich-C1145) 0.45µm’lik filtreden geçirilerek ilave edilmiştir. Bir gece geliştirilen enterokok suşları kolesterol içeren sıvı besiyerlerine %1 oranında inokule edilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası bakteri hücreleri 4000rpm’de 10dk (4°C) santrifüj edilerek (Nüve, NF 800R, Türkiye) süpernetant toplanmış ve 1mL süpernatant üzerine 1mL %33’lük KOH çözeltisi ve 2mL etanol ilave edilerek 1dk vortekslenmiştir. 37°C’de 15 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına soğutulmuş ve 2mL saf su, 3mL hexan ilave edilerek tekrar 1dk vortekslenmiştir. Vorteks işleminden sonra faz ayrımı için 15dk oda sıcaklığında bekletilen 2 fazlı karışımın hekzan tabakasından 1mL alınarak 60°C’de evapore edilmiştir. Evaporasyon sonrasında kalıntı üzerine 2mL o-fitaldialdehid (Sigma-Aldrich P1378) ve 500µL H₂SO₄ ilave edilerek 1dk vortekslenmiştir.

Oda sıcaklığında 20dk inkübasyonun sonrasında spektrofotometrede (Optizen POP, Kore) 570nm’de ölçüm yapılmıştır. Kolesterol standart kurvesi 3.91-500µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerden elde edilmiştir. Aşağıdaki denklem kullanılarak kolesterol asimilasyonu hesaplanmış ve elde edilen kolesterol miktarının sonuçları µg/mL şeklinde verilmiştir.

$$\text{Kolesterol Asimilasyonu (\%)} = \left(\frac{k_0 - k_1}{k_0} \right) \times 100$$

k₀: Örnek içermeyen sıvı besiyerinin kolesterol miktarı (µg/mL)

k₁: Örneğin kolesterol miktarı (µg/mL)

3.2.11. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

Enterokok bakterilerinin EPS üretiminin belirlenmesi için aktif enterokok hücreleri 80mL M17 sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilmiş ve 30°C’de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İlk olarak bakteri hücreleri 6500rpm’de (4°C 30dk) santrifüj edilerek pelet ve süpernatant ayrılmıştır. Peletler FTS ile iki kez yıkanmış ve elde edilen pelet ultra saf su ile süspanse edilmiştir. Bu süspansiyona 5-6 defa 30sn’lik aralıklarla 10sn’lik ultrases (Hielscher, UP400S model, GmbH, Teltow, Germany) uygulanmıştır. Uygulamalar arasında hücreler buz banyosunda bekletilmiştir. Ultrases işlemi sonrasında hücreler 6500 rpm’de (4°C, 30dk) santrifüj edilerek (Nüve, NF 800R, Türkiye) bu aşamaya kadar elde edilen tüm süpernetantlar birleştirilmiştir. Süpernatantla eşit miktarda soğuk etanol (-20°C) ilave edilerek EPS çökeltilmiştir. Bir gece bekletilen örnekler 6500rpm’de 30dk 4°C’de santrifüj edilerek çökelen EPS ayrılmıştır. EPS çökeltisi daha sonra 10mL ultra saf suda hafif bir ısıtma işlemi ile (50°C’de) çözündürülmüş ve 2 katı kadar soğuk etanol ilave edilerek bir gece daha 4°C’de bekletilmiştir. Sonraki aşamada santrifüj işlemi tekrar edilerek EPS elde edilmiş ve tekrar ultra saf suda (40 °C) çözündürülmüştür. EPS’ye karışmış olabilecek protein bazlı bileşenlerin uzaklaştırılması için EPS çözeltilerine %10 oranında TCA çözeltisi (%100’lük) ilave edilerek 4°C’de bir gece bekletilmiştir. Tekrar santrifüj edilerek elde edilen süpernatant nötralize edilmiş ve 2 katı hacimde soğuk etanol ilave edilerek 4°C’de bir gece bekletilmiştir. Çöken EPS santrifüj edilerek süpernetant uzaklaştırılmış ve pelet ultra saf suda çözündürülmüştür. Elde edilen çökeltide EPS dışında bulunabilecek şeker bazlı bileşenlerin uzaklaştırılması için EPS-saf su çözeltisi 72 saat boyunca diyaliz işlemine (Sigma-Aldrich D6066, 12000 Da) tabi tutulmuştur (Dertli, 2013).

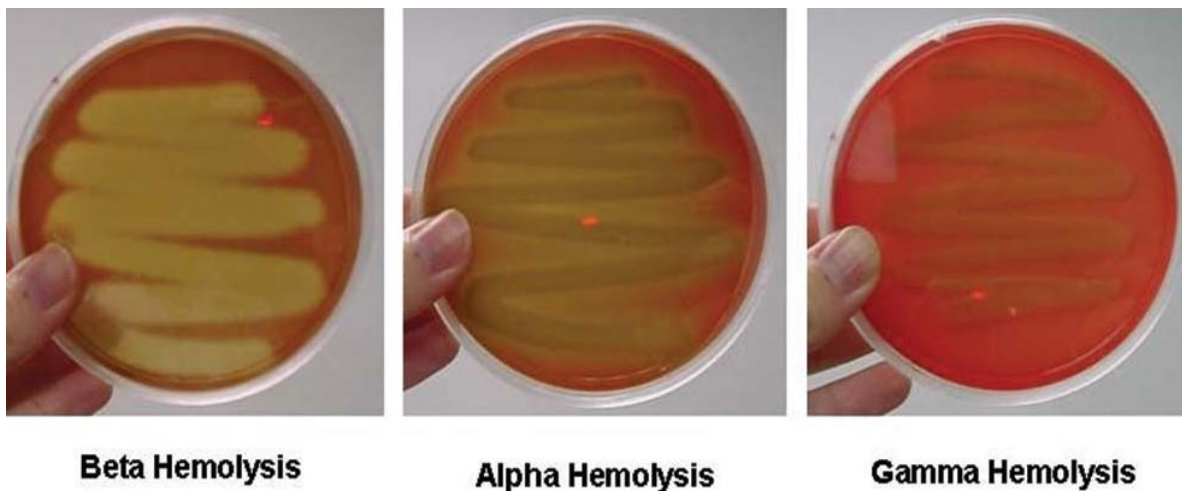
Elde edilen EPS miktarını belirlemek için diyaliz işleminden sonra fenol-sülfirik asit analizi uygulanmıştır (Dubois ve ark., 1956). Bu analiz için glikoz kullanılarak standart seyreltik çözeltiler (0’dan 0.2mg/mL’ye kadar) hazırlanmış ve standart çözeltiler ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Spektro küvetlerinin her birine 200µL örnek konularak üzerine 600µL %98’lik H₂SO₄ ve 120µL %5’lik fenol ilave edilmiştir. Renk gelişimi için 5 dk beklenmiş ve süre sonunda spektrofotometrede 490nm’de ölçüm yapılmıştır. Standart glikoz eğrisi kullanılarak bakterilerin EPS miktarı belirlenmiş ve sonuçlar µg/mL şeklinde verilmiştir.

3.2.12. Antibiyotik direnci

Enterococcus bakterilerinin antibiyotik direnç analizi Domingos-Lopes ve ark. (2017), tarafından kullanılan yöntemle göre uygulanmıştır. Bu amaçla, amfisilin (10µg), kloramfenikol (30µg), eritromisin (15µg), gentamisin (10µg), kanamisin (30µg), penisilin (10 U), streptomisin (10µg), tetrasiklin (30µg) ve vankomisin (30µg) antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Test edilecek enterokok bakterileri 1 gece geliştirildikten sonra M17 agar içeren petrilere 100µL yayılmıştır. Petriler 4'e bölünerek her bir bölmenin ortasına birer antibiyotik diski yerleştirilmiştir. Sonrasında aerobik ortamda 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından disk etrafında oluşan zon çapları mm olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Cockerill ve ark. (2013)'ün uygulandığı yöntemle göre, dirençli (D), yarı hassas (YH) ve hassas (H) şeklinde yorumlanmıştır.

3.2.13. Hemolitik Aktivite

Enterokok suşları hemolitik aktivite testi de Almeida Júnior ve ark. (2015), tarafından kullanılan metoda göre gerçekleştirilmiştir. Bu analizde izolatların aktif hale gelmesi için M17 sıvı besiyerinde 18 saat inkübe edilmiştir. Ardından %5 defibrine koyun kanı ile katkılanırılmış. Blood Agar (Merck 1.10886) petrilere her petride 2 bakteri suşu olacak şekilde öze ile çizim yapılmıştır. Sonrasında aerobik ortamda 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda hemolitik reaksiyon, kırmızı kan hücrelerinin kısmi hidrolizi sonucunda yeşil zon oluşumu ile α -hemoliz; kırmızı kan hücrelerinin tamamıyla hidrolizi sonucunda şeffaf zon oluşumu ile β -hemoliz; zon oluşmaması ile γ -hemoliz olarak değerlendirilmiştir. Analizde patojen bakteriler *Staph. aureus* ATCC 25923 (β -hemolitik) ve *E. coli* ATCC 25922 (α -hemolitik) referans suşlar olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Alpha (α), Beta (β) ve Gamma (γ) hemolitik aktivitenin petri görüntüsü

3.2.14. Biyojen amin üretimi

Enterokok suşlarının BA üretiminin belirlenmesi için, dekarboksilaz sıvı besiyerine (Sigma-Aldrich D2935) %1 oranında L-lisin (Sigma-Aldrich L5501), L-tirosin (Merck 1.08371), L-ornitin (Sigma-Aldrich O2375) ve L-arjinin (Merck 1.01542) amino asitleri ilave edilmiş ve pH 5.3'e ayarlanmıştır. Hazırlanan sıvı besiyerleri otoklavda 121 °C'de 10 dk steril edildikten sonra bir gece geliştirilen enterokoklar %0.1 oranında inoküle edilmiş ve 30°C'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Enterokok suşlarının biyojen amin üretilip üretilmediği besiyerinin renginin sarıdan mor eflatuna dönüşümü ile anlaşılmış olup renk dönüşümü olanlar (+), renk dönüşümü olmayanlar (-) şeklinde ifade edilmiştir (Bover-Cid ve Holzapfel, 1999).

3.2.15. Virulens genlerin saptanması

Enterococcus suşları için, jelatinaz (gelE), agregasyon maddesi (asa1), hiyalüronidaz (hylefm) ve sitolizin aktivatörü (CylA), sitolizin taşınması (CylB), sitolizin öncülleri (CylL1 ve CylLs), sitolizin modifikasyonu (CylIM) için kodlanan virülans genlerinin varlığı veya yokluğu PCR amplifikasyonları ile tespit edilmiştir. Toplam bakteriyel DNA izolasyonu MolBio (MB 505-50) bakteri genomik DNA saflaştırma kiti ile yapılmıştır. Primerler ve bunların ürün boyutları Tablo 3.2'de verilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonları, 2µL 10X Taq buffer, 0.4µL 10mM dNTP karışımı, 0.4µL 10µM F primer, 0.4µL 10µM R primer, 14.7µL DEPC, 0.1µL Taq DNA polimeraz ve 2µL DNA içeren 20µL reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Virülans genlerinin amplifikasyonları için termal döngüleme (BioRAD, T100™, Foster City, California, USA) aşağıdaki koşullarda programlanmıştır: 95°C'de 30sn, 34 döngü için 95°C'de 30sn, 56°C'de 30sn, 6 °C'de 90sn ve 68°C'de 5dk. PCR ürünleri, 0.5 x TBE tamponunda 1.5w/v agaroz jel ile elektroforeze tabi tutulmuş ve etidyum bromür boyaması ile görselleştirilmiştir.

Çizelge 3.2: Virülans genlerin saptanmasında kullanılacak primer dizilimleri ve ürün büyüklüğü

Hedef Gen	Primer Dizilimi (5'-3')	Ürün Büyüklüğü (bp)	Kaynak
CylI	F:GATGGA GGG TAAGAATTAGG R:GCT TCACCTCACTAAGTTTTATAG	253	(Maasjost ve ark., 2019)
CylLs	F:AGA ACT TGT TGG TCC TTC R:GCT GAA AAT AAT GCA CCT AC	742	(Eaton ve Gasson, 2001)
CylM	F:CTG ATG GAA AGA AGA TAG TAT R:TGA GTT GGT CTG ATT ACA TTT	742	(Eaton ve Gasson, 2001)
CylB	F:ATT CCT ACC TAT GTT CTG TTA R:AAT AAA CTC TTC TTT TCC AAC	843	(Eaton ve Gasson, 2001)
CylA	F:TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT R:GCT GCT AAA GCT GCG CTT	688	(Eaton ve Gasson, 2001)
GelE	F:ACC CCG TAT CAT TGG TTT R:AGA TGC ACC CGA AAT AAT ATA	213	(Eaton ve Gasson, 2001)
Hylefm	F:GAG TAG AGG AAT ATC TTA GC R:AGG CTG CAA TTC TGT	661	(Maasjost ve ark., 2019)
asa1	F:GCA CGC TAT TAC GAA CTA TGA R:AAA CGG CAA GAC AAG TAA ATA	375	(Vankerckhoven ve ark., 2004)

F: forward primer; R: reverse primer

3.2.16. Sıcaklık toleransı

Enterokok suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişme potansiyelleri, Tassou ve ark. (2002), tarafından kullanılan metoda göre gerçekleştirilmiştir. Enterokok suşları, M17 sıvı besiyerinde 18 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında aktif hale getirilen kültürler tekrar M17 sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilerek 4, 15, 30 ve 45°C’de bir gece inkübe edilmiştir. Ardından gelişme gösterenler +++ : çok iyi, ++ : iyi, + : zayıf olarak sınıflandırılmış; gelişme göstermeyenler negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.17. Alkole dayanıklılık

Çalışmada, enterokok suşlarının etil alkole dayanıklılığı için, G-Alegría ve ark. (2004), tarafından uygulanan metod modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. M17 sıvı besiyerlerinde 18 saat inkübe edilmiş sonrasında aktif hale getirilen kültürler %3, 6, 12 ve 15 oranında etil alkol içeren ve kontrol olarak etil alkol içermeyen M17 sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilmiştir. Ardından aerobik ortamda 30°C’de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında gelişme gösterenler +++ : çok iyi, ++ : iyi, + : zayıf olarak sınıflandırılmış; gelişme göstermeyenler ise negatif (-) olarak işaret verilmiştir.

3.2.18. Tuz (NaCl) toleransı

Yapılan çalışmada, enterokok izolatlarının farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişimi Karasu (2006), tarafından önerilen metoda göre uygulanmıştır. *Enterococcus* suşları aktif hale getirmek için M17 sıvı besiyerinde geliştirip 18 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında aktif enterokok kültürler %3, 5, 6.5, 8 ve 9 oranında NaCl içeren ve kontrol olarak NaCl içermeyen M17 sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilmiş ve aerobik ortamda 30°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında gelişme gösterenler +++ : çok iyi, ++ : iyi, + : zayıf olarak sınıflandırılmış; gelişme göstermeyenler negatif (-) olarak verilmiştir.

3.2.19. Hidrojen peroksit toleransı (H₂O₂)

Kültürlerin H₂O₂’ye dayanıklılığını belirlemek için Li ve ark. (2012), tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. *Enterococcus* suşları, test öncesinde M17 sıvı besiyerinde 18 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında aktif enterokok kültürler 0.4, 0.7 ve 1.0 mM H₂O₂ içeren ve kontrol olarak H₂O₂ içermeyen M17 sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilmiş ve 30°C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişme gösterenler +++ : çok iyi, ++ : iyi, + : zayıf olarak sınıflandırılmış ve gelişme göstermeyenler ise negatif (-) olarak işaretlenmiştir.

3.2.20. Dondurma sıcaklığına tolerans

Çalışmada, dondurma sıcaklığına dayanım testi Karasu (2006), tarafından verilen metoda göre yapılmıştır. M17 sıvı besiyerinde 18 saat inkübasyonun ardından aktif hale getirilen stok kültürlerden 25µL alınarak 3mL M17 sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 30°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından 2000rpm’de 15dk santrifuj edilen (Nüve, NF 800R, Türkiye) hücrelerin süpernatant kısmı dökülerek elde edilen pelletler 0.5mL skim milk besiyeri ile süspanse edilmiş ve -70°C’de dondurulmuştur. Skim milk besiyerinde bulunan canlı hücrelerin M17 agara dondurma öncesi ve sonrası ekimi yapılmış ve sayım sonuçları aşağıdaki formüle göre hesaplanarak canlı kalan enterokok miktarı % olarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ Canlı Kalan Mikroorganizma} = (X / X_0) \times 100$$

X₀ : Kültürün Başlangıç Canlı Mikroorganizma Sayısı

X : Dondurma Sonrası Canlı Mikroorganizma Sayısı

3.3. İstatistiksel analiz

Yapılan tez çalışmasında tüm analizler, iki tekerrürün aritmetik ortalama ve standart sapması olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, bakteriyel kültürler ve uygulamalar

arasındaki önemli farklılıklara belirlemek için Minitab 16 (State College, ABD) istatistik programında one-way ANOVA'ya tabi tutulmuştur. Sonuçlar arasında önemli farklılıklar Tukey testi ile 0.05 düzeyinde karşılaştırılmıştır.

3.4. Temel bileşenler analizi (PCA)

Tüm isolatları probiyotik, güvenlik ve teknolojik özelliklerine göre ayırt etmek için temel bileşen analizi (PCA) kullanıldı. PCA, istatistiksel programı JMP®.16 kullanılarak yapılmıştır.



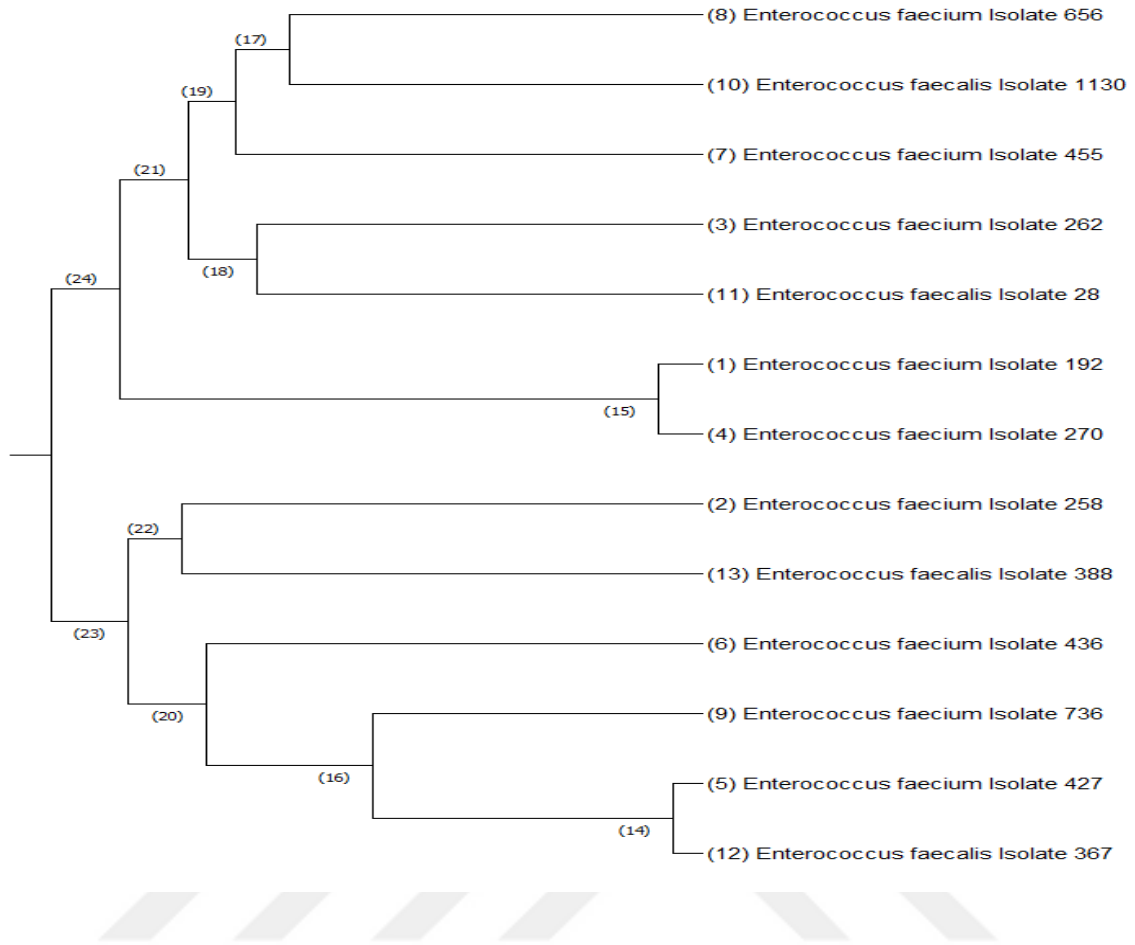
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. *Enterococcus* spp. Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Orta Toroslar yörelerinde geleneksel yöntemler ile üretilen deri tulum peynirlerinden izole edilen LAB'nin moleküler tanımlaması 16S rRNA analizi ile yapılmıştır. Tür benzerlikleri NCBI'da (National Center for Biotechnology Information) nükleotit blast'ı inceleyerek gerçekleştirilmiştir. İzolatların genbank erişim numaraları ve benzerlik oranları Çizelge 4.1'de göstermiştir. *Enterococcus* spp. arasındaki benzerliği temsil eden filogenetik ağaç, MEGA-X (Versiyon 10.1.6) programında oluşturulmuş ve Şekil 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1: Laktik asit bakterilerinin 16S rRNA gen dizilimi ile tanımlanması ve NCBI-BLAST'tan uyarlanmış Genbank erişim numaraları.

İzolat Kodu	Bilinen En Yakın Suş ve Numarası	Benzerlik Oranı (%)	Genbank Erişim No
192	<i>Enterococcus faecium</i> (T110)	98	CP006030.1
258	<i>Enterococcus faecium</i> (WVS439)	93	KM257714.1
262	<i>Enterococcus faecium</i> (536)	86	KT124577.1
270	<i>Enterococcus faecium</i> (CAU7142)	90	MF423753.1
427	<i>Enterococcus faecium</i> (V9-159)	97	KP221631.1
436	<i>Enterococcus faecium</i> (HTBS-010)	99	KM096592.1
455	<i>Enterococcus faecium</i> (2A4)	99	KY765024.1
656	<i>Enterococcus faecium</i> (CAU1703)	99	MF429471.1
736	<i>Enterococcus faecium</i> (CAU8797)	98	MF423949.1
1130	<i>Enterococcus faecium</i> (CAU:1578)	99	MF354917.1
28	<i>Enterococcus faecalis</i> (mashak 99)	89	JX861867.1
367	<i>Enterococcus faecalis</i> (Unknown39)	99	KY962906.1
388	<i>Enterococcus faecalis</i> (OS10)	98	JX536096.1



Şekil 4.1: *Enterococcus* izolatlarının 365F ve 1064R primerleri kullanılarak PCR ile belirlenen 16S rRNA sekanslarının komşu bağlantı yöntemine göre düzenlenen filogenetik ağacı.

4.1.1. *Enterococcus* suşlarının lizozim toleransı

Lizozim bakteri hücre duvarını oluşturan N-asetil-muramik asit ve N-asetil-glukozamin arasındaki $\beta(1-4)$ bağlarını parçalayarak hücre duvarlarını bütünlüğünü bozmaktadır (Sagdic ve ark.; 2014). Probiyotik bakterilerin en önemli özellikleri, lizozim gibi insan ağız boşluğunda ve tükürüğünde bulunan enzimlere karşı dirençli olmaktadır (Turchi ve ark., 2013).

Enterococcus izolatların lizozim toleransına ait sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Test sonuçlarına göre tüm *Enterococcus* izolatlarının lizozime karşı dirençli olduğu ve 120 dk sonunda canlılık değerlerinin %84-100 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi en yüksek lizozim direnci 367 izolatında en düşük direnç ise 427 izolatında belirlenmiştir. Elde edilen bu farklı sonuçlar hücre duvarı yapısındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer sonuçlar, Özkan (2021)’in, çalışmasında da tespit edilmiş olup *Enterococcus* suşlarının lizozim toleransı %86.47-83.20 arasında rapor

edilmiştir. Ayrıca, Ayyash ve ark. (2018) yapmış oldukları çalışmada deve sütünden izole edilen *Enterococcus* izolatlarının lizozim direncini %95.7-86.3 olarak rapor etmiştir. Başka bir çalışmada, Khalkhali ve Mojgani (2017), anne sütünden izole ettikleri *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium* suşlarının lizozime karşı dirençli olduğunu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2: *Enterococcus* suşlarının lizozim tolerans sonuçları (ortalama $\pm$ standart sapma)

İzolat No	0. dk	30. dk		120. dk	
	log kob/mL	log kob/mL	% canlılık	log kob/mL	% canlılık
192	8.93 $\pm$ 0.04 ^{bcA}	8.77 $\pm$ 0.06 ^{aAB}	98.21	8.64 $\pm$ 0.01 ^{aB}	96.75
258	8.98 $\pm$ 0.02 ^{bcA}	8.7 $\pm$ 0.04 ^{aB}	96.94	8.59 $\pm$ 0.01 ^{aB}	95.65
262	8.69 $\pm$ 0.01 ^{deA}	8.45 $\pm$ 0.01 ^{aB}	97.24	8.46 $\pm$ 0.04 ^{aB}	97.35
270	9.03 $\pm$ 0.00 ^{abA}	8.63 $\pm$ 0.05 ^{aB}	95.51	8.54 $\pm$ 0.01 ^{aB}	94.52
427	8.89 $\pm$ 0.01 ^{cA}	8.5 $\pm$ 0.05 ^{aA}	95.56	7.53 $\pm$ 0.33 ^{bB}	84.65
436	8.68 $\pm$ 0.02 ^{deA}	8.67 $\pm$ 0.11 ^{aA}	99.88	8.63 $\pm$ 0.09 ^{aA}	99.42
455	9.03 $\pm$ 0.01 ^{abA}	8.8 $\pm$ 0.26 ^{aA}	97.4	8.63 $\pm$ 0.01 ^{aA}	95.51
656	9.03 $\pm$ 0.06 ^{abA}	8.9 $\pm$ 0.25 ^{aA}	98.56	8.68 $\pm$ 0.08 ^{aA}	96.12
736	9.10 $\pm$ 0.01 ^{aA}	8.9 $\pm$ 0.27 ^{aA}	97.8	8.83 $\pm$ 0.23 ^{aA}	96.98
1130	8.89 $\pm$ 0.01 ^{cA}	8.71 $\pm$ 0.18 ^{aA}	97.92	8.74 $\pm$ 0.24 ^{aA}	98.31
28	8.95 $\pm$ 0.01 ^{bcA}	8.73 $\pm$ 0.21 ^{aA}	97.54	8.71 $\pm$ 0.28 ^{aA}	97.26
367	8.62 $\pm$ 0.04 ^{eA}	8.52 $\pm$ 0.13 ^{aA}	98.78	8.62 $\pm$ 0.17 ^{aA}	100
388	8.74 $\pm$ 0.01 ^{dA}	8.58 $\pm$ 0.06 ^{aA}	98.17	8.54 $\pm$ 0.06 ^{aA}	97.77

Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir. Aynı sütundaki istatistik farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistik farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir. % canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

4.1.2. *Enterococcus* suşlarının asit toleransı

Probiyotik bakterilerin asit toleransı sadece gastrik streslere dayanmak için değil, aynı zamanda bakterilerin yoğurt gibi yüksek asit taşıyıcı süt ürünlerinde sayılarında azalma olmadan daha uzun süre hayatta kalmasını sağlamaktadır (Angmo ve ark., 2016). Probiyotik bakteri seçiminde asidik koşullara karşı direnç önemli bir kriterdir. Probiyotik mikroorganizmalar, sindirim sisteminde safra tuzlarının konsantrasyonlarında ve midede asidik koşullarda ($pH < 3.0$) yaşayabilmelidir (Yerlikaya ve ark., 2019).

Enterococcus izolatlarının pH 2.5 ve 3.5 olan ortamda geliştirerek aside karşı toleransları test edilmiştir (Çizelge 4.3). Anliz sonucunda 13 *Enterococcus* izolatından 5'inin (28, 436, 270, 388 ve 258) pH 2.5 değerinde 2 saat sonrasında %66'dan fazla canlılık değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. pH 3.5 değerinde ise 2 saat sonunda tüm izolatların canlılık oranlarının %92.92-62.75 arasında değiştiği belirlenmiştir. Khalkhali ve Mojgani (2017), *Ent. faecium* ve *Ent. faecalis* izolatlarının 2.5 ve üzeri asidik pH değerlerine dirençli olduğunu ancak, pH 2 ve daha düşük asitlik değerlerinde canlılıklarını tamamen kaybettiklerini tespit etmiştir. Başka bir çalışmada, çiğ süt ve geleneksel süt ürünlerinden izole edilen *Enterococcus faecium* suşlarının tamamının, pH 2.5 ve 3.0 değerinde gelişebildiği ancak daha düşük pH değerlerinde ise toplam 12 suşun yalnızca 4 adedinin gelişim gösterdiği

bildirilmiştir (Yerlikaya ve ark., 2020). Ayrıca Nami ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada geleneksel süt ürünlerinden izole edilen *Enterococcus* izolatlarının asit toleransını incelemiş olup, test edilen tüm enterokok izolatlarının pH 2.5 değerinde % 10-81.6 oranında canlılık sağladığı belirtilmiştir. Baccouri ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada pH 3.0 değerinde 3 saatlik inkübasyon sonrasında *Ent. faecalis* OB14 ve *Ent. faecalis* OB15 suşlarının canlı kalma oranını sırasıyla %84.7 ve %97.3 olduğunu rapor etmiştir.

Çizelge 4.3: *Enterococcus* suşlarının asit toleransı sonuçları (ortalama $\pm$ standart sapma)

İzolat No	Asit Toleransı (log kob/mL)*					
	pH 2.5			pH 3.5		
	0. s	2. s	% canlılık	0. s	2. s	% canlılık
192	0.00 $\pm$ 0.00 ^c	00.0 $\pm$ 00.0 ^f	0	7.37 $\pm$ 0.07 ^c	6.83 $\pm$ 0.04 ^{bcd}	92.67
258	6.25 $\pm$ 0.01 ^a	4.14 $\pm$ 0.01 ^d	66.16	7.61 $\pm$ 7.61 ^{ab}	6.84 $\pm$ 0.01 ^{bc}	89.94
262	1.87 $\pm$ 2.64 ^{ab}	00.0 $\pm$ 00.0 ^f	0	7.18 $\pm$ 0.12 ^d	6.72 $\pm$ 0.00 ^d	93.66
270	5.59 $\pm$ 0.06 ^a	4.44 $\pm$ 0.01 ^c	79.41	7.03 $\pm$ 0.01 ^d	6.26 $\pm$ 0.08 ^e	89.04
427	4.92 $\pm$ 0.18 ^a	00.0 $\pm$ 00.0 ^f	0	7.51 $\pm$ 0.05 ^{bc}	6.93 $\pm$ 0.01 ^b	92.34
436	6.13 $\pm$ 1.90 ^a	5.23 $\pm$ 0.04 ^a	85.24	7.53 $\pm$ 0.03 ^{bc}	6.99 $\pm$ 0.01 ^a	92.83
455	4.04 $\pm$ 0.13 ^{ab}	0.00 $\pm$ 0.00 ^f	0	7.50 $\pm$ 0.00 ^{bc}	5.20 $\pm$ 0.00 ^f	69.33
656	00.0 $\pm$ 00.0 ^c	0.00 $\pm$ 0.00 ^f	0	7.67 $\pm$ 0.01 ^{ab}	4.81 $\pm$ 0.04 ^g	62.75
736	4.97 $\pm$ 0.08 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^f	0	7.42 $\pm$ 0.45 ^a	6.73 $\pm$ 0.01 ^d	90.63
1130	5.89 $\pm$ 0.03 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^f	0	7.61 $\pm$ 0.01 ^{ab}	6.96 $\pm$ 0.01 ^a	91.52
28	5.42 $\pm$ 0.04 ^a	5.11 $\pm$ 0.01 ^b	94.28	7.64 $\pm$ 0.04 ^{ab}	6.96 $\pm$ 0.01 ^a	91.03
367	5.42 $\pm$ 0.06 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^f	0	7.56 $\pm$ 0.04 ^{abc}	7.02 $\pm$ 0.00 ^g	92.92
388	4.13 $\pm$ 0.08 ^{ab}	3.21 $\pm$ 0.07 ^e	77.72	7.53 $\pm$ 0.01 ^{bc}	6.81 $\pm$ 0.01 ^{cd}	90.43

Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir. Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistiki farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir. % canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

4.1.3. *Enterococcus* suşlarının safra tuzuna toleransı

Analiz sonuçlarına göre tüm *Enterococcus* izolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarına karşı dirençli olduğu ve safra oranları arttıkça izolatların canlılık oranının azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

Yapılan çalışma sonucuna göre %1 safra tuzu oranında bulunan ortamda tüm test edilen *Enterococcus* izolatları dirençli tespit edilmiş olup canlılık oranları %95.09-80.20 arasında değişmiştir. Khalkhali ve Mojgani (2017), çalışmalarında *Enterococcus* izolatlarının safra toleransını analiz etmiş ve %1 safra konsantrasyonlarında canlılık oranının önemli oranda azaldığını tespit etmiştir. Başka bir çalışmada Yerlikaya ve ark. (2020), süt ürünlerinden izole edilen *Ent. faecium* suşları, test edilen tüm safra tuzları konsantrasyonlarına direnç göstermiş ve canlılıklarını korumuştur. Ayrıca Nami ve ark. (2019) çalışmalarında geleneksel süt ürünlerinden izole edilen *Enterococcus* izolatlarının %0.3 oranı safra içeren ortamda

incelemiştir, test edilen izolatların safraya karşı %9.1-79.8 arasında canlı kalabildiklerini tespit etmiştir. Özkan (2021), enterokok izolatlarının canlılık oranını %1 safra konsantrasyonunda %86.96-88.03 arasında rapor etmiştir.

Çizelge 4.4: *Enterococcus* suşlarının safra toleransı sonuçları (ortalama $\pm$ standart sapma)

İzolat No	Safra toleransı (% canlılık)				
	% 0.06	% 0.125	% 0.25	% 0.50	% 1
192	96.97 $\pm$ 1.27 ^{bcA}	91.17 $\pm$ 1.80 ^{aA}	93.66 $\pm$ 1.81 ^{abcA}	95.81 $\pm$ 2.48 ^{bcdA}	89.45 $\pm$ 2.38 ^{abcA}
258	99.56 $\pm$ 2.09 ^{abcA}	94.89 $\pm$ 2.41 ^{aA}	98.05 $\pm$ 2.68 ^{aA}	96.35 $\pm$ 0.52 ^{bcdA}	91.98 $\pm$ 2.58 ^{abcA}
262	96.15 $\pm$ 1.91 ^{bcA}	88.14 $\pm$ 2.65 ^{aB}	90.1 $\pm$ 2.65 ^{bcAB}	92.9 $\pm$ 0.79 ^{dAB}	85.77 $\pm$ 0.81 ^{bcdB}
270	94.38 $\pm$ 1.08 ^{cA}	90.76 $\pm$ 2.04 ^{aA}	91.75 $\pm$ 2.39 ^{abcA}	94.69 $\pm$ 0.66 ^{bcdA}	90.03 $\pm$ 1.98 ^{abcA}
427	93.43 $\pm$ 2.65 ^{cA}	90.82 $\pm$ 3.02 ^{aA}	92.86 $\pm$ 0.3 ^{abcA}	93.86 $\pm$ 3.01 ^{bcdA}	90.68 $\pm$ 1.76 ^{abcA}
436	98.69 $\pm$ 0.04 ^{abcA}	91.86 $\pm$ 0.21 ^{aB}	93.11 $\pm$ 0.56 ^{abcB}	93.5 $\pm$ 0.64 ^{cdB}	89.34 $\pm$ 0.41 ^{abcC}
455	96.7 $\pm$ 1.86 ^{bcA}	95.43 $\pm$ 0.17 ^{aA}	95.54 $\pm$ 0.49 ^{abA}	94.6 $\pm$ 0.17 ^{bcdA}	89.88 $\pm$ 0.38 ^{abcB}
656	100.88 $\pm$ 2.33 ^{abcA}	95.41 $\pm$ 1.66 ^{aA}	97.97 $\pm$ 0.37 ^{aA}	99.68 $\pm$ 2.04 ^{abA}	93.62 $\pm$ 2.37 ^{aA}
736	106.25 $\pm$ 1.82 ^{aA}	91.87 $\pm$ 1.83 ^{aB}	98.98 $\pm$ 0.39 ^{aAB}	104.42 $\pm$ 2.13 ^{aA}	92.38 $\pm$ 2.62 ^{abB}
1130	97.42 $\pm$ 2.43 ^{bcA}	88.39 $\pm$ 3.63 ^{aAB}	92.24 $\pm$ 0.72 ^{abcAB}	93.82 $\pm$ 0.05 ^{bcdAB}	84.65 $\pm$ 2.98 ^{cdB}
28	95.39 $\pm$ 2.00 ^{cA}	79.13 $\pm$ 1.57 ^{bB}	79.86 $\pm$ 2.17 ^{dB}	85.38 $\pm$ 0.69 ^{eB}	79.64 $\pm$ 1.6 ^{dB}
367	93.45 $\pm$ 2.63 ^{cAB}	91.2 $\pm$ 0.03 ^{aAB}	87.32 $\pm$ 2.69 ^{cdB}	94.63 $\pm$ 0.06 ^{bcdA}	80.2 $\pm$ 0.1 ^{dC}
388	102.67 $\pm$ 1.3 ^{abcA}	94.18 $\pm$ 1.23 ^{aB}	94.46 $\pm$ 3.14 ^{abcB}	99.1 $\pm$ 1.93 ^{abcAB}	95.09 $\pm$ 1.63 ^{aAB}

Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir. Aynı sütundaki istatistik farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistik farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir. % canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır

4.1.4. *Enterococcus* suşlarının *in vitro* şartlarda mide ve pankreas özsuyuna dayanımı

Probiyotiklerin sindirim koşullarında canlılıklarını koruyabilmesi temel özelliklerinden biridir. Potansiyel probiyotik bakterilerin, sindirim direnci *in vitro* testler ile belirlenmiştir. Test sırasında farklı asidik koşullar, sindirim inzimleri ve safra tuzu kullanılmıştır.

Yapılan mide ve pankreas özsuyuna tolerans analiz sonuçları çizelge 4.5'te verilmiştir. *Enterococcus* izolatlarının *in vitro* mide koşullarına dayanımı lizozim (10mg/L) ve pepsin (13.3 mg/L) içeren ve değeri pH 2.5 olan ortamda 3 saat inkübasyon sonunda belirlenmiştir. Test edilen tüm enterokok izolatların canlılık oranları %86.03 ile 69.15 arasında değişmektedir. *In vitro* bağırsak ortamı testinde ise pankreatin ve safra tuzu içeren pH değeri 8'e ayarlanmış ortamda 24 saat sonunda izolatların canlılık oranı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tüm *Enterococcus* izolatlarının pankreas özsuyuna dayanıklı olduğu tespit edilmiş olup, canlılık oranları %103.42-90.97 arasında değişmektedir.

Khalkhali ve Mojgani (2017), yaptıkları çalışma sonucunda *Ent. faecalis* TA102, suşunun canlılık oranlarının simüle mide ortamında bağırsak ortamı ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Nami ve ark. (2019), çalışmalarında *Enterococcus* izolatlarının tolerans profilini değerlendirmek için simüle *in vitro* mide suyu (pH 2.5)

zolatların canlılık değerinin %10.3-81.6 arasında değiştiği bildirilmiştir. Özkan (2021)'nin yürüttüğü, tez çalışmasında enterokok izolatları gastrik koşullara daha düşük bir direnç göstermiş olup elde edilen değerler %67.91-41.92 arasında değişmiştir. Tez çalışmasında elde edilen bulgular daha önce yürütülen çalışmalar ile benzerlik göstermiştir.

Çizelge 4.5: *Enterococcus* suşlarının mide ve pankreas özsuyu toleransı sonuçları (log kob/mL)

İzolat No	Mide özsuyu (pH 2.5)			Pankreas özsuyu (pH 8.0)		
	0. s	3. s	% canlılık	0. s	24. s	% canlılık
192	8.88±0.01 ^{fg}	6.9±0.13 ^c	77.75	9.22±0.06 ^{abcdef}	9.12±0.00 ^{abc}	98.92
258	9.02±0.03 ^{cde}	7.76±0.07 ^a	86.03	9.53±0.08 ^a	9.18±0.01 ^{ab}	96.27
262	8.86±0.03 ^g	6.94±0.04 ^c	78.51	8.89±0.01 ^f	8.93±0.01 ^{cd}	100.45
270	9.08±0.01 ^{cd}	7.48±0.07 ^b	82.38	9.09±0.08 ^{cdef}	8.96±0.04 ^{bcd}	98.57
427	8.89±0.04 ^{efg}	7.53±0.07 ^{ab}	84.7	9.28±0.09 ^{abcde}	9.15±0.04 ^{abc}	98.65
436	9.22±0.02 ^b	7.53±0.07 ^{ab}	80.45	8.92±0.14 ^{ef}	9.23±0.02 ^a	103.42
455	9±0.01 ^{def}	7.42±0.07 ^b	82.49	9.31±0.06 ^{abcd}	9.08±0.12 ^{abcd}	97.48
656	9.15±0.08 ^{bc}	7.42±0.07 ^b	83.97	9.44±0.11 ^{abc}	9.24±0.08 ^a	97.88
736	9.15±0.01 ^{bc}	7.31±0.05 ^b	79.88	9.32±0.03 ^{abcd}	8.87±0.11 ^d	95.17
1130	9.11±0.05 ^{bcd}	7.52±0.07 ^{ab}	82.59	9.45±0.19 ^{abc}	9.21±0.02 ^a	97.46
28	9.5±0 ^a	6.32±0.07 ^b	69.15	9.47±0.05 ^{ab}	8.61±0.01 ^e	90.97
367	8.98±0.04 ^{defg}	7.48±0.07 ^b	83.34	9.03±0.11 ^{def}	8.89±0.03 ^d	98.45
388	9.06±0.03 ^{cd}	7.52±0.07 ^b	83	9.15±0 ^{bcd}	8.86±0.04 ^d	96.78

Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir. Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistiki farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir. % canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır

4.1.5. *Enterococcus* suşlarının hidrofobisite özellikleri

Mikrobiyal hücre yüzeyi kimyası üzerine yapılan birçok çalışma, hücre yüzeyinde (glikol-) proteinli materyalin varlığının daha yüksek hidrofobikliğe yol açtığını, hidrofilik yüzeylerin ise polisakkaritlerin varlığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Collado ve ark., 2008). n-heksadekan'a bakteriyel yapışma, mikrobiyal hücreler ile mukus veya epitel hücreleri arasındaki ilk spesifik olmayan etkileşimde anahtar rol oynayan bakteri hücrelerinin yüzey hidrofobikliğini göstermektedir (Osmanagaoglu ve ark., 2010). Porobiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistemde kolonize olabilmek için bağırsak epitel hücrelerine sıkıca yapışması göstermektedir, aksi takdirde peristaltik hareketle dışarı atılmaktadırlar. Bu nedenle, n-heksadekan veya ksilen gibi polar çözücüler kullanılarak hücre yüzeyi hidrofobikliği, probiyotik mikroorganizmaların taramasında kullanılan çok önemli kriterlerden biridir. Lipoteikoik asit ve yüzey proteinleri bakımından zengin suşlar, daha yüksek hidrofilik polisakarit içeriğine sahip suşlara kıyasla daha hidrofobik özellik göstermektedir. Yüzey hidrofobikliği ne kadar yüksek olursa, hücrelerin konak dokuya yapışması o kadar yüksek olmaktadır (Rastogi ve ark., 2020). Mikroorganizmaların bağırsak epitel hücrelerine tutunabilme yeteneği, diğer mikroorganizmalarla rekabette avantaj sağladığı

için insan gastrointestinal kanalında bakteri varlığını sürdürmesi açısından oldukça önemlidir (Yerlikaya ve ark., 2020).

Bu çalışmada incelenen suşların hidrofobisite sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir. Analizi sonucunda tüm *Enterococcus* izolatları, n-hekzadekana karşı %2.23-75.78 ve ksilene karşı %2.19-21.7 arasında değişen değerlerde hidrofobisite değeri sergilemiştir. 736, 262 ve 192 kodlu izolatlar n-hekzadekana karşı en yüksek hidrofobik özellik gösteren suşlar olmuştur.

Mercha ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada deve sütünden elde edilen *Enterococcus durans* izolatları hidrofobisite aktivitesi değerleri %47.17-15.47 arasında tespit etmiştir. Başka bir çalışmada, Yerlikaya ve ark. (2020) süt ürünlerinden izole edilen *Enterococcus faecium* izolatlarının hidrofobisite değerini %87.35-35.60 arasında bildirilmiştir. Ayrıca, Ayyash ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada deve sütünden izole edilen *Enterococcus faecalis* izolatları hidrofobisite aktivitesi hekzadekan, ksilen ve oktan için sırası ile %0.5-7.6, %2.9-46.9 ve %2.7-58.7 olarak rapor etmiştir. Başka bir çalışmada, Nami ve ark. (2019), yaptıkları geleneksel süt ürünlerinden izole edilen *Enterococcus* izolatlarının hücre yüzeyi hidrofobiklik oranı $23,3 \pm 1,6$ ile $58,6 \pm 2,3$ arasında değiştiğini belirlenmiştir.

4.1.6. *Enterococcus* suşlarının otoagregasyon yeteneği

Otoagregasyon, bakteri hücrelerinin aynı tür arasında kümeleşmesini ifade etmektedir. Probiyotik suşların gastrointestinal sistemindeki kalıcılığı ve kolonizasyonu ile epitel hücrelere yapışma kapasitesi arasındaki güçlü bir bağlantı bulunmaktadır (Zommiti ve ark., 2018). Otoagregasyon, probiyotik bakterilerin bağırsakta kolonizasyonuna yardımcı olan ve patojen bakterilerin yapışmasını önleyen biyofilm oluşumu için önemli bir kriterdir (Vidhyasagar ve Jeevaratnam, 2013).

Enterococcus izolatların otoagregasyon yeteneğine ait veriler Çizelge 4.6'da sunulmuştur. *Enterococcus* izolatlarının otoagregasyon yeteneğinin üç saatlik inkübasyon sonunda %1.64-11.97 arasında 24 saatlik inkübasyon sonunda ise %5.74-22.39 arasında değiştiği bildirilmiştir.

Nami ve ark. (2019), geleneksel süt ürünlerinden izole edilen *Enterococcus* izolatlarının hücre oto-agregasyon oranlarını %24.7-81.2 arasında tespit etmiştir. Mercha ve ark. (2020), yaptıkları çalışmada deve sütünden izole edilen *Ent. durans* bakterisinin otoagregasyon değerini %13,44-37,63 arasında değiştiğini göstermiştir. Başka bir çalışmada ise enterokok izolatlarının otoagregasyon yeteneğinin %15.87-43.19 ve 24 saat sonunda ise %15.87-43.19 arasında olduğu bildirilmiştir (Özkan, 2021).

Çizelge 4.6: *Enterococcus* suşlarının % hidrofobisite ve % otoagregasyon sonuçları.

İzolat No	Hidrofobisite (%)		Otoagregasyon (%)	
	n-hekzadekan	ksilen	3. s	24. s
192	40.08±5.48 ^{abc}	7.63±0.74 ^{bc}	4.67±1.38 ^a	7.68±0.06 ^b
258	18.28±4.1 ^c	3.00±4.07 ^c	1.64±4.26 ^a	5.74±1.06 ^b
262	73.53±4.61 ^{ab}	3.79±2.29 ^c	3.42±4.66 ^a	6.05±3.14 ^b
270	4.53±4.26 ^c	20.44±1.35 ^{ab}	8.82±10.61 ^a	11.91±4.86 ^{ab}
427	22.42±0.00 ^c	12.34±1.37 ^{abc}	4.53±0.22 ^a	10.63±6.7 ^{ab}
436	31.06±13.09 ^{abc}	4.09±2.29 ^c	2.13±1.96 ^a	9.41±2.52 ^{ab}
455	2.32±0.15 ^c	4.01±1.00 ^c	8.02±0.97 ^a	7.04±8.08 ^b
656	2.23±1.29 ^c	2.19±0.04 ^c	2.21±2.51 ^a	11.86±2.52 ^{ab}
736	75.78±9.94 ^c	20.98±9.18 ^{ab}	2.23±1.32 ^a	22.39±4.12 ^a
1130	2.47±1.99 ^c	6.13±0.04 ^c	4.48±0.18 ^a	11.36±3.03 ^{ab}
28	4.59±0.92 ^c	5.23±0.81 ^c	11.97±4.03 ^a	10.42±2.25 ^{ab}
367	27.97±38.52 ^c	21.7±5.89 ^a	3.35±3.65 ^a	11.54±1.33 ^{ab}
388	15.58±3.78 ^c	15.81±2.00 ^{abc}	1.86±0.63 ^a	12.75±1.54 ^{ab}

Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.

Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistiki farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir.

% canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

4.2. *Enterococcus* Bakterilerinin Fonksiyonel Özellikleri

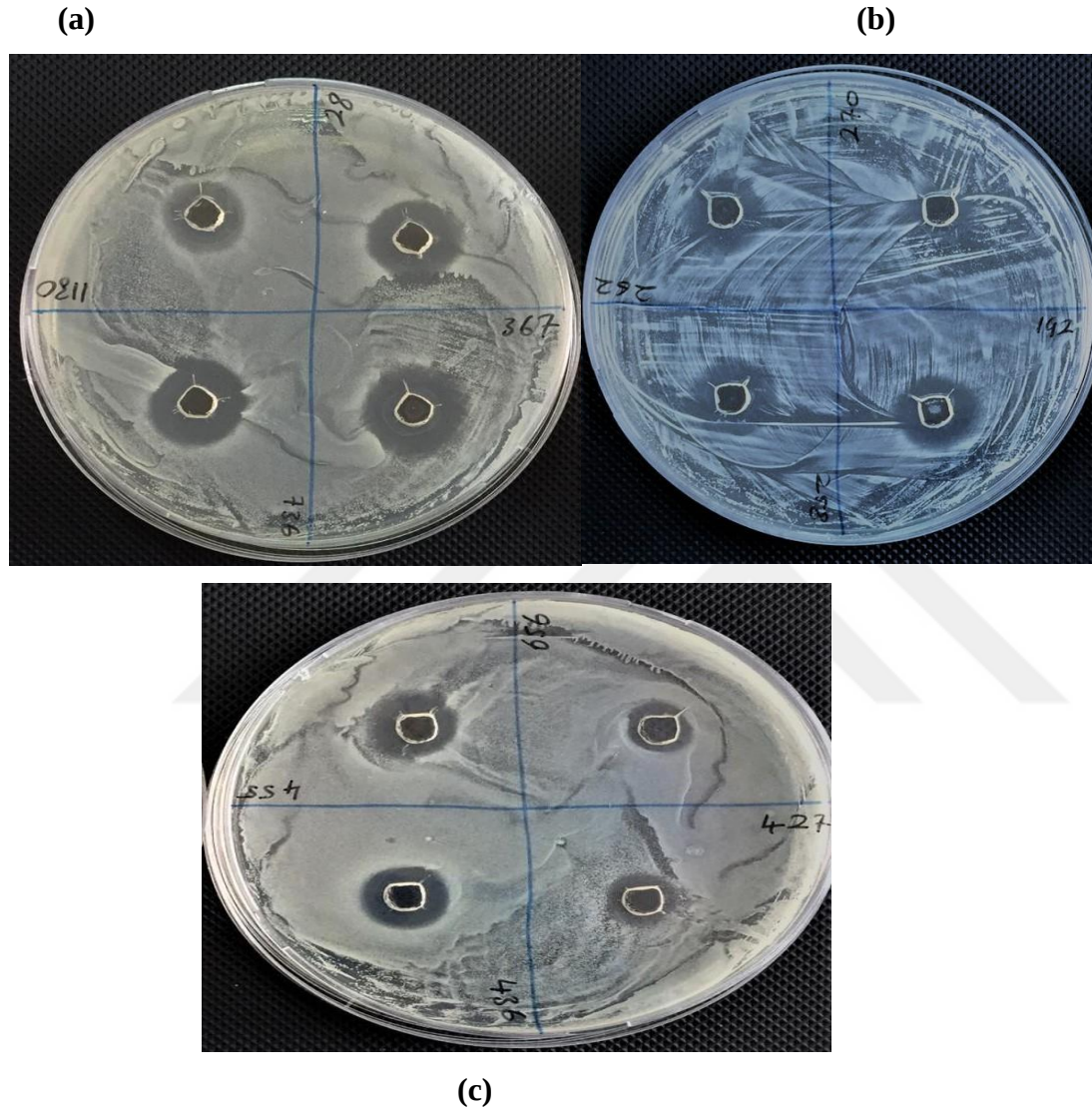
4.2.1. *Enterococcus* suşlarının antibakteriyel özellikleri

Probiyotiklerin antibakteriyel aktivitesi üretilen organik asitlerden, düşük ortam pH içeriğinden besin rekabetinden veya bakteriyosin üretiminden kaynaklanabilmektedir (Pundir ve ark., 2013). Bunun dışında probiyotikler kısa yağ asitleri, hidrojen peroksit ve karbondioksit gibi antibakteriyel bileşikler üreterek de patojenik organizmalara karşı etkili olmaktadır (Adesulu-Dahunsi ve ark., 2018).

Enterococcus izolatlarının antibakteriyel aktivite değerleri çizelge 4.7’de verilmiştir. Antibakteriyel etki sonuçlarına göre 270 ve 427 no’lu *Enterococcus* izolatları haricinde test edilen tüm izolatlar *B. cereus* ATCC 11778’e karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre tüm *Enterococcus* izolatları indikatör olarak kullanılan *Salm. Typhimurium* ATCC 14028 ve *E. coli* ATCC 25922 patojen bakterilerine karşı inhibisyon zonu göstermemiştir. Bununla birlikte tüm izolatlar *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *Staph. aureus* ATCC 25923’e karşı inhibisyon zonu göstermiş olup antibakteriyel aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir (şekil 4.2).

Khalkhali ve Mojgani (2017), yaptıkları çalışmada anne sütünden izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *Staph. aureus* patojen bakterilerin gelişimin karşı inhibitör etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca bunların *E. coli* sonuçları dışında yaptığımız çalışma sonuçlarına benzerlik göstermiştir. Başka bir çalışmada, Nami ve ark. (2019) geleneksel süt ürünlerinden izole edilmiş *Enterococcus* izolatlarının

Staph. aureus, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *B. subtilis* gibi önemli patojenik mikroorganizmalara karşı inhibitör etkisini göstermiştir.



Şekil 4.2: *Enterococcus* izolatlarının, *Staph. aureus* ATCC 25923 (a), *B. cereus* ATCC 11778 (b) ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 (c) indikatör mikroorganizmaya karşı gösterdikleri antibakteriyal aktivitenin petri kutusundaki fotoğraf görüntüsü.

Çalışmada seçilen yedi izolatın *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* gibi kullanılan hedef patojenlerin gelişmesini inhibe etme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.7. *Enterococcus* suşlarının antibakteriyal aktivite ve bakteriyosin sonuçları

İzolat No	Antibakteriyal Aktivite*					Bakteriyosin Üretimi**
	<i>Salm. Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Staph. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 25922	
192	0.00±0.00	12.75±0.35 ^a	13.25±0.35 ^{ab}	12.75±0.35 ^{cd}	0.00±0.00	-
258	0.00±0.00	9.25±0.35 ^{cde}	12.25±0.35 ^{bc}	14.75±0.35 ^{abc}	0.00±0.00	-
262	0.00±0.00	8.25±0.35 ^e	10.50±0.71 ^{cd}	14.75±0.35 ^{abc}	0.00±0.00	-
270	0.00±0.00	12.50±0.71 ^{ab}	8.50±0.71 ^d	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00	-
427	0.00±0.00	11.25±0.35 ^{abc}	10.50±0.71 ^{cd}	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00	-
436	0.00±0.00	11.50±0.71 ^{ab}	12.25±0.35 ^{bc}	14.5±0.71 ^{bcd}	0.00±0.00	-
455	0.00±0.00	9.25±0.35 ^{cde}	8.50±0.71 ^d	12.5±0.71 ^{de}	0.00±0.00	-
656	0.00±0.00	8.50±0.71 ^{de}	8.50±0.71 ^{cd}	14.5±0.71 ^{bcd}	0.00±0.00	-
736	0.00±0.00	11.50±0.71 ^{ab}	15.50±0.71 ^a	16.5±0.71 ^{ab}	0.00±0.00	-
1130	0.00±0.00	11.25±0.35 ^{abc}	13.50±0.71 ^{ab}	14.5±0.71 ^{bcd}	0.00±0.00	-
28	0.00±0.00	10.50±0.71 ^{bcd}	14.50±0.71 ^{ab}	16.75±0.35 ^a	0.00±0.00	-
367	0.00±0.00	12.25±0.35 ^{ab}	15.50±0.71 ^a	14.75±0.35 ^{abc}	0.00±0.00	-
388	0.00±0.00	10.50±0.71 ^{bcd}	12.50±0.71 ^{bc}	10.5±0.71 ^e	0.00±0.00	-

Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir. Aynı sütundaki istatistik farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistik farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir. % canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır. **(-): üretim yok; (+): zayıf; (++) : orta; (+++): kuvvetli üretim.

4.2.2. *Enterococcus* suşlarının bakteriyosin üretimi

Bakteriyosin üretimi *Enterococcus* suşları için rapor edilen önemli bir biyoteknolojik özelliktir (Khalkhali ve Mojgani, 2017). *Enterococcus* suşlarının bakteriyosinler de dahil olmak üzere antimikrobiyal bileşikler ürettiği rapor edilmiştir. Bakteriyosin üretimi, çok çeşitli gıda ürünlerinin korunması için uygulanmıştır ve artık probiyotik bir özellik olarak kabul edilmektedir (Hanchi ve ark., 2018). Enterokoklarla ilişkili birçok bakteriyosin tanımlanmış olup bunlar enterosin B, enterosinler L50A ve L50B, enterosin A, enterosin P olarak belirtmiştir. *Enterococcus* tür/suşları tarafından üretilen enterosinler, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus spp.* gibi patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Bu nedenle enterokoklar, biyokoruyucu veya koruyucu kültürler olarak süt uygulamaları için bir potansiyel de göstermektedir göstermektedir (A. Ahmadova ve ark., 2013).

Çalışmada incelenen *Enterococcus* izolatlarının bakteriyosin üretimi sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hiç bir *Enterococcus* izolatında bakteriyosin üretimi tespit edilememiştir. Ancak izolatların sergilediği antibakteriyel etkinin hidrojen peroksit, asit veya diğer inhibitör maddeler üretmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer sonuç, Özkan (2021) yaptığı çalışma sonuçlarında *Enterococcus* izolatlarının hiçbirinde bakteriyosin üretimi tespit edilememiştir. Başka bir çalışmada, Ghrairi ve ark. (2008) peynirden izole edilen yeni bir suş olan *Ent. faecium* MMT21’in, *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *S. aureus* dahil olmak üzere çeşitli gıda bozulma bakterilerine ve gıda kaynaklı

patojenlere karşı aktif olan inhibitör maddeler ürettiğini rapor etmiştir. Araştırmacılar bu yeni suşun antibakteriyel etkisinin bakteriyosinlerden kaynaklandığını bildirmiştir. Khalkhali ve Mojgani (2017), yaptıkları çalışmada *Ent. faecium* ve *Ent. faecalis* izolatların Gram-pozitif ve Gram-negatif patojen bakterilerine karşı geniş antibakteriyel özelliği olduğunu belirlenmiştir. Çalışmadaki iki *Enterococcus* suşu tarafından üretilen antagonistik ajanın fiziko-kimyasal karakterizasyonları sırasında, izolatların uyguladığı antibakteriyel etkilerin asitlere veya hidrojen peroksite bağlı olmadığı tespit etmiştir..

4.2.3. *Enterococcus* suşlarının β -galaktosidaz aktivitesi (MU)

β -galaktosidaz aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.8' de verilmiştir. Bu çalışmada elde edilen enterokok izolatları β -galaktosidaz aktivitesinin 13.64-5.17 MU arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre β -galaktosidaz aktivitesinin nispeten düşük olduğu belirlenmiştir. Benzer sonuçlar, Özkan (2021) yaptığı tez çalışmasında enterokoklar izolatları düşük β -galaktosidaz aktivitesi göstermiş olup elde edilen en yüksek değer olarak 15.77 MU belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, *Ent. faecium* EM485 ve *Ent. faecium* EM925 suşlarının β -galaktosidaz üretimi o-nitrofenil- β -D-galaktopiranoz (ONPG Disks, Fluka, Buchs, İsviçre) emdirilmiş diskleri kullanılarak onaylanmıştır (dos Santos ve ark., 2015). Ayrıca, Favaro ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada *Ent. faecium* 'a ait 4 farklı suşun, β -galaktosidaz aktivitesi gösterdiği ve bu özelliğin endüstriyel peynir üretiminde çok faydalı olabileceği rapor edilmiştir.

4.2.4. *Enterococcus* suşlarının kolesterol asimilasyonu

Probiyotik bakterilerin serum kolesterolünü düşürücü etkleri birçok mekanizma sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu mekanizmalar kısa zincir yağ asidi (SCFA) fermantasyonunun son ürünlerinin fizyolojik etkilerini, bakteriyel hücre duvarına kolesterol bağlanmasını ve safra asitlerinin enzimatik dekonjugasyonunu içermektedir. Safra asitlerinin bağırsak bakterileri tarafından dekonjugasyonu, bunların atılma oranlarını artırır ve bu nedenle karaciğer tarafından safra asitlerinin *de novo* sentezi için daha yüksek kolesterol talebi ortaya çıkar. Bunun sonucunda ise serum kolesterolünde bir azalma meydana gelmektedir (Pereira ve Gibson, 2002).

Serum kolesterolüne ait analiz sonuçları Çizelge 4.8'de sunulmuştur. Analiz sonuçlarına göre tüm *Enterococcus* izolatlarının kolesterol asimilasyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. İzolatların kolesterol indirgeme kapasitesinin %6.59-49.91 arasında değiştiği tespit edilmiştir. 24 saat sonunda en yüksek ve en düşük serum kolesterol serum kolesterol indirgeme kabiliyeti sırasıyla 270 ve 455 no'lu izolatta tespit edilmiştir.

Nami ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada geleneksel yöntemle üretilen süt ürünlerinden izole edilen *Enterococcus* suşlarında 20 saatlik inkübasyon sonucunda serum kolesterolünün asimilasyonu tespit edilmiştir. *Enterococcus durans* suşlarında bu değer 175.38 ve 172.23-216.45 mg/mL arasında ve *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* suşlarında ise 123.63-145.23 mg/mL arasında tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, deve sütünden izole edilen *Enterococcus* izolatlarının kolesterol asimilasyonu *in vitro* olarak %35.4-43.1 seviyesinde tespit edilmiştir (Ayyash ve ark., 2018). Ayrıca, Sakandar ve ark. (2018) tarafından incelendiği çalışmada doğal olarak fermente edilmiş ekşi hamurdan (Khamir) izole edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarının kolesterol düşürebilme yeteneği %24.17-39.41 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8: *Enterococcus* suşlarının β -galaktosidaz aktivitesi, kolesterol asimilasyon yeteneği ve EPS üretim sonuçları

İzolat No	β -gaktosidaz Aktivitesi (MU)	Kolesterol Asimilasyonu (%)	EPS üretimi (μ g/mL)
192	9.04 $\pm$ 0.23 ^{bc}	36.95 $\pm$ 3.34 ^{ab}	15.57 $\pm$ 0.42 ^g
258	5.84 $\pm$ 0.80 ^{de}	22.41 $\pm$ 10.56 ^{abcd}	50.71 $\pm$ 2.55 ^{efg}
262	5.17 $\pm$ 0.71 ^e	12.97 $\pm$ 8.34 ^{bcd}	184.21 $\pm$ 39.3 ^c
270	6.37 $\pm$ 0.71 ^{de}	41.67 $\pm$ 0.00 ^a	9.52 $\pm$ 0.05 ^g
427	7.70 $\pm$ 0.14 ^{cd}	33.02 $\pm$ 0.00 ^{abc}	96.73 $\pm$ 1.59 ^{de}
436	13.64 $\pm$ 2.95 ^a	7.47 $\pm$ 0.56 ^{cd}	283.34 $\pm$ 4.25 ^b
455	10.14 $\pm$ 0.48 ^b	5.50 $\pm$ 2.22 ^d	37.65 $\pm$ 2.87 ^{fg}
656	7.10 $\pm$ 0.33 ^{cde}	28.69 $\pm$ 1.67 ^{abcd}	18.20 $\pm$ 0.21 ^g
736	6.80 $\pm$ 0.00 ^{de}	20.05 $\pm$ 12.79 ^{abcd}	123.52 $\pm$ 1.33 ^d
1130	12.67 $\pm$ 0.57 ^a	24.76 $\pm$ 11.67 ^{abcd}	335.16 $\pm$ 0.00 ^b
28	6.60 $\pm$ 1.13 ^{de}	31.84 $\pm$ 0.56 ^{abc}	456.82 $\pm$ 3.19 ^a
367	6.04 $\pm$ 0.05 ^{de}	34.20 $\pm$ 6.11 ^{ab}	220.64 $\pm$ 33.45 ^c
388	6.63 $\pm$ 0.14 ^{de}	39.70 $\pm$ 1.67 ^a	76.07 $\pm$ 1.06 ^{def}

Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir. Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistiki farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir. % canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

4.2.5. *Enterococcus* suşlarının ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

LAB tarafından hücre duvarı dışında üretilen polisakkaritler EPS olarak sınıflandırılmaktadır. Bunlar yapışkan bir tabaka oluşturmakta ve kapsüler polisakkaritler olarak adlandırılmaktadır. Bakteriyel EPS, üretici mikroorganizma tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmamaktadır. EPS bakteri hücrelerini, kuruma, faj saldırısı, antibiyotikler, toksik bileşikler veya ozmotik strese karşı korumaktadır. EPS ayrıca hücre tanımada, yüzeylere yapışmada ve çeşitli ekosistemlerin kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilmlerin oluşumunda rol oynamaktadırlar. LAB, EPS sentezi yoluyla fermente ürünlerin dokusunu ve viskozitesini geliştirmeye de katkıda bulunabilmektedir (Ruas-Madiedo ve ark., 2002). EPS üreten bakterilerin kullanılması, fermente ürünlerde kullanılan hidrokoloid katkı maddelerinin yerini

olarak maliyetin düşürülmesine yardımcı olabilmektedir (Aspri ve ark., 2017). *Enterococcus* izolatlarının EPS üretim miktarları çizelge 4.8’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre tüm *Enterococcus* izolatlarının EPS üretebildiği ve bu miktarın 9.52-456.82 µg/mL arasında değişmektedir. *Enterococcus* izolatları 28, 1130, 436, 367, 262 ve 736 no’lu olanların ekzopolisakkarit üretimleri sırasıyla 456.82, 335.16, 283.34, 220.64, 184.21 ve 123.52 µg/mL ile en yüksek miktarda olduğu tespit edilirken 565, 192 ve 270 no’lu izolatlar ise sırasıyla 18.20, 15.57 ve 9.52 µg/mL ile diğer izolatlara göre en düşük EPS üretimini gerçekleştirmişlerdir.

Nami ve ark. (2019), yaptıkları çalışma sonuçlarında, test edilen tüm *Enterococcus* izolatlarının EPS üretme yeteneği sergilediğini göstermiştir. Başka bir çalışmada, eşek sütünden izole edilen enterokok bakterilerin %36’sının EPS üretebildiği belirlenmiştir (Aspri ve ark., 2017). Ayrıca Özkan (2021), yaptığı çalışmada enterokok izolatlarının 531.17 ile 217.26 µg/mL arasında EPS üretebildiğini bildirmiştir. Öte yandan Ayyash ve ark. (2018), inceledikleri deve sütünden izole edilen 4 *Ent. faecium* suşunun EPS üretebileceğini öne sürmüştür.

4.3. *Enterococcus* Bakterilerinin Güvenlik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Virülans faktörlerin varlığı nedeniyle *Enterococcus* Nitelikli Güvenlik Varsayımı (QPS) tarafından güvenli olduğuna karar verilmemiştir. *Enterococcus* bakterilerinin güvenilirlikleri ile ilgili kararlar, suşa bağlı virülans faktörlerinin taranmasına dayalı olarak vaka bazında verilir. Bununla birlikte, enterokoklarda potansiyeli belirleyen virülans faktörlerinin belirli kombinasyonları ile ilgili mevcut bilgilerin hala sınırlı olduğu belirtilmelidir (Câmara ve ark., 2020). Hemoliz, jelatinaz, DNaz aktivitesi ve biyojenik amin sentez kapasitesi, gıda üretiminde kullanılan LAB'de olmaması gereken özelliklerdir. İnsanlardan izole edilmemiş suşlar için güvenlik yönlerinin değerlendirilmesi zorunludur (dos Santos Leandro ve ark., 2021). Hemolizin-sitolisin, yapışkan maddeler veya antibiyotik direnci gibi bir dizi enterokokal virülans faktörü, gen değişimi mekanizması ile aktarılabilir. Genellikle bir plazmidin feromonları, antibiyotik direncini ve virülans faktörlerin kodlayan genleri içermesi söz konusudur. Bu nedenle, tüketici güvenliği göz önüne alındığında, gıdalardan izole edilen *Enterococcus* cinsi suşlarında virülans faktörlerinin varlığının (minatörü) izlenmesi makul görünmesi gerekmektedir (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017).

4.3.1. *Enterococcus* suşlarının antibiyotik direnci

Probiyotik suşlar için önemli bir gereksinim, bulaşıcı antibiyotik direnç genleri taşımamasıdır. Bu genleri barındıran bakterilerin gıda endüstrisinde kullanılması istenmeyen bir durumdur. Bağırsaktaki farklı bakterilere yatay gen transferi, yeni antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların gelişmesine yol açabilmektedir (Turchi ve ark., 2013). Bakterilerin antibiyotik direnci, giderek endişe verici bir tıbbi sorun haline gelmiştir. Patojenik bakterilerin tıbbi açıdan önemli antibiyotiklere karşı çoklu ilaç direnci, enfekte hastaları tedavi etmek amacıyla kritik bir tehdit ve aşılması gereken ciddi bir zorluk haline gelmiştir. Bu nedenle, antibiyotik duyarlılığı probiyotikler için çok önemli bir ön koşulu temsil etmektedir. Güvenlik değerlendirmesine yönelik Nitelikli Güvenlik Varsayımı (QPS) yaklaşımı, suşun kimliğinin kesin olarak belirlenmesini ve suşun, insan ve hayvan açısından önemli antibiyotiklere karşı herhangi bir kazanılmış direnç göstermediğine dair kanıt gerektirmektedir (ZommitiBouffartigues ve ark., 2018). Gıdalardaki probiyotik mikroorganizmaların güvenilirliği ile ilgili olarak, FAO/WHO kılavuz bilgileri, probiyotik suşların bilinen antibiyotik direnç profillerine sahip olduğunu belirtmektedir.

Enterococcus izolatlarının antibiyotik direncine ait sonuçlar Çizelge 4.9'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre tüm *Enterococcus* izolatları kanamisin ve streptomisin antibiyotiğine karşı dirençli olduğunu tespit edilmiştir. Vankomisine karşı 656 ve 28 no'lu izolatlar yarı-hassas direnç gösterirken diğer izolatlar hassas olarak değerlendirilmiştir. 565 no'lu izolat dışında tüm izolatlar penisiline karşı hassastır. 258, 455, 656 ve 1130 no'lu izolatlar eritromisin antibiyotiğine karşı diğer izolatlara göre direnç gösterdiği tespit edilmiştir. 258 ve 367 no'lu izolatların, haricinde diğer tüm izolatlar amfisiline karşı hassasiyet gösterdiği belirlenmiştir. 270, 427, 656, 736 ve 388 no'lu izolatlar tetrasiklin antibiyotiğe karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir. Gentamisin antibiyotiğine karşı 262, 436, 736 ve 28 haricinde tüm izolatların dirençli olduğunu belirlenmiştir. (Şekil 4.3).

Çizelge 4.9: *Enterococcus* suşlarının antibiyotik dirençlerine ait sonuçlar

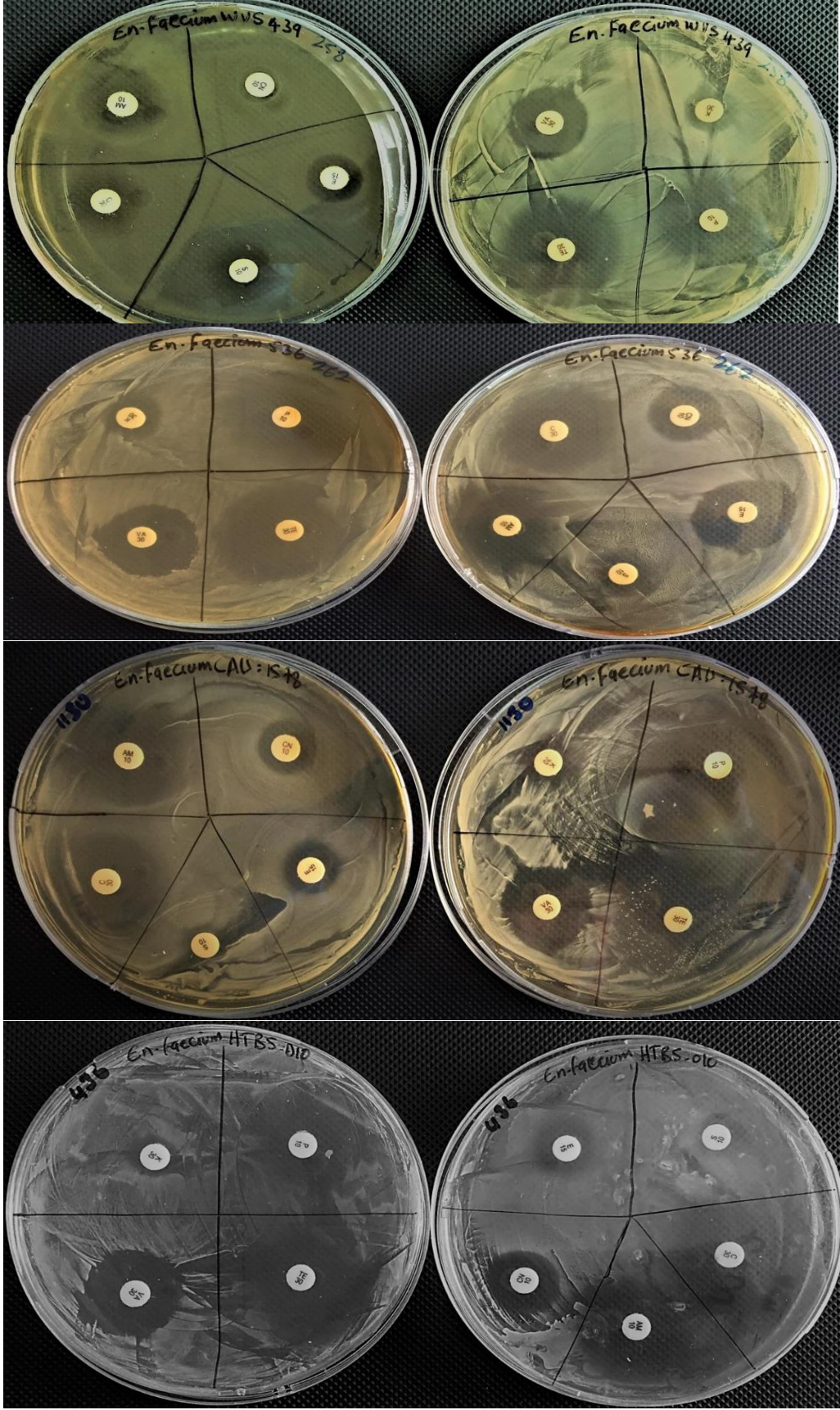
İzolat No	AM	C	E	CN	K	P	S	TE	VA
<i>Enterococcus</i> spp.	192	H	H	YH	D	D	H	D	H
	258	D	YH	D	D	D	H	D	H
	262	H	H	YH	H	D	H	D	H
	270	H	H	YH	D	D	H	D	H
	427	H	H	YH	D	D	H	D	H
	436	H	H	YH	H	D	H	D	H
	455	H	H	D	D	D	H	D	H
	656	H	H	D	H	D	D	D	YH
	736	H	H	YH	YH	D	H	D	H
	1130	H	H	D	D	D	H	D	YH
	28	H	H	YH	YH	D	H	D	H
	367	D	D	YH	D	D	H	D	YH
	388	H	H	YH	D	D	H	D	H

AM: amfisilin (10 µg); C: kloramfenikol (30 µg); E: eritromisin (15 µg); CN: gentamisin (10 µg); K: kanamisin (30 µg); P: penisilin (10 U); S: streptomisin (10 µg); TE: tetrasiklin (30 µg); VA: vankomisin (30 µg).

D:dirençli. YH: yarı hassas. H: hassas

Iweriebor ve ark. (2015), çalışmalarında, süt sığırlarından izole edilen *Enterococcus* suşlarının antibiyotik direncini antibiyotik diskleri kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine (CLSI, 2014) göre değerlendirmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tüm suşlar (toplam 341 suş) vankomisine karşı direnç gösterirken streptomisine karşı tüm suşların %94'ü ve eritromisine karşı ise %99'unun dirençli olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, Baccouri ve ark. (2019), Ayrıca yine aynı çalışmada *Ent. faecalis* OB14 suşunun tetrasikline direnç gösteren genler barındırdığını belirlenmiştir. Cebrián ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada *Ent. faecalis* 10 suşun düşük seviyelerde gentamisinine dirençli olduğu gösterirken, vankomisin gibi klinik olarak ilgili antibiyotiklerin çoğuna duyarlılığını doğrulamaktadır. Aspri ve ark. (2017), enterokokların güvenlik değerlendirmesi için en önemli faktörün vankomisin direnci olduğunu bildirmiş ve test ettiği suşlardan %96'sının vankomisine duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Ayrıca test edilen tüm izolatların kloramfenikol ve amfisiline karşı duyarlılık gösterirken, izolatların %46'sının penisiline hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir. Enterokoklar genellikle gentamisin ve streptomisin gibi aminoglikozitlere karşı içsel dirence sahip olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, izolatların %100 yukarıda belirtilen antibiyotikler her ikisine de dirençli olduğunu doğrulamıştır. Tetrasiklin antibiyotiği hayvanların tedavisinde yaygın olarak kullanılması, *Enterococcus* arasında sıklıkla bulunan yüksek düzeyde tetrasiklin direncinin olası bir açıklamasıdır. Yapılan bu çalışmada izolatların %54'ü bu antibiyotiğe dirençli, %33'ü yarı hassas ve %13 hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.3: *Enterococcus* izolatlarının antibiyotiklere karşı oluşturdukları zon görüntüsü

4.3.2. *Enterococcus* suşlarının hemolitik aktivitesi

Hemolitik aktivite testi, probiyotik bakterilerin güvenliği için ön koşulu olarak çok önemlidir, çünkü birçok organizma, insan veya hayvan hücrelerinin kısmen veya tamamen parçalanmasını indükleyen eksotoksinleri sentezleyebilmektedir (Escamilla-Montes ve ark., 2015). Hemolitik aktivite genellikle α , β veya γ olarak tanımlanır; bunlar hemoliz varlığında veya yokluğunda uygulanmaktadır. β hemolitik aktiviteye sahip mikrobiyal suşlar α - ve γ -hemolitik aktiviteye sahip olanların aksine, kan hücrelerini parçalayan toksinler (hemolizinler) üretir ve böylece konağın bağışıklık sistemini etkilemektedir (Cámara ve ark., 2020).

Yapılan çalışmada *Enterococcus* izolatlarının hemolitik aktivite sonuçları Şekil 4.5'te verilmiştir. Bu analizde %5 defibrin koyun kanı içeren 'blood agar' kullanılarak test edilmiştir. Test edilen izolatların etrafında yeşil zon (α) *E. coli* ATCC 25922'nin geliştiği ortamda veya berrak zon (β) *Staph. aureus* ATCC 25923'ün bulunduğu ortamlarda hemolitik aktiviteye sahip olup bir dezavantaj olarak kabul edilmektedir.



Şekil 4.4: *E. coli* ATCC 25922 (α -hemoliz) ve *Staph. aureus* ATCC 25923 (β -hemoliz) patojenlerinin hemolitik aktivite görüntüleri

Elde edilen sonuçlara göre test edilen izolatların etrafında zon oluşumu gözlenmemiştir. Khalkhali ve Mojgani (2017), yaptıkları çalışmada anne sütünden izole edilen *Ent. faecium* ve *Ent. faecalis* izolatların α hemoliz ve γ -hemoliz gösterdiği tespit

edilmiştir. Öte yandan, Baccouri ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada *Ent. faecalis* OB14 ve *Ent. faecalis* OB15 suşları, % 5 koyun kanı içeren Columbia agar kullanılarak hemolitik aktivitesi olup olmadığını test etmiş ve hemoliz inhibitörü göstermediğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Ayyash ve ark. (2018), çalışmalarının sonuçlarında, *Ent. faecium* 77, 71, 64 ve 31 izolatlarının hiçbir β -hemolitik aktivite göstermediğini ortaya koymuşlardır.



Şekil 4.5: *Enterococcus* izolatlarına ait hemolitik aktivite görüntüleri (γ -hemoliz)

4.3.3. *Enterococcus* suşlarının biyojen amin üretimi

LAB, fermentasyon sırasında dekarboksilaz veya deaminaz aracılığıyla amino asitleri biyojenik aminlere dönüştürebilmektedir. Biyojen amin varlığı fermente gıdaların kalitesini ve güvenliğini tehlikeye sokabilmektedir. Biyojen amin ile ilgili genlerin tanımlanması, LAB'nin toksik potansiyelinin belirlenmesi açısından önemlidir. Toksik etki yaratması açısından gıdalar için limit biyojen amin içeriği 100 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir (Perin ve

ark., 2014). Biyojen amin genlerinin olmaması, starter ve yardımcı kültürlerde kullanım için bir suşun önemini vurgulamaktadır (Khalkhali ve Mojgani, 2017).

Çizelge 4.10: *Enterococcus* sp. tür/suşlarının biyojen amin üretimi

İzolat No	L-arjinin	L-lisin	L-tirosin	L-ornitin
<i>Enterococcus</i> spp.				
192	-	-	-	-
258	-	-	-	-
262	-	-	-	-
270	-	-	-	-
427	-	-	-	-
436	-	-	-	-
455	-	-	-	-
656	-	-	-	-
736	-	-	-	-
1130	-	-	-	-
28	-	-	-	-
367	-	-	-	-
388	-	-	-	-

(-): üretim yok, (+): üretim var.

Bu tez çalışmasında elde edilen biyojen amin üretimi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir. Çalışmada incelediğimiz tüm *Enterococcus* izolatları kullanılan besiyer renginde değişim gözlenmemiş olup biyojen amin üretimi yeteneği olmadığı tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar Khalkhali ve Mojgani (2017), tarafından yapılan çalışma sonucunda, test edilen *Enterococcus* izolatlarının genomunda belirli genlerin görünmediğini ve iki izolatında BA negatif olarak kabul edilmiştir. Başka bir çalışmada, Aspri ve ark. (2017), Joosten ve Northold dekarboksilaz besiyerinde *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının histidin veya ornitin üzerinde herhangi bir dekarboksilaz aktivitesi göstermediğini bulmuşlardır. Ancak tirozin üzerindeki dekarboksilaz aktivitesi, 7 günlük inkübasyondan sonra suşların %75'inde bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Olvera-García ve ark. (2018) çeşitli peynirlerde putresin, kadaverin ve tiramid konsantrasyonunu 0.1 mg/kg değerinin altında tespit etmiştir. Bu nedenle özel peynirde enterokok suşları tarafından BA üretiminin çok düşük olduğu değerlendirilmiştir. Perin ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada dekarboksilaz üretimi için kodlayıcı genlere sahip olduğu bildirilen enterokok putresin, histamin, kadaverin veya spermidin üretmediğini belirlemiştir. Ancak 7 enterokok suşu tiramin ve 3 suş ise 2-feniletilamin üretim yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada *Enterococcus* suşları tarafından üretilen BA miktarlarının düşük olduğu da not edilmiştir.

4.3.4. *Enterococcus* suşlarının virülans faktörleri

Enterococcus suşlarının fırsatçı patojen olarak görülmesi, çoğunlukla konak hücrelere tutunma ve kolonizasyona yardımcı olabilen, dokuların mukopolisakkaritlerini yok ederek hücre duvarına zarar veren, jelatin, kollajen, hemoglobin vb. hidrolize eden virülans faktör genlerini taşımasına bağlanmıştır (Iweriebor ve ark., 2016). Ayrıca, klinik enfeksiyonların %80'i olarak *Ent. faecalis* ve %20'si ise olarak *Ent. faecium* kaynaklı olarak bildirilmiştir (Garham ve ark., 2020). *Enterococcus spp* patojenik suşlarının kolonizasyon işleminden sonra, konağın dokuları üzerinde yıkıcı etkisi olan toksik maddeler salgılamaktadır. *Enterococcus* suşları tarafından salgılanan virülans faktörleri; sitolizin (Cyl), jelatinaz (GelE) ve hiyalüronidazdır (Hyl) (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017). Bu nedenle belirli bir *Enterococcus* suşlarının probiyotik veya gıda katkı maddesi olarak kullanılması için kullanımdan önce uygulamasının güvenlik yönleri ortaya konulmalıdır (Margalho ve ark., 2020). Enterokok virülans faktörleri son birkaç yılda yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Bazı virülans faktörleri iyi tanımlanmıştır, diğerleri ise daha “ince” virülans belirleyicileri hala daha yakından araştırılmaktadır (Franz ve ark., 2011).

Virülans belirleyicilerinden (faktörleri) en önemli, enterokokal β -hemolizin-bakteriyosin olarak da adlandırılan sitolizin (Cyl), patojenik suşun virülansını arttırmaktadır (Franz ve ark., 2011). Sitolizin, en iyi karakterize edilmiş enterokok virülans faktörlerinden birisidir. Bakteriyosin tipi bir eksotoksin olduğu, Gram negatif bakterilere karşı bakteriyosidal özellikler gösterdiği, eritrositler, lökositler ve makrofajlara karşı toksik olduğu (β -hemoliz) bildirilmektedir (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017). Diğer önemli virülans faktörü, feromon duyarlı olan bir plazmit tarafından kodlanan bir agregasyon maddesidir (AS). Agregasyon maddesi (AS), üzerinde AS geninin kodlandığı plazmitin etkili transferini kolaylaştıran *Ent. faecalis* hücrelerinin hücre kümelenmesini neden olmaktadır (Franz ve ark., 2011).

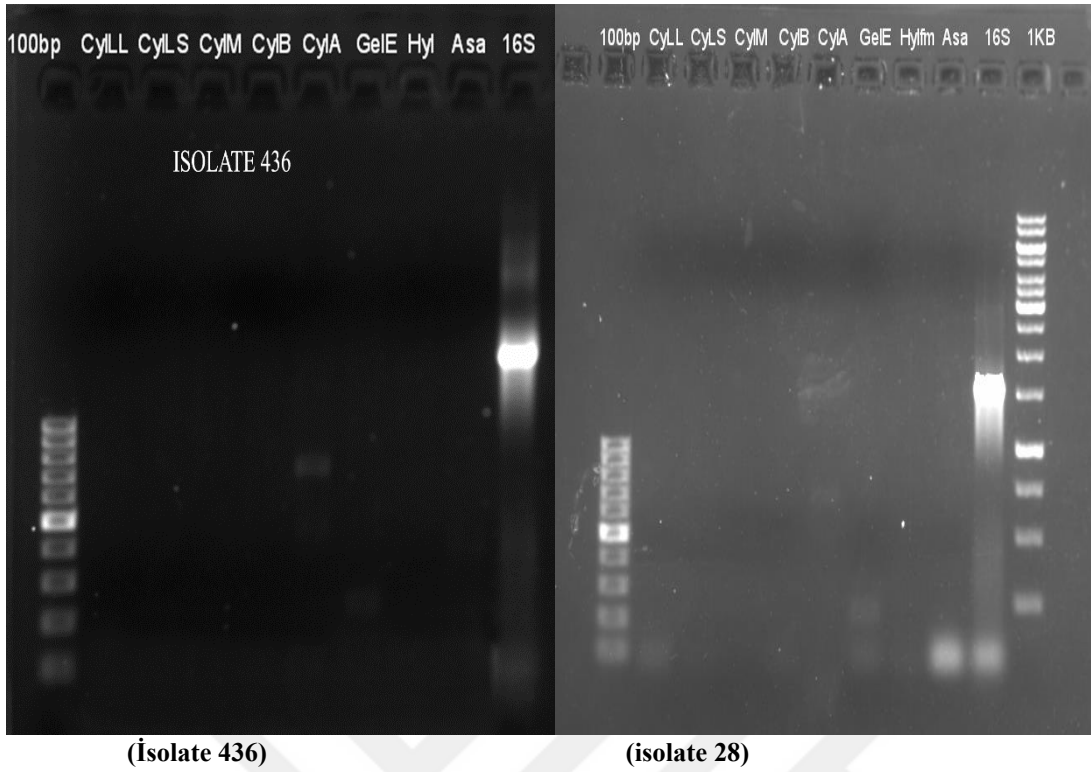
Jelatinaz, kromozom üzerinde bulunan gelE geni tarafından kodlanmaktadır. Jelatinaz, moleküler ağırlığı yaklaşık 30 kDa olan hücre dışı, çinkoya bağımlı bir metaloendopeptidazdır. Bu enzim, jelatin, elastin, kolajen, hemoglobinin yanı sıra diğer biyoaktif peptitleri feromonlara bağlı proteinleri gibi hidrolize edebilmektedir (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017). Jelatinaz, insülin- β zinciri, dokulardaki kolajen materyal, vazokonstriktör edotelin-1 ve ayrıca seks-feromonları ve bunların inhibitör peptitleri gibi çeşitli substratlar üzerinde etkili olan bir proteolitik enzimdir. Jelatinaz, *Ent. faecalis*'in virülansında önemli etkileri olduğu öne sürülen fibrini parçalayabilir, çünkü salgılanan

proteaz konakçı dokuya zarar verebilir ve böylece bakteri göçüne ve yayılmasına izin verebilmektedir (Franz ve ark., 2011).

Hiyalüronidaz, *hyl* geni tarafından kodlanan, moleküler ağırlığı 45 kDa'ya yakın olan, bir *Ent. faecium* genom proteini olmaktadır. *Ent. faecium* suşları, *Ent. faecalis* suşlarının kromozomal DNA'sında bulunmamıştır. Bu enzim, bağ dokusu ve kıkırdaktaki mukopolisakkaritlerin yok edilmesinde ve dolayısıyla bakterilerin yayılmasında rol oynamaktadır. Klinik suşlardaki *hyl* geni genellikle *Ent. faecium*'da bulunur ve *Ent. faecalis*'te oldukça nadir görülmektedir (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017).

Diğer potansiyel virülans faktörleri daha az belirlenmiştir. Bunlar arasında bir adhezin, *Ent. faecalis* (Esp_{fc}) veya *Ent. faecium* (Esp_{fm}) kaynaklı *Enterococcus* yüzey proteini ve *Ent. faecalis*'te biyofilm oluşumu ile ilişkili olan *Ent. faecalis*'ten kolajene yapıştırıcı olan, bir kolajen bağlayıcı olan protein bulunmaktadır (Franz ve ark., 2011).

Yapılan çalışmada elde edilen, gastrointestinal direnç, yapışma yeteneği ve bazı fonksiyonel özellik sonuçlarına göre, potansiyel probiyotik suşlar olabilen 28 ve 436 no'lu *Enterococcus* izolatları virülans özellikleri açısından incelemiştir. Bu amaçla agregasyon maddesi (*agg*), yüzey proteini (*esp*), jelatinaz aktivitesi (*gelE*), hiyalüronidaz (*Hylefm*) ve sitolizin (*cylL* 1,2, *cylS* 1,2, *cylM*, *cylB* ve *cylA*) olan genler olup olmadığını test edilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları suşların virülans genleri bulunmuş olup Şekil 4.6'da sunulmuştur. 436 no'lu izolat *gelE* ve *cylA* virülans genlerini tespit edilirken diğer test edilen virülans genleri negatif olarak göstermiştir. 28 no'lu izolat *agg*, *esp*, *Hylefm* ve sitolizine ait tüm genler (*cylL* 1,2, *cylS* 1,2, *cylM*, *cylB*, *cylA*) virülans genlerinin varlığı açısından negatif olarak gösterirken sadece *gelE* virülans geni için pozitif olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.6: *Ent. faecium* izolat (436) ve *Ent. Faecalis* izolat (28) 'in virülans faktörlerinin PCR amplifikasyon görüntüsü

Iweriebor ve ark. (2016), yaptıkları çalışma sonucunda toplam 340 enterokok izolatından 330'unun (%97.11) *gelE* geni taşıdığını bildirmiştir. Klinik enterokok suşlarında virülans genlerin yaygınlığı ile ilgili olarak, tarafından yaptıkları çalışmada, *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium* suşlarının 5 virülans genlerini test edildiğinde *Ent. faecalis* suşlarında, *asa1* geni daha yaygın olduğunu gösterirken, *gelE* geni ise *Ent. faecium* suşlarında yaygın olduğunu tespit edilmiştir (Kiruthiga ve ark., 2020). Ayrıca *Ent. faecalis* suşlarında *cylA*, *gelE* ve *asa1* genleri gösterdiği oranlar sırasıyla %59.55, %85.39, %86.51, *Ent. faecium* suşlarına (%1.96, %60.78, %9.80) göre önemli ölçüde daha yaygın olduğunu belirlenmiştir. *hyl* geni ise *E. faecium* suşlarında (%5.9) saptanırken *E. faecalis* suşlarında (%0) saptanmamıştır.

Sonuç olarak *Ent. faecalis* 28 no'lu izolatı, *Ent. faecalis* suşlarında çok yaygın olan agregasyon maddesi (*agg*), yüzey proteini (*esp*) ve sitolizin (*cyl*) kodlayan virülans genlerini barındırmamış ve jelatinaz aktivitesi güvenlik endişesi için ciddi bir risk oluşturmamıştır. Baccouri ve ark. (2019), yaptıkları çalışma sonucunda *Ent. faecalis* suşların *gelE*⁺ geninin varlığında besiyerindeki jelatin parçalaması başarısız göstermiş ve bu nedenle bu araştırmacılar bu jelatinaz aktivite aktif olmayan veya düşük aktif olan gen olduğunu belirtmişlerdir. İlginç bir şekilde, jelatinaz aktivitesine sahip olan *Ent. faecalis* Symbioflor 1, uzun yıllardır güvenle bir şekilde ticari olarak da probiyotik bir mikrop kullanılmaktadır.

Daha önce iddia edildiği gibi *gelE* geni, güçlü proteolitik aktivitenin istendiği fermantasyonda kullanılan pozitif bakteriler için bir avantaj bile olabilmektedir (Garham ve ark., 2020).

Ayrıca *Ent. faecium* 436 no'lu izolatta sadece *cylA* ve *gelE* virülans genlerini tespit edilmiş ancak *in vitro* hemoliz testlerinde β -hemolitik aktivite göstermemiştir. Dolayısıyla, *cylA* ve *gelE* virülans genlerini inaktif olabileceği belirlenmiştir. Gıdalardan izole edilen bazı enterokok suşlarının *asa1*, *ace* ve *gelE* gibi virülans faktörlerinin içermesine rağmen ticari starter kültür olarak uzun bir güvenli kullanım geçmişe sahiptir. Bu nedenle enterokok suşlarında sadece virülans faktörlerinin bulunması ile enfeksiyonun olması veya gelişmesi anlamına gelmemektedir (Garham ve ark., 2020; Zommiti ve ark., 2018). Bununla birlikte, *agg* ve *asa1* gibi bazı virülans genleri içeren enterokoklar, probiyotik potansiyeli olanlar gastrointestinal sisteminin kolonizasyonu ve iyileştirmesinde faydalı rol oynamaktadır (Cebrián ve ark., 2012).

4.4. *Enterococcus* Bakterilerinin Teknolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi

LAB'nin sıcaklık, alkol, NaCl, hidrojen peroksit ve donma gibi stres koşulları altında gelişme özellikleri, fermente gıdalarda kullanımı için ve starter kültürlerin seçiminde önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir (Ertekin ve Çon, 2014). LAB teknolojik özelliklerinden dolayı, gıda endüstrisi için özel ilgi görmekte ve genellikle fermente ürünlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bu bakterilerin fermantasyon sırasında etkili olabilmeleri için farklı çevre koşullarına (pH, sıcaklık, besin maddeleri, tuz ve şeker konsantrasyonu vb.) dayanıklı olmaları gerekmektedir (Akoğlu, 2020). *Enterococcus*, LAB grubuna ait ana cinslerden biridir ve yaklaşık 50 suş içermektedir. *Enterococcus*, spesifik metabolit özellikleri sayesinde çeşitli fermente gıda ürünlerinde önemli teknolojik rol oynamaktadır. Ayrıca sert ve olumsuz çevre koşulları, yüksek tuz konsantrasyonu ve pH seviyeleri ve %40 safra tuzlarının varlığında gelişme yeteneği olduğu tespit edilmiştir (Nascimento ve ark., 2019).

4.4.1. *Enterococcus* suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişim potansiyelleri

Sıcaklık, bakteri gelişmesini önemli ölçüde etkileyebilecek önemli bir faktördür. Bu sıcaklık aralığının seçilmesinin nedeni, izole edilen kültürlerin normal vücut sıcaklığı aralığında gelişim potansiyellerinin belirlenmesidir (Pundir ve ark., 2013). LAB, fermente gıdalarda bulunan en önemli ve yaygın bakteriler arasındadır, bu nedenle gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi üretim ve saklama koşullarının belirlenmesinde önemlidir (Özkan, 2021).

Enterococcus izolatlarının 4, 15, 30 ve 45°C de gelişme yetenekleri Çizelge 4.11’de sunulmuştur. Test edilen *Enterococcus* izolatları 4°C sıcaklıkta düşük gelişme gösterirken, 270 ve 455 no’lu izolatlar hiç gelişme göstermemiştir. 262, 427 ve 367 no’lu izolatlar haricinde tüm test edilen izolatlar 15°C’de iyi bir şekilde geliştiğini gözlemlenmiştir. Tüm *Enterococcus* izolatlarının 30 ve 45°C sıcaklıkta iyi gelişim gösterdiği belirlenmiştir.

Özkan (2021), yapmış oldukları çalışmada *Enterococcus* İzolatları 30 ve 45°C’de iyi geliştiği ancak 4°C’de hiçbir izolatta gelişme olmadığını tespit etmiştir. Başka bir çalışmada, Akoğlu (2020), Türkiye’de üretilen geleneksel peynirlerinden izole edilen bazı LAB’nin gelişimi üzerine bazı çevre koşullarının etkilemini incelemiştir. Elde edilen sonuçlar *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının 20°C’deki gelişim oranının 37°C’dekinden istatistiksel olarak daha düşük olduğunu bildirmiştir. Abanoz (2014), tarafından yapılan çalışmada *Enterococcus faecalis* KT11 izolatının, 4, 15 ve 45°C de gelişebildiği saptanırken 50°C de gelişme göstermediği belirlenmiştir.

4.4.2. *Enterococcus* suşlarının farklı alkol konsantrasyonlarında gelişimi

Etanol, çoğu fermantasyon prosesinde temel metabolitlerden birisi olduğundan, LAB’nin alkol toleransının iyi olması gerekmektedir. Bu nedenle fermantasyon işleminde sadece alkol stresine karşı yüksek toleranslı LAB kullanılabilmektedir (Shin ve ark., 2019). Etil alkol, *Leuconostoc mesenteroides* gibi heterofermentatif LAB tarafından şeker fermantasyonu sonucu üretilmektedir. Etil alkolün mikroorganizmalar üzerindeki inaktive edici etkisi, moleküler ağırlığına, konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlıdır. Etil alkolün en etkili konsantrasyonunun %70 olduğu kaydedilmiştir. Etil alkolün antimikrobiyal aktivitesi, hücrede bulunan proteinlerin denatürasyonundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca sitoplazmik zarın lipid yapısına da zarar vermektedir. Etil alkolün zayıf difüzyonu ve organik asitler tarafından inaktivasyonu birer dezavantajları olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte, bazı antimikrobiyal bileşiklerin aktivitesini arttırdığı da bildirilmiştir (Sagdic ve ark., 2014).

Tez çalışmasında, *Enterococcus* izolatları % 3, 6, 12 ve 15 oranlarında etil alkol içeren besiyerinde gelişim potansiyellerine ait sonuçlar Çizelge 4.11’de verilmiştir. Test edilen tüm *Enterococcus* izolatlarının etil alkol artışı ile birlikte gelişme yeteneğinin azaldığını bildirilmiştir. % 3 etil alkol konsantrasyonunda tüm test edilen *Enterococcus* izolatları iyi gelişebilirken % 6 etil alkol konsantrasyonda 4 izolat dışında (258, 427, 656 ve 1130) diğerlerinin zayıf bir gelişim gösterdiğini tespit edilmiştir. % 12 etil alkol konsantrasyonda 258 no’lu izolatın gelişebildiği ve kalan izolatların ya çok az yada hiç gelişim göstermediği

gözlenmiştir. Ayrıca % 15 etil alkol konsantrasyonuna yalnızca 427, 455, 656 ve 1130 no'lu izolatların toleranslı olduğu belirlenmiştir.

Özkan (2021) tarafından elde edilen sonuçlara göre %3 alkol konsantrasyonunda *Enterococcus* suşlarının iyi gelişim gösterdiği ancak %12'nin üzerindeki alkol konsantrasyonun bu suşlar için inaktive edici rol oynadığı gözlemlenmemiştir. Karasu (2006), tarafından yapılan çalışma sonucunda, test edilen tüm LAB'nin %3, 7, 12 ve 13 oranında etil alkol içeren MRS sıvı besiyerlerinde gelişme göstermiştir. G-Alegría ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada, test edilen tüm laktik asit bakterileri %12 etanol konsantrasyonunda toleranslı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11: *Enterococcus* suşlarının farklı sıcaklıkta, farklı alkol, NaCl ve H₂O₂ konsantrasyonlarında gelişme özelliklerine ait sonuçla

İzolat No	Sıcaklık (°C)				Alkol Konsantrasyonu (%)				NaCl Konsantrasyonu (%)					H ₂ O ₂ Konsantrasyonu (mM)		
	4	15	30	45	3	6	12	15	3	5	6.5	8	9	0.4	0.7	1.0
192	+	++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++
258	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	+	-	+++	+++	+++
262	+	++	+++	+++	+++	++	+	-	+++	++	-	-	-	+++	+++	+++
270	-	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	-	+	-	+++	+++	+++
427	+	+	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
436	+	+++	+++	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++
455	-	+++	+++	+++	++	++	+	+	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++
656	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++
736	+	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++
1130	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
28	+	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++
367	+	++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+	+	-	-	+++	+++	+++
388	+	+++	+++	+++	+++	++	+	-	+++	++	-	-	-	+++	+++	+++

*(-):gelişme yok; (+):zayıf; (++):iyi; (+++): çok iyi

4.4.3. *Enterococcus* suşlarının farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişim sonuçları

NaCl, belirli bakteri türlerinin gelişmesini inhibisyon edebilen önleyici bir maddedir. LAB, NaCl varlığında duyarlılık gösterirse, NaCl bulunduğu ortamda gelişme olmayabilir, bu nedenle izolatların teknolojik özelliklerinden birisi NaCl toleransıdır (Pundir ve ark., 2013).

Yapılan tez çalışmasında *Enterococcus* izolatlarının %3, 5, 6.5, 8 ve 9 NaCl konsantrasyonlarında gelişimleri test edilmiş olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11'de sunulmuştur. Test edilen tüm *Enterococcus* izolatları %3 NaCl konsantrasyonunda iyi gelişme kabiliyeti göstermiştir. %5 NaCl konsantrasyonunda 262, 367 ve 388 no'lu izolatlar dışında geri kalan tüm izolatlarda çok iyi gelişebilme kabiliyetini belirlenmiştir.%6.5NaCl konsantrasyonunda 192, 258, 436, 455, 656, 736 ve 28 no'lu izolatlar çok iyi gelişebilme

kabiliyeti gözlemlenirken diğer kalan izolatlar hiç gelişim göstermemiştir. En yüksek ikinci konsantrasyon olan %8NaCl varlığında, yalnızca iki suş (258 ve 270) gelişim gösterebilmiştir. Ayrıca en yüksek NaCl konsantrasyonu olan, %9 değerinde hiçbir *Enterococcus* izolatının gelişemediği belirlenmiştir.

Özkan (2021), tarafından yapılan çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiş olup artan NaCl konsantrasyonları *Enterococcus* izolatları üzerinde inaktive edici rol oynamıştır. Bu çalışmada düşük NaCl konsantrasyonlarında (<%6.5) tüm suşlar gelişebilirken konsantrasyon arttırıldığında (%9) yalnızca 3 izolatın gelişim gösterebildiği belirlenmiştir. Başka bir çalışmada Akoğlu (2020), Türkiye'de geleneksel peynirlerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* izolatları %4, %6,5 ve % 8 tuz içeren M17 sıvı besiyerinde ve 37°C inkübasyon edildikten sonra etkileri incelemiştir. Elde edilen sonuçlar *Ent. faecalis* izolatının %4 ve %6,5 tuz konsantrasyonlarında iyi gelişme gösterdiğini ancak aynı konsantrasyonlarda *Ent. faecium* izolatının düşük gelişim gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca her iki bakteri de %8 tuz konsantrasyonunda gelişim göstermemiştir. Favaro ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada, *Ent. faecium* ST209GB ve *Ent. faecium* ST278GB suşunun %5 NaCl konsantrasyonuna kadar iyi gelişebildiğini ortaya koymuştur. Abanoz (2014), *Ent. faecalis* KT11 izolatının %4 ve %6,5 NaCl varlığında gelişebildiği fakat %18 NaCl varlığında gelişemediği belirlemiştir.

4.4.4. *Enterococcus* suşlarının farklı H₂O₂ Konsantrasyonlarında gelişimi

Hidroksil radikali ile karşılaştırıldığında, hidrojen peroksit zayıf bir oksidandır, ancak hücrelerin oksidatif hasarına neden olan hidroksil radikaline yol açabilir. Hidrojen peroksit ayrıca geçiş metal iyonuna bağımlı ve hidroksil radikalinin aracılık ettiği oksidatif DNA hasarına neden olabilmektedir (Li ve ark., 2012). H₂O₂, bakteri hücrelerinin DNA'sına zarar verebilen süperoksit ve hidroksil gibi bakteriyel serbest radikallere yol açmaktadır (Sagdic ve ark., 2014).

Enterococcus izolatlarının farklı hidrojen peroksit konsantrasyonlarında gelişebilme yeteneklerine ait sonuçlar Çizelge 4.11' de verilmiştir. Bu çalışmada 0.4, 0.7 ve 1.0 mM farklı oranlarda hidrojen peroksit içeren M17 sıvı besiyerinde *Enterococcus* izolatları gelişme yeteneklerine bakılmıştır. Test edilen tüm izolatların hidrojen peroksit tüm konsantrasyonlarında gelişebildiği tespit edilmiştir.

Benzer sonuçlar Özkan (2021), tarafından yapılan çalışmada da elde edilmiştir. Başka bir çalışmada Li ve ark. (2012), inceledikleri geleneksel Çin fermente gıdalarından izole edilen LAB'nin 0.4 mM H₂O₂ konsantrasyonuna dirençli ancak 1.0 mM H₂O₂

konsantrasyonuna hassas olduğunu tespit etmiştir. Karasu (2006), yaptığı çalışmada 2 g/kg, 10 g/kg ve 20 g/kg oranında H₂O₂ içeren ortamda izolatların gelişimini incelemiş ve en düşük konsantrasyonda yalnızca iki suşun gelişebildiğini (%13.60 ve %7.50) tespit etmiştir.

4.4.5. Donmaya dayanıklılık testine ait sonuçlar

Liyofilizasyon ve dondurma işlemleri, laktik asit kültürlerin genetik dayanıklılıklarının korunmasına izin vererek, böylece arzu edilen teknolojik özelliklerin kaybını önlemektedir (Karasu ve ark., 2010). Dondurma ve dondurarak kurutma genellikle biyolojik numunelerin korunması ve depolanması için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, hassas proteinlerin denatürasyonu ve birçok hücre tipi için canlılığın azalması gibi bazı istenmeyen yan etkileri vardır. Bu olumsuz etkileri önlemek veya azaltmak için yağsız süt, sakaroz, gliserol ve dimetil sülfoksit gibi koruyucu maddeler genellikle dondurulmadan veya dondurularak kurutmadan önce numunelere eklenmektedir. Çözünen maddelerin eklenmesinin dondurularak kurutulmuş bir numunedeki canlı hücre sayısını arttırdığı bilinmesine rağmen, canlılık ilk kültürün altında kalır ve koruyucu etkilerinin fiziksel mekanizması henüz kurulmamıştır. Önceki çalışmalar, sakaroz ve trehaloz gibi indirgeyici olmayan disakkaritlerin lipozomları, izole edilmiş biyolojik zarları ve bazı sağlam hücreleri donma ve kurutmanın olumsuz etkilerinden koruyabildiğini göstermiştir (Leslie ve ark., 1995).

Enterococcus izolatlarının dondurma öncesi ve sonrası canlılık değerlerine ait veriler Çizelge 4.12’ de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tüm izolatlar dondurmaya karşı dayanıklı olup canlılık değerleri %103 ile %96 arasında değişmektedir. 192, 656, 736 ve 1130 no’lu izolatların canlılığı koruyabilme yeteneği oranlar sırasıyla % 103, % 100, %100 ve %100 göstermiştir. 28 no’lu izolat canlılığı koruyabilme yeteneği % 96 oranı göstererek en düşük dondurmaya dayanıklı olduğunu belirlenmiştir.

Özkan (2021) çalışmasında elde edilen dondurmaya dayanıklılık sonuçlarına göre dondurma işlemi sonrasında enterokok suşlarının canlılığının %92.00-103.46 arasında olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte izolatlar canlılıklarını yüksek oranda korumuştur. Ayrıca Karasu (2006), çalışmasında tüm LAB’nin dondurmaya dayanıklılık oranlarını, ortalama %90.22 olarak rapor etmiştir.

Çizelge 4.12: *Enterococcus* sp. suşlarının dondurmaya dayanıklılık sonuçları

İzolat no	Dondurma Öncesi	Dondurma Sonrası	
	log kob/mL	log kob/mL	% canlılık
192	8.76±0.05 ^b	9.07±0.01 ^{ef}	103.6
258	9.34±0.4 ^{ab}	9.27±0.01 ^{bcd}	99.25
262	8.94±0.08 ^{ab}	8.94±0.06 ^{fg}	99.94
270	9.25±0.33 ^{ab}	9.18±0.04 ^{cde}	99.19
427	9.19±0.08 ^{ab}	9.03±0.03 ^{efg}	98.26
436	9.31±0.05 ^{ab}	9.10±0.11 ^{def}	97.8
455	9.35±0.01 ^{ab}	9.29±0.01 ^{abcd}	99.36
656	9.28±0.35 ^{ab}	9.37±0.02 ^{ab}	100.92
736	9.45±0.36 ^{ab}	9.47±0.04 ^a	100.26
1130	9.13±0.08 ^{ab}	9.18±0.03 ^{bcde}	100.6
28	9.68±0.15 ^a	9.36±0.06 ^{abc}	96.69
367	8.96±0.05 ^{ab}	8.88±0.04 ^g	99.16
388	9.28±0.04 ^{ab}	9.21±0.00 ^{bcde}	99.3

Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir. Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistiki farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir. % canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

4.5. PCA analizi ait Sonuçları ve Tartışma

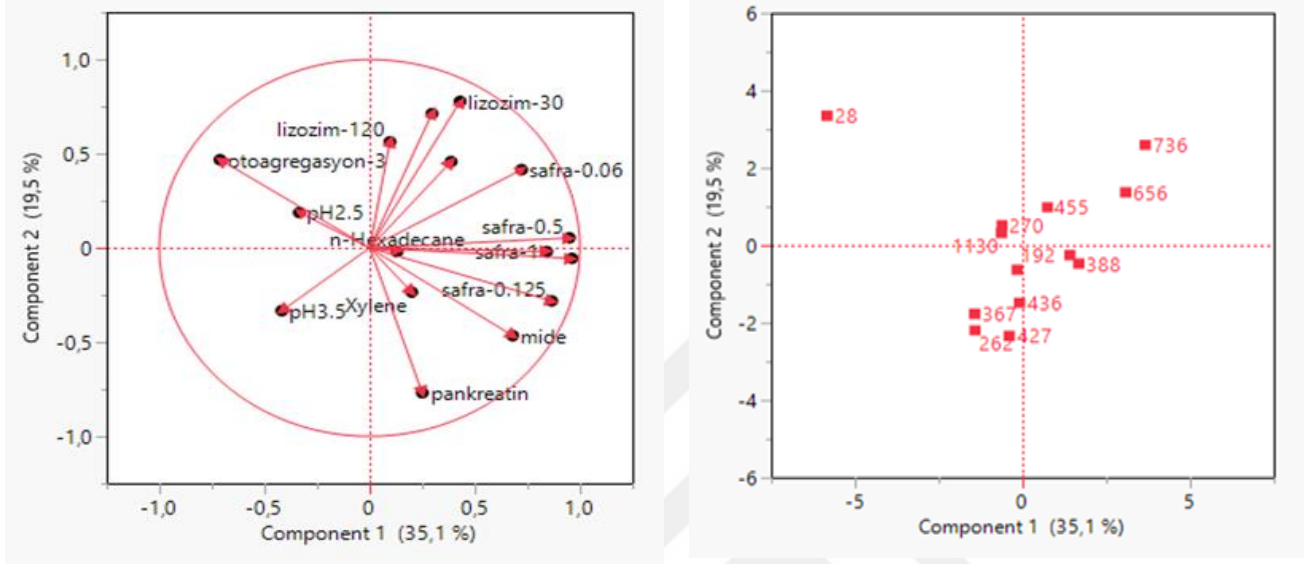
4.5.1. Probiyotik özellikler

Temel bileşen analizi (PCA), Probiyotik özellikleri 16 temel bileşenin (PC'ler) toplam varyasyonun %54,6'sını açıkladığını, PC1 ve PC2'nin sırasıyla %35,1 ve %19,5'ini açıkladığını ortaya koymuştur. Çizelge 4.13'te gösterildiği gibi, lizozim-0, lizozim-30, lizozim-120 (100 mg/ml), mide özsuyu, pankreatin, n-heksadekan, xylene, safra-0.06, safra-0.125, safra-0.250, safra-0.50 ve safra-1 PC1 ve PC2 ile ilişkili olduğunu düşünülmüş ve bu değişkenlerin probiyotik izolatların seçimine katkıda bulunduğunu öne sürmektedir. Şekil 4.7. ana bileşenlerin düzlemindeki değişkenlerin dağılım grafiklerini temsil eder. *Enterococcus* izolatlarının PC1 ve PC2 yükleme faktörlerinin dört boyutlu uzayındaki projeksiyonu dört ana kümeye ayrılabilir.

PCA grafiği incelendiğinde farklı lizozim ve safra asidi konsantrasyonlarında gelişebilme kapasitesinin kendi içeirisinde pozitif korelasyona sahip olduğu ancak kendi aralarında negatif korelasyon gösterdiği görülmektedir. Otegaragasyon yeteneğini ise düşük pH değeri olan 2.5 'te pozitif ancak artan pH değerinde ise negatif korelasyon gösterdiği görülmektedir.

Suşların bireysel olarak probiyotik özellikleri PCA analizine göre incelendiğinde ise 28 kodlu suşun otoagregasyon kapasitesinin diğer suşlardan oldukça üstün olduğu görülmektedir. 455, 656 ve 736 kodlu enterokok suşları lizozim-30 toleransları diğerlerine

göre daha üstün olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 388 kodlu suşun hidrofobisite kapasitesine göre daha yüksektir. Bunlar dışında kalan enterokok suşları ise benzer probiyotik özellikler göstermiştir.



Şekil 4.7. *Enterococcus* izolatlarının PC1 ve PC2 alanında projeksiyonu.

Çizelge 4.13. Faktör yüklerine bağlı olarak PCA analizinin faktörleriyle değişkenlerin korelasyonu

	lizozim-0	lizozim-30	lizozim-120	safra-0.06	safra-0.125	safra-0.25	safra-0.5	safra-1	pH2.5	pH3.5	mide	pankreatin	Xylene	n-Hexadecane	otoagregasyon-3	otoagregasyon-24
lizozim-0	1,0000															
lizozim-30	0,5989	1,0000														
lizozim-120	0,0930	0,5735	1,0000													
safra-0.06	0,3116	0,5844	0,4558	1,0000												
safra-0.125	0,0963	0,1971	-0,0338	0,3828	1,0000											
safra-0.25	0,3299	0,4252	0,0281	0,6345	0,8711	1,0000										
safra-0.5	0,2427	0,3973	0,1628	0,7564	0,7402	0,8547	1,0000									
safra-1	0,3209	0,3097	-0,1426	0,6191	0,7588	0,8635	0,7361	1,0000								
pH2.5	0,0494	-0,0739	0,1523	-0,0082	-0,2652	-0,2954	-0,3813	-0,0173	1,0000							
pH3.5	-0,5121	-0,5209	-0,1595	-0,1416	-0,4734	-0,4019	-0,2701	-0,3862	0,2699	1,0000						
mide	0,0960	-0,1193	-0,2992	0,1021	0,8402	0,7025	0,5618	0,5491	-0,2718	-0,2458	1,0000					
pankreatin	-0,5208	-0,3524	-0,2246	-0,1715	0,4505	0,3050	0,1411	0,2171	-0,1283	-0,0079	0,4443	1,0000				
Xylene	-0,2815	-0,1443	0,0229	0,3200	-0,0280	0,1607	0,3493	0,0392	-0,3076	0,3626	-0,1591	0,2315	1,0000			
n-Hexadecane	-0,0064	-0,2053	-0,0717	0,0432	0,0475	-0,0314	0,3681	-0,0009	-0,0719	0,2911	0,1543	-0,0927	0,2155	1,0000		
otoagregasyon-3	0,2909	0,0454	0,0181	-0,5358	-0,6412	-0,6633	-0,6907	-0,5035	0,2667	-0,0955	-0,6137	-0,4824	-0,4217	-0,0240	1,0000	
otoagregasyon-24	0,3717	0,3731	0,1936	0,5751	-0,0024	0,2033	0,5800	0,1883	-0,1393	0,0575	-0,0277	-0,3008	0,2744	0,6660	-0,1463	1,0000

*Aynı faktör içinde koyu yazılan değerler, en büyük korelasyona sahip değişkeni göstermektedir

4.5.2. Fonksiyonel özellikler

Temel bileşen analizi (PCA), Fonksiyonel özellikleri 6 temel bileşenin (PC'ler) toplam varyasyonun %66,7'sini açıkladığını, PC1 ve PC2'nin sırasıyla %36,4 ve %30,3'ünü açıkladığını ortaya koymuştur. Çizelge 4.14'te gösterildiği gibi, kolesterol, *L. monocytogenes* *S.aureus*, EPS, β -galaktosidaz ve *B.cereus* PC1 ve PC2 ile ilişkili olduğunu düşünülmüş ve bu değişkenlerin fonksiyonel izolatların seçimine katkıda bulunduğunu öne sürmektedir. Şekil 4.8. ana bileşenlerin düzlemindeki değişkenlerin dağılım grafiklerini temsil eder. *Enterococcus* izolatlarının PC1 ve PC2 yükleme faktörlerinin dört boyutlu uzayındaki projeksiyonu dört ana kümeye ayrılabilir.

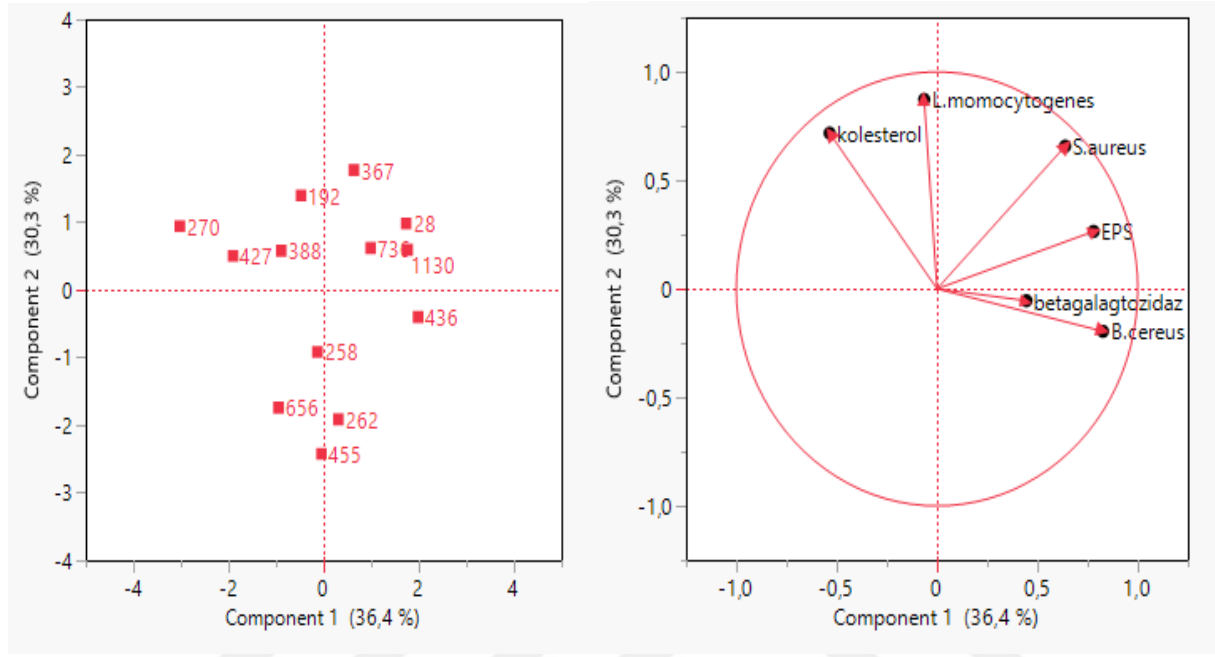
PCA grafiği incelendiğinde *B.cereus* ve *S.aureus* karşısına antibakteriyel ve β -galaktosidaz aktivitesinin kendi içeirisinde pozitif korelasyona sahip olduğu ancak kendi aralarında negatif korelasyon gösterdiği görülmektedir.

Suşların bireysel olarak fonksiyonel özellikleri PCA analizine göre incelendiğinde ise 436 kodlu suşun *B.cereus* karşısına, 192 kodlu suşun *L.monocytogenes*'e karşı ve 736 ve 28 kodlu suşun ise *S.aureus*'a karşı antibakteriyel kapasitesinin diğer suşlardan oldukça üstün olduğu görülmektedir. Bunun dışında kalan enterokok suşları ise benzer probiyotik özellikler göstermiştir. Ayrıca 436 kodlu suşun β -galaktosidaz aktivitesi diğerlerine göre daha yüksektir. Bunlar dışında kalan enterokok suşları ise benzer probiyotik özellikler göstermiştir.

Çizelge 2. Faktör yüklerine bağlı olarak PCA analizinin faktörleriyle değişkenlerin korelasyonu

	<i>L.momocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	betagalagtozidaz	kolesterol	EPS
<i>L.momocytogenes</i>	1,0000					
<i>S.aureus</i>	0,4461	1,0000				
<i>B.cereus</i>	-0,3291	0,5198	1,0000			
betagalagtozidaz	0,2436	-0,0002	0,1091	1,0000		
kolesterol	0,4874	0,1452	-0,4513	-0,4333	1,0000	
EPS	0,0813	0,5572	0,4332	0,2851	-0,1674	1,0000

*Aynı faktör içinde koyu yazılan değerler, en büyük korelasyona sahip değişkeni göstermektedir.



Şekil 4.8. *Enterococcus* izolatlarının PC1 ve PC2 alanında projeksiyonu.

4.5.3. Teknolojik özellikler

Temel bileşen analizi (PCA), Teknolojik özellikleri 18 temel bileşenin (PC'ler) toplam varyasyonun %66,7'sini açıkladığını, PC1 ve PC2'nin sırasıyla %24,5 ve %24,2'sini açıkladığını ortaya koymuştur. Çizelge 4.15'te gösterildiği gibi, sıcaklık-4, sıcaklık-15, sıcaklık-30, sıcaklık-45 alkol-3, alkol-6, alkol-12, alkol-15, tuz-6.5, tuz-8, tuz-9, H₂O₂-0.4, H₂O₂-0.7 ve dondurma PC1 ve PC2 ile ilişkili olduğunu düşünülmüş ve bu değişkenlerin teknolojik izolatların seçimine katkıda bulunduğunu öne sürmektedir. Şekil 4.9. ana bileşenlerin düzlemindeki değişkenlerin dağılım grafiklerini temsil eder. *Enterococcus* izolatlarının PC1 ve PC2 yükleme faktörlerinin dört boyutlu uzayındaki projeksiyonu dört ana kümeye ayrılabilir.

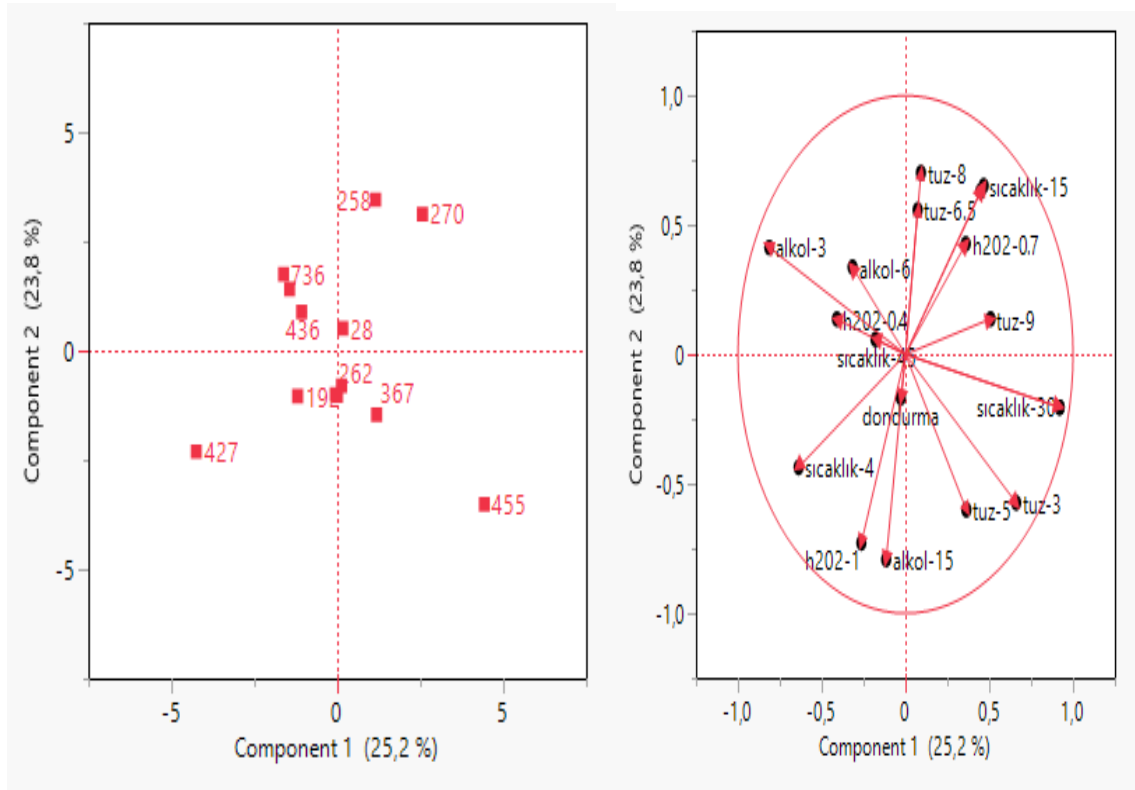
PCA grafiği incelendiğinde farklı sıcaklık, tuz, alkol ve H₂O₂ konsantrasyonlarında gelişebilme kapasitesinin kendi içerisinde pozitif korelasyona sahip olduğu ancak kendi aralarında negatif korelasyon gösterdiği görülmektedir.

Suşların bireysel olarak teknolojik özellikleri PCA analizine göre incelendiğinde ise 436, 1130 kodlu suşların farklı alkol ve H₂O₂ konsantrasyonlarında gelişebilme kapasitesinin diğer suşlardan oldukça üstün olduğu görülmektedir. 258, 270, 455, 28 ve 367 kodlu enterokok suşları farklı tuz konsantrasyonları ve sıcaklık değerlerine göre daha üstün olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 192 kodlu suşun dondurma dayanıklılığı diğerlerine göre daha yüksektir. Bunlar dışında kalan enterokok suşları ise benzer probiyotik özellikler göstermiştir.

Tablo (3). Faktör yüklerine bağlı olarak PCA analizinin faktörleriyle değişkenlerin korelasyonu

	sıcaklık-4	sıcaklık-15	sıcaklık-30	sıcaklık-45	alkol-0	alkol-3	alkol-6	alkol-12	alkol-15	tuz-3	tuz-5	tuz-6.5	tuz-8	tuz-9	h202-0.4	h202-0.7	h202-1	dondurma
sıcaklık-4	1,0000																	
sıcaklık-15	-0,5544	1,0000																
sıcaklık-30	-0,4058	0,3677	1,0000															
sıcaklık-45	-0,1732	-0,0468	-0,3547	1,0000														
alkol-0	-0,4058	0,3677	1,0000	-0,3547	1,0000													
alkol-3	0,4212	-0,1197	-0,7948	-0,1112	-0,7948	1,0000												
alkol-6	0,2844	0,1472	-0,3543	0,1036	-0,3543	0,4470	1,0000											
alkol-12	-0,5167	0,4341	0,1859	-0,0008	0,1859	-0,1385	0,2996	1,0000										
alkol-15	0,5683	-0,5092	0,0609	0,0864	0,0609	-0,1781	0,2740	-0,4163	1,0000									
tuz-3	-0,1718	0,0032	0,6940	0,0644	0,6940	-0,8731	-0,2748	-0,1051	0,4106	1,0000								
tuz-5	0,0293	-0,4104	0,3868	0,1372	0,3868	-0,4976	-0,1105	0,0566	0,5835	0,5314	1,0000							
tuz-6.5	-0,0319	0,4641	0,0660	-0,0708	0,0660	0,2794	0,5882	0,1656	-0,1023	-0,0760	-0,1539	1,0000						
tuz-8	-0,3730	0,4036	-0,0553	-0,0338	-0,0553	0,1404	0,3264	0,6893	-0,5491	-0,1154	-0,1624	0,5379	1,0000					
tuz-9	-0,0000	0,1861	0,0678	-0,1587	0,0678	0,2233	0,5119	0,1737	0,1505	0,0120	0,1918	0,8005	0,4874	1,0000				
h202-0.4	0,0114	0,0860	-0,3427	0,3238	-0,3427	0,1490	0,3272	-0,1265	-0,0747	-0,1301	-0,4096	0,1559	-0,0748	-0,0628	1,0000			
h202-0.7	-0,4946	0,3685	0,1006	0,2257	0,1006	-0,2124	0,0029	0,8054	-0,3750	-0,1613	0,0916	-0,2323	0,3032	-0,1425	-0,0721	1,0000		
h202-1	0,2933	-0,4671	-0,1256	0,2539	-0,1256	-0,2396	-0,0667	-0,5313	0,6278	0,4853	0,1797	-0,4489	-0,5121	-0,3202	0,1164	-0,4228	1,0000	
dondurma	0,0955	-0,1944	0,0948	-0,6432	0,0948	0,1032	-0,0820	-0,0634	-0,0004	0,0054	-0,1030	-0,1036	-0,1002	0,0961	0,1280	-0,1670	0,1390	1,0000

*Aynı faktör içinde koyu yazılan değerler, en büyük korelasyona sahip değişkeni göstermektedir.



Şekil 4.9. *Enterococcus* izolatlarının PC1 ve PC2 alanında projeksiyonu.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu tez çalışmasında, Orta Toroslar bölgesinde geleneksel olarak üretilen tulum peynirlerinden izole edilen 13 *Enterococcus* suşunun probiyotik özellikleri, güvenilirlikleri ve farklı ortamlarda gelişme yetenekleri incelenmiştir. Bu kapsamda probiyotik özellikleri için lizozime dayanıklılık, asit ve safra tuzlarına dayanıklılık, mide özsuyu ve pankreatik özsuyuna dayanıklılık, hidrofobisite ve otoagregasyon yeteneği, antibakteriyel aktivite, bakteriyosin üretimi, β -galaktozidaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu, EPS üretimi; güvenlik özellikleri için antibiyotik direnci, hemolitik aktivite, biyojen amin üretimi ve virülans gen tespiti; teknolojik özellikler için farklı sıcaklıklarda gelişme, alkole dayanıklılık, NaCl' ye dayanıklılık, H₂O₂'ye dayanıklılık ve dondurmaya dayanıklılık analizleri gerçekleştirilmiştir.

Enterococcus izolatlarının probiyotik özelliklerinin tespiti için ilk olarak lizozim toleransı aincelemiştir. Elde edilen sonuçlar tüm enterokok izolatlarının lizozime karşı dirençli olduğunu göstermiştir. Lizozim testi sonucunda en dirençli 436, 28 ve 262 no'lu izolatların 30. ve 120.dk sonunda canlılık değerleri sırasıyla %99.88, 97.54 ve 97.24 olarak tespit edilmiştir.

Enterokok izolatlarının safra tuzuna toleransı, %0.06, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 oranları safra içeren M17 sıvı besiyerleri incelemiş ve elde edilen sonuçlara göre tüm izolatlar safra tuzuna tolerans göstermiş olup, safra tuzu oranı arttıkça enterokok izolatlarının canlılığının azaldığı belirlenmiştir. % 1 safra tuzu ortamında tüm izolatların canlılık oranları % 50'nin üzerinde tespit edilmiştir.

İzolatların asitlik direnci pH değeri 2.5 ve 3.5 olan ortamlarda test edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre pH 2.5 değerinde 28, 436, 270, 388 ve 258 olan izolatların canlılık değerleri sırasıyla %94.28, 85.24, 79.41, 77.72 ve 66.16 olarak tespit edilmiştir. Bunlar dışında kalan izolatların ise gelişim göstermediği belirlenmiştir. Bununla birlikte test edilen tüm izolatlar pH 3.5' te iyi gelişme göstermiş olup canlılık oranı %62.75-95.66 arasında değişmektedir.

Bu çalışmada izole edilen enterokok bakterilerinin mide özsuyuna dayanıklılığını incelemek için pH değeri 2.5'e ayarlanmış pepsin ve lizozim içeren gastrik çözelti kullanılmıştır. 3 saatlik test sonunda, tüm izolatların simüle gastrik ortama dayanıklı olduğu ve canlılık değerlerinin %50'nin üzerinde olduğu

belirlenmiştir. Bununla birlikte en yüksek canlılık değeri %86.03 ile 258 no'lu suşta ve en düşük değeri olan %69.28 ise 28 no'lu suşta tespit edilmiştir.

Enterococcus izolatlarının pankreatik ortam toleransı pH değeri 8'e ayarlanmış pankreatin ve safra tuzu içeren test ortamında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tüm izolatların pankreatik özsuşuna dayanıklı olduğu ve canlılık değerlerinin %90'ın üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Enterokok izolatlarının yapışma yeteneklerini tespit etmek için hücre yüzeyi hidrofobisite ve otoagregasyon özellikleri incelenmiştir. Bu izolatların hücre yüzeyi hidrofobisitesinin belirlenmesi için n-hekzadekan ve ksilen hidrokarbonlar olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 736 ve 262 olan izolatlar n-hekzadekana karşı yüksek hidrofobisite oranları %75.78 ve 73.53 belirlenirken geri kalan izolatların düşük hidrofobisite değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tüm enterokok izolatlarının ksilene karşı hidrofobisite değerlerinin %50'nin altında kaldığı olduğunu belirlenmiştir. Otoagregasyon test sonuçlarına göre 3 saat sonrasında %1.64-11.97 ve 24. saat sonunda ise %5.74-22.39 arasında agregasyon kapasitesi tespit edilmiştir.

Probiyotik adaylar için antimikrobiyel özelliğine sahip olmalıdır. Yapılan tez çalışmasında enterokok izolatlarının *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 gibi seçilmiş olan patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesini olup olmadığını incelemiştir. *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 ve *Escherichia coli* ATCC 25922'e karşı hiçbir izolatta antimikrobiyel aktivite gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte tüm enterokok izolatları (270 ve 427 dışında) *Bacillus cereus* ATCC 11778'e karşı antimikrobiyel etkisi gösterirken *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e karşı tüm izolatların antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak analiz edilen izolatların hiçbirisinde bakteriyosin üretimi tespit edilememiştir.

İzolatların serum kolesterol asimilasyonu test sonuçlarına üç izolat dışında kalan tüm izolatların kolesterol asimilasyon yeteneğinin olduğu belirlenmiştir. En yüksek kolesterol düşürme oranı olan %40 ise 270 no'lu izolatta tespit edilmiştir.

β -galaktosidaz aktivitesi test sonuçlarına göre izolatların tamamının β -galaktosidaz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında enterokok izolatlarının EPS izolasyonu test edildiğinde fenol-sülfirik asit yöntemi kullanılarak üretim miktarı belirlenmiştir. EPS üretim sonuçları 28, 1130, 436, 367, 262 ve 736 olan izolatlar üretim miktarı sırasıyla

456.82, 335.16, 283.34, 220.64, 184.21 ve 123.52 göstererek diğer izolatlarla göre yüksek olduğunu tespit edilmiştir.

Test edilen enterokok suşlarından 258 ve 367 olan izolatlar haricinde tüm enterokok izolatların amfisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı hassas olduğunu belirlenmiştir. Ayrıca, 262, 436 ve 656 olan izolatlar gentamisine karşı hassasiyet gösterirken 28 ve 736 olan izolatların yarı hassas olduğu gözlenmiştir. 656 olan izolat dışındaki tüm enterokok izolatlar penisiline karşı hassasiyet göstermektedir. 656 ve 28 olan izolatlar vankomisine karşı yarı hassas özellik gösterirken geri kalan izolatlar hassasiyet göstermiştir. 270, 427, 656, 736 ve 388 olan izolatlar haricinde tüm enterokok izolatları tetrasikline karşı duyarlıdır. Son olarak tüm enterokok izolatlarının kanamisin ve streptomisine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada *Enterococcus* bakterileri güvenlik kriterlerinden önemli olan hemolitik aktivitesi test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar tüm *Enterococcus* izolatlarının hemolitik aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca her 13 suşun da arjinin, lisin, ornitin ve tirozin biyogen aminlerini üretmediği belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, 436 ve 28 no'lu izolatlar virülans genleri açısından test edilmiştir. Agregasyon maddesini (asa1), sitolizin (CylLL, CylLs, CylM, CylB, CylA), jelatinaz (gelE) ve hiyalüronidaz (hylefm) için kodlayan virülans genlerinin yokluğu veya varlığı açısından bakılmıştır. Sonuçlara göre 436 ve 28 no'lu izolatlarının her ikisi de GelE kodlayan virülans geni barındırmaktadır. Bununla birlikte 436 izolatın cylA virülans genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu suşlar probiyotik aday söylenmesi için, *in vivo* koşullarda davranışlarını araştırmak için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Özet olarak incelediğimiz bu çalışmada *Enterococcus* bakterileri 28, 436, 270, 388 ve 258 olan izolatlar, düşük pH, lizozim ve safra tuzlarına karşı yüksek direnç olduğu göstermiştir. Ayrıca 270, 388, 192, 367, 427 ve 436 olan izolatlar izolat, yüksek safra tuzlarına, mide suyuna ve kolesterol asimilasyonuna yüksek oranda tolerans olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte 28, 1130, 736, 436 ve 262 olan izolatlar yüksek ekzopolisakkarit üretimine sahip olduğu gözlenmiştir. Son olarak 736 ve 262 olan izolatlar hidrokarbon olan n-hekzadekana karşı yüksek hidrofobisite göstermiştir.

Enterococcus bakterilerinin teknolojik özelliklerine baktığımızda, test edilen tüm izolatlar 30 ve 45 °C'de çok iyi gelişme gösterirken 4 °C'de 270 ve 455 olan izolatlar haricinde tüm izolatlar düşük gelişme göstermiştir. 15 °C'de 192, 262, 427 ve

367 olan izolatlar iyi gelişme gözlenirken geri kalan izolatlar daha iyi gelişme olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışmada alkol konsantrasyonu arttıkça bakterileri gelişiminin azaldığı belirlenmiştir. % 3 alkol konsantrasyonunda tüm enterokok izolatlarında çok iyi gelişme gözlenmiştir. %6 alkol konsantrasyonunda 258, 427, 656 ve 1130 olan izolatlar iyi gelişme gösterirken geri kalan izolatlarda zayıf gelişme gözlenmiştir. Ayrıca % 12 alkol konsantrasyonunda 258, 262, 436, 455, 656 ve 388 olan izolatlar diğer izolatlara göre düşük olsa bile gelişme göstermiştir. Son olarak %15 alkol konsantrasyonunda 427, 455 ve 1130 olan izolatlar dışında tüm izolatlar hiç gelişme olmadığı belirlenmiştir. İzolatların tuz stres toleransı testlerine %3 NaCl konsantrasyonunda çok iyi gelişme gösterdiği ancak %9 NaCl konsantrasyonlarında hiç gelişim göstermediği belirlenmiştir. *Enterococcus* izolatları 0.4, 0.7 ve 1.0 mM farklı hidrojen peroksit konsantrasyonlarında test edilmiş olup, elde edilen sonuçlar tüm izolatlar iyi gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Enterokok izolatlarının dondurma şartlarında dayanımı test edilmiş olup liyofilizasyon sonunda tüm izolatlarda %95'in üzerinde canlılık elde edilmiştir.

Son olarak tüm izolatların 30 ve 45 °C'de sıcaklıklarda gelişebilme yeteneğine sahip olduğu göstermiştir. Ayrıca tüm izolatlar %6.5 NaCl konsantrasyonunda bazıları az olsa bile gelişebilirken % 8 NaCl konsantrasyonunda sadece 258 ve 270 olan izolatlar gelişmiştir. Tüm izolatlar % 6 alkol konsantrasyonunda dayanıklı olduğu gözlenirken % 15 alkol konsantrasyonunda sadece 1130, 427, 455 ve 656 olan izolatlar dayanabildikleri belirlenmiştir. Son olarak PCA analizlerinin sonuçlara göre probiyotik özelliklerine sahip olan ve stres koşullarda gelişebilen 455 ve 1130 no'lu izolatlar gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında, gastrointestinal, lizozim ve bazı fonksiyonel özellikler üzerine yapılan analizlerinden iyi sonuçlara sahip olan 436 ve 28 no'lu enterokok izolatlar virülans genleri açısından, agregasyon maddesini (asa1), sitolizin (CylLL, CylLs, CylM, CylB, CylA), jelatinaz (gelE) ve hiyaluronidaz (hylefm) virülans genlerinin yokluğu veya varlığı test edilmiştir. 436 ve 28 no'lu izolatlarda gelE ve cylA virülans genleri varlığı barındırılmıştır. Ayrıca PCA analizlerin sonuçlara göre 455 ve 1130 no'lu izolatlar probiyotik ve teknolojik özellikleri açısından iyi olduğunu belirlenmiştir. Genel olarak, gıda ürünlerindeki ve *in vivo* koşullarda davranışlarını araştırmak için daha fazla çalışma ihtiyaç duyulacaktır.

5.2 Öneriler

Türkiye'de geleneksel gıda ürünleri yaygın olduğunu görülmektedir. Bu geleneksel gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin araştırılması ve tanımlanması önemli bir konudur. Laktik asit bakterilerinin teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ile gıda endüstrisinde stater kültür olarak kullanımı ile ekonomik gelişme katkı sağlamaktadır.

Bu çalışmada Orta Toroslar Yöresinde geleneksel olarak üretilen deri tulum peynirlerinden izole edilen ve moleküler tanımlaması yapılan Enterokok bakterisinin, teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin tespit edilip gıda endüstrisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla 13 adet enterokok izolatlarının probiyotik özelliklerini inceleyip gastrointestinal sistemine dirençli ve düşük pH ortamında tolerans olan izolatlar virülans genlerinin varlığını tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Ent. faecium* izolat 436 ve *Ent. faecalis* izolat 28 iki suşlarında gelE ve cylA virülans genleri varlığı barındırılmıştır. Ayrıca, PCA analiz sonuçlara göre *Ent. faecium* izolat 455 ve *Ent. faecium* izolat 1130 probiyotik özelliği göstermiştir. İleride probiyotik özelliğine sahip olan suşlar canlı sistemler ve gıda sistemlerindeki davranışlarının belirlenmesi için in vivo analizi yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abanoz, H. S. (2014). *Enterococcus faecalis* KT11'in probiyotik potansiyelinin belirlenmesi ve bakteriyosin üretimi üzerine çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Adesulu-Dahunsi, A.Jeyaram, K. Sanni, A. (2018). Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products. *Food Control*, 92, 225-231.
- Agüero, N. d. L.Frizzo, L. S.Ouwehand, A. C.Aleu, G. Rosmini, M. R. (2020). Technological characterisation of probiotic lactic acid bacteria as starter cultures for dry fermented sausages. *Foods*, 9(5), 596.
- Ahmadova. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, 30(2), 631-641. doi:10.1016/j.foodcont.2012.08.009
- Ahmadova, A.Todorov, S. D.Choiset, Y.Rabesona, H.Zadi, T. M.Kuliyev, A. Haertlé, T. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, 30(2), 631-641.
- Akoğlu, A. (2020). The effect of some environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation by some lactic acid bacteria isolated from a local cheese in Turkey. *Biotechnology Letters*, 42(3), 481-492.
- Andrewes, F. Horder, T. (1906). A study of the streptococci pathogenic for man. *The Lancet*, 168(4334), 775-783.
- Angmo, K.Kumari, A.Savitri Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 428-435. doi:10.1016/j.lwt.2015.10.057
- Aran, H.Biscola, V.El-Ghaish, S.Jaffres, E.Dousset, X.Pillot, G. Hwanhlem, N. (2015). Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: purification, characterization and safety evaluation. *Food Control*, 54, 126-134.
- Ashraf, R. Shah, N. P. (2014). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 938-956.
- Aslim, B.Onal, D. Beyatli, Y. (2007). Factors influencing autoaggregation and aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus isolated from handmade yogurt. *Journal of Food Protection*, 70(1), 223-227.
- Aspri, M.Bozoudi, D.Tsaltas, D.Hill, C. Papademas, P. (2017). Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*, 73, 81-90. doi:10.1016/j.foodcont.2016.05.022
- Aymerich, T.Garriga, M.Ylla, J.Vallier, J.Monfort, J. Hugas, M. (2000). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of Food Protection*, 63(6), 721-726.
- Ayyash, M.Abushelaibi, A.Al-Mahadin, S.Enan, M.El-Tarabily, K. Shah, N. (2018). In-vitro investigation into probiotic characterisation of Streptococcus and Enterococcus isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology*, 87, 478-487. doi:10.1016/j.lwt.2017.09.019
- Baccouri, O.Boukerb, A. M.Farhat, L. B.Zébré, A.Zimmermann, K.Domann, E. Rincé, I. (2019). Probiotic potential and safety evaluation of *Enterococcus faecalis*

- OB14 and OB15, isolated from traditional tunisian testouri cheese and rigouta, using physiological and genomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 881.
- Banwo, K.Sanni, A. Tan, H. (2013). Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 229-241.
- Basbulbul, G.Ozteber, M. Biyik, H. H. (2015). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from dairy products and boza . *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, 4(6), 513-517. doi:10.15414/jmbfs.2015.4.6.513-517
- Bautista-Gallego, J.Arroyo-Lopez, F.N. Rantsiou, K.Jimenez-Diaz, R.Garrido-Fernandez, A. Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50(1), 135-142. doi:10.1016/j.foodres.2012.10.004
- Ben Braiek, O.Ghomrassi, H.Cremonesi, P.Morandi, S.Fleury, Y.Le Chevalier, P. Ghairi, T. (2017). Isolation and characterisation of an enterocin P-producing *Enterococcus lactis* strain from a fresh shrimp (*Penaeus vannamei*). *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(6), 771-786. doi:10.1007/s10482-017-0847-1
- Bhunja, A. K.Johnson, M. Ray, B. (1987). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 2(5), 319-322.
- Bin Masalam, M. S.Bahieldin, A.Alharbi, M. G.Al-Masaudi, S.Al-Jaouni, S. K.Harakeh, S. M. Al-Hindi, R. R. (2018). Isolation, Molecular Characterization and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria in Saudi Raw and Fermented Milk. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2018/7970463
- Bover-Cid, S. Holzapfel, W. H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53(1), 33-41.
- Bremer, E. (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *Bacterial stress responses*, 79-97.
- Câmara, S.Dapkevicius, A.Silva, C.Malcata, F. Enes, LN. Dapkevicius, M. (2020). Artisanal Pico cheese as reservoir of *Enterococcus* species possessing virulence and antibiotic resistance properties: Implications for food safety. *Food Biotechnology*, 34(1), 25-41.
- Carlos, A.Semedo-Lemsaddek, T.Barreto-Crespo, M. Tenreiro, R. (2010). Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1563-1575.
- Cebrián, R.Baños, A.Valdivia, E.Pérez-Pulido, R.Martínez-Bueno, M. Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*, 30(1), 59-67.
- Chajęcka-Wierzchowska, W.Zadernowska, A. Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2016). Virulence factors, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from retail shrimps. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 117-122.
- Chajęcka-Wierzchowska, W.Zadernowska, A. Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2017). Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT*, 75, 670-676.

- Chandran, A. Duany, R. K. Grover, S. Batish, V. K. (2013). Relative expression of bacterial and host specific genes associated with probiotic survival and viability in the mice gut fed with *Lactobacillus plantarum* Lp91. *Microbiological Research*, 168(9), 555-562.
- Çitak, S. Yucel, N. Orhan, S. (2004). Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1), 27-31.
- Clare, D. Swaisgood, H. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1187-1195.
- Collado, M. C. Meriluoto, J. Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1065-1073. doi:10.1007/s00217-007-0632-x
- de Almeida Júnior, W. L. G. da Silva Ferrari, Í. de Souza, J. V. da Silva, C. D. A. da Costa, M. M. Dias, F. S. (2015). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, 53, 96-103.
- Dertli, E. (2013). Biochemistry and functional analysis of exopolysaccharide production in *Lactobacillus johnsonii*. *School of Biological Sciences*.
- Devriese, L. Pot, B. (1995). The genus enterococcus. In *The genera of lactic acid bacteria* (pp. 327-367): Springer.
- Devriese, L. Pot, B. Collins, M. (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(5), 399-408.
- Domingos-Lopes, M. F. P. Stanton, C. Ross, P. R. Dapkevicius, M. L. E. Silva, C. C. G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, 63, 178-190. doi:10.1016/j.fm.2016.11.014
- dos Santos, K. M. O. Vieira, A. D. S. Salles, H. O. Oliveira, J. D. Rocha, C. R. C. Borges, M. D. Todorov, S. D. (2015). Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 237-249. doi:10.1590/s1517-838246120131245
- dos Santos Leandro, E. Ginani, V. C. de Alencar, E. R. Pereira, O. G. Rose, E. C. P. do Vale, H. M. M. Tavares, C. S. O. (2021). Isolation, identification, and screening of lactic acid bacteria with probiotic potential in silage of different species of forage plants, cocoa beans, and artisanal salami. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(1), 173-186.
- Dunne, C. O'Mahony, L. Murphy, L. Thornton, G. Morrissey, D. O'Halloran, S. Daly, C. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 386s-392s.
- Eaton, T. J. Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1628-1635.
- Ennahar, S. Deschamps, N. (2000). Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 449-457.
- Ertekin, Ö. Çon, A. (2014). Industrial and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *Akademik Gıda*, 12(4), 6-16.
- Escamilla-Montes, R. Luna-Gonzalez, A. del Carmen Flores-Miranda, M. Alvarez-Ruiz, P. Fierro-Coronado, J. A. Sánchez-Ortiz, A. C. Ávila-Leal, J. (2015). Isolation

- and characterization of potential probiotic bacteria suitable for mollusk larvae cultures. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 45(1), 11.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report.
- Favaro, L.Basaglia, M.Casella, S.Hue, I.Dousset, X.de Melo Franco, B. D. G. Todorov, S. D. (2014). Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiology*, 38, 228-239.
- Fijan, S. (2016). Antimicrobial effect of probiotics against common pathogens. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, 191-221.
- Forman, H. J. (2008). Hydrogen peroxide: the good, the bad, and the ugly. In *Oxidants in biology* (pp. 1-17): Springer.
- FranzC.Huch, M.Abriouel, H.Holzapfel, W. Galvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 125-140. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014
- FranzM., C.Stiles, M. E.Schleifer, K. H. Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 105-122.
- G-Alegría, E.López, I.Ruiz, J. I.Sáenz, J.Fernández, E.Zarazaga, M. Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *Fems Microbiology Letters*, 230(1), 53-61.
- Gálvez, A.Valdivia, E.Abriouel, H.Camafeita, E.Mendez, E.Martínez-Bueno, M. Maqueda, M. (1998). Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Archives of Microbiology*, 171(1), 59-65.
- Garcia-Ruiz, A.de Llano, D. G.Esteban-Fernandez, A.Requena, T.Bartolome, B. Moreno-Arribas, M. V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, 44, 220-225. doi:10.1016/j.fm.2014.06.015
- García-Ruiz, A.de Llano, D. G.Esteban-Fernández, A.Requena, T.Bartolomé, B. Moreno-Arribas, M. V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, 44, 220-225.
- García, M. a. T.Cañamero, M. M. n.Lucas, R.Omar, N. B.Pulido, R. P. Gálvez, A. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *International Journal of Food Microbiology*, 90(2), 161-170.
- Garham, K.Stack, H. Rea, R. (2020). Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(22), 3836-3861.
- Ghrai, T.Frere, J.Berjeaud, J. Manai, M. (2008). Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*, 19(2), 162-169.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS microbiology reviews*, 26(2), 163-171.
- Giraffa, G.Olivari, A. Neviani, E. (2000). Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. *Food Microbiology*, 17(6), 671-677.

- Gomes, B. C.Esteves, C. T.Palazzo, I. C.Darini, A. L. C.Felis, G. E.Sechi, L. A. De Martinis, E. C. (2008). Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, 25(5), 668-675.
- Guo, X.-H.Kim, J.-M.Nam, H.-M.Park, S.-Y. Kim, J.-M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321-326.
- Hammad, A. M.Hassan, H. A. Shimamoto, T. (2015). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control*, 50, 815-820.
- Hanchi, H.Mottawea, W.Sebei, K. Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1791.
- Hasman, H.Villadsen, A. G. Aarestrup, F. M. (2005). Diversity and stability of plasmids from glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) isolated from pigs in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 11(2), 178-184.
- Hayaloglu, A.Cakmakci, S.Brechany, E.Deegan, K. McSweeney, P. (2007). Microbiology, biochemistry, and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1102-1121.
- Hebert, L.Courtin, P.Torelli, R.Sanguinetti, M.Chapot-Chartier, M. P.Auffray, Y. Benachour, A. (2007). *Enterococcus faecalis* constitutes an unusual bacterial model in lysozyme resistance. *Infection and Immunity*, 75(11), 5390-5398. doi:10.1128/iai.00571-07
- Hugas, M.Garriga, M. Aymerich, M. (2003). Functionalty of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 223-233.
- Hussain, M.Khan, M. T.Wajid, A. Rasool, S. A. (2008). Technological characterization of indigenous enterococcal population for probiotic potential. *Pak J Bot*, 40(867), e75.
- Ispirli, H.Demirbas, F. Dertli, E. (2017). Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. *Lwt-Food Science and Technology*, 75, 358-365. doi:10.1016/j.lwt.2016.09.010
- Iweriebor, B. C.Obi, L. C. Okoh, A. I. (2015). Virulence and antimicrobial resistance factors of *Enterococcus* spp. isolated from fecal samples from piggery farms in Eastern Cape, South Africa. *BMC microbiology*, 15(1), 1-11.
- Iweriebor, B. C.Obi, L. C. Okoh, A. I. (2016). Macrolide, glycopeptide resistance and virulence genes in *Enterococcus* species isolates from dairy cattle. *Journal of medical microbiology*, 65(7), 641-648.
- Jaouani, I.Abbassi, M.Ribeiro, S.Khemiri, M.Mansouri, R.Messadi, L. Silva, C. (2015). Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 1089-1100.
- Jeronymo-Ceneviva, A. B.de Paula, A. T.Silva, L. F.Todorov, S. D.Franco, B. Penna, A. L. B. (2014). Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Water-Buffered Mozzarella Cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(3-4), 141-156. doi:10.1007/s12602-014-9166-2
- Jouhaud, L. (1899). Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *CR Soc Biol*, 5(26971.2).
- Kansandee, W.Moonmangmee, D.Moonmangmee, S. Itsaranuwat, P. (2019). Characterization and *Bifidobacterium* spp. growth stimulation of exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecalis* EJRM152 isolated from human breast milk. *Carbohydrate Polymers*, 206, 102-109. doi:10.1016/j.carbpol.2018.10.117

- Karasu, N. (2006). Turşu ve zeytinden antagonistik ve probiyotik özellikte laktik starter kültür eldesi. Yüksek Lisans Tezi. *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Karasu, N. Simsek, O. Con, A. H. (2010). Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Annals of Microbiology*, 60(2), 227-234. doi:10.1007/s13213-010-0031-6
- Kaushik, J. K. Kumar, A. Duary, R. K. Mohanty, A. K. Grover, S. Batish, V. K. (2009). Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PloS one*, 4(12), e8099.
- Khalkhali, S. Mojgani, N. (2017). Bacteriocinogenic potential and virulence traits of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from human milk. *Iranian journal of microbiology*, 9(4), 224.
- Khan, S. U. (2014). Probiotics in dairy foods: a review. *Nutrition & Food Science*.
- Kiely, L. J. Olson, N. F. (2000). The physicochemical surface characteristics of *Lactobacillus casei*. *Food Microbiology*, 17(3), 277-291.
- Kim H., S. Kim, D. H. Lim, H. W. Seo, K. H. (2020). High prevalence of non-faecalis and non faecium *Enterococcus* spp. in farmstead cheesehouse and their applicability as hygiene indicators. *LWT-Food Science and Technology*, 126. doi:10.1016/j.lwt.2020.109271
- Kim S., W. Perl, L. Park, J. H. Tandianus, J. E. Dunn, N. W. (2001). Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiology*, 43(5), 346-350.
- Kiruthiga, A. Padmavathy, K. Shabana, P. Naveenkumar, V. Gnanadesikan, S. Malaiyan, J. (2020). Improved detection of esp, hyl, asa1, gelE, cylA virulence genes among clinical isolates of *Enterococci*. *BMC research notes*, 13(1), 1-7.
- Lähteinen, T. Malinen, E. Koort, J. M. Mertaniemi-Hannus, U. Hankimo, T. Karikoski, N. Söderholm, H. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces. *Anaerobe*, 16(3), 293-300.
- Leroy, F. Moreno, M. F. De Vuyst, L. (2003). *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 235-240.
- Leslie, S. B. Israeli, E. Lighthart, B. Crowe, J. H. Crowe, L. M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3592-3597.
- Li, S. Y. Zhao, Y. J. Zhang, L. Zhang, X. Huang, L. Li, D. Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry*, 135(3), 1914-1919. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.048
- Locock, K. E. Michl, T. D. Valentin, J. D. Vasilev, K. Hayball, J. D. Qu, Y. Haeussler, M. (2013). Guanlylated polymethacrylates: a class of potent antimicrobial polymers with low hemolytic activity. *Biomacromolecules*, 14(11), 4021-4031.
- Maasjost, J. Lüscho, D. Kleine, A. Hafez, H. M. Mühldorfer, K. (2019). Presence of virulence genes in *Enterococcus* species isolated from meat turkeys in Germany does not correlate with chicken embryo lethality. *Biomed Research International*, 2019.
- MacCallum, W. G. Hastings, T. W. (1899). A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. spec.), with a description of the microorganism. *The Journal of experimental medicine*, 4(5-6), 521-534.

- Maldonado, N. C.de Ruiz, C. S.Otero, M. C.Sesma, F. Nader-Macías, M. E. (2012). Lactic acid bacteria isolated from young calves—characterization and potential as probiotics. *Research in Veterinary Science*, 92(2), 342-349.
- Mallappa, R. H.Singh, D. K.Rokana, N.Pradhan, D.Batish, V. K. Grover, S. (2019). Screening and selection of probiotic *Lactobacillus* strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 105, 272-281. doi:10.1016/j.lwt.2019.02.002
- Margalho, L. P.van Schalkwijk, S.Bachmann, H. Sant’Ana, A. S. (2020). *Enterococcus* spp. in Brazilian artisanal cheeses: Occurrence and assessment of phenotypic and safety properties of a large set of strains through the use of high throughput tools combined with multivariate statistics. *Food Control*, 118, 107425.
- Martin-Platero, A. M.Valdivia, E.Maqueda, M. Martinez-Bueno, M. (2009). Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132(1), 24-32. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.010
- Martín-Platero, A. M.Valdivia, E.Maqueda, M. Martínez-Bueno, M. (2009). Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132(1), 24-32.
- McBride, S. M.Fischetti, V. A.LeBlanc, D. J.Moellering Jr, R. C. Gilmore, M. S. (2007). Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PloS one*, 2(7), e582.
- Mercha, I.Lakram, N.Kabbour, M. R.Bouksaim, M.Zkhiri, F. El Maadoudi, E. (2020). Probiotic and technological features of *Enterococcus* and *Weissella* isolates from camel milk characterised by an Argane feeding regimen. *Archives of Microbiology*, 202(8), 2207-2219. doi:10.1007/s00203-020-01944-6
- Mishra, V. Prasad, D. N. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 109-115. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.047
- Morandi, S.Silvetti, T. Brasca, M. (2013). Biotechnological and safety characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy origin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(1), 239-249.
- Moreno, M. (2006). F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou, De Vuyst L. In: The role application of enterococci in food and health//Int. J. Food Microbiol.
- Moy, T. I.Mylonakis, E.Calderwood, S. B. Ausubel, F. M. (2004). Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity*, 72(8), 4512-4520.
- Mundy, L.Sahm, D. Gilmore, M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 513-522.
- Murry, A.Hinton, A. Morrison, H. (2004). Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Poult. Sci*, 3(9), 603-607.
- Nami, Y.Bakhshayesh, R. V.Jalaly, H. M.Lotfi, H.Eslami, S. Hejazi, M. A. (2019). Probiotic Properties of *Enterococcus* Isolated From Artisanal Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00300
- Nascimento, L. C. S.Casarotti, S. N.Todorov, S. D. Penna, A. L. B. (2019). Probiotic potential and safety of enterococci strains. *Annals of Microbiology*, 69(3), 241-252.

- Nueno-Palop, C. Narbad, A. (2011). Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 390-394. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.029
- Oh, Y. J. Jung, D. S. (2015). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from Omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. *Lwt-Food Science and Technology*, 63(1), 437-444.
- Olasupo, N.Schillinger, U. Holzapfel, W. (2001). Studies on some technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Nigerian fermented foods. *Food Biotechnology*, 15(3), 157-167.
- Olvera-García, M.Sanchez-Flores, A. Baruch, M. Q. (2018). Genomic and functional characterisation of two *Enterococcus* strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(5), 2251-2267.
- Omar, N. B.Castro, A.Lucas, R.Abriouel, H.Yousif, N. M.Franz, C. M. Gálvez, A. (2004). Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 118-130.
- Osmanagaoglu, O.Kiran, F. Ataoglu, H. (2010). Evaluation of in vitro probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(3), 162-174.
- Osuntoki, A. Korie, I. (2010). Antioxidant activity of whey from milk fermented with *Lactobacillus* species isolated from Nigerian fermented foods. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 505-511.
- Özkan, E. R. (2021). Genetik Karakterizasyonu Yapılmış Çeşitli Laktik Asit Bakteriklerinin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. (Doktora Tezi), *Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Özlü, H. (2015). Bazı peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneği. (Doktora Tez), *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum*.
- Ozyurt, V. H. Ötles, S. (2014). Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(4), 413-424.
- Pereira, D. I. A. Gibson, G. R. (2002). Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(4), 259-+. doi:10.1080/10409230290771519
- Perez, M.Calles-Enríquez, M.Del Rio, B.Redruello, B.de Jong, A.Kuipers, O. P. Fernandez, M. (2019). Construction and characterization of a double mutant of *Enterococcus faecalis* that does not produce biogenic amines. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.
- Perin, L. M.Belviso, S.BELLO, B. d.Nero, L. A. Cocolin, L. (2017). Technological properties and biogenic amines production by bacteriocinogenic lactococci and enterococci strains isolated from raw goat's milk. *Journal of Food Protection*, 80(1), 151-157.
- Perin, L. M.Miranda, R. O.Todorov, S. D.de Melo Franco, B. D. G. Nero, L. A. (2014). Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 121-126.
- Prabhurajeshwar, C. Chandrakanth, K. (2019). Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental*, 23, 97-115.

- Pundir, R. K. Rana, S. Kashyap, N. Kaur, A. (2013). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an in vitro study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(3), 85.
- Pyar, H. Peh, K. (2014). Characterization and identification of *Lactobacillus acidophilus* using biolog rapid identification system. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 6(1), 189-193.
- Quigley, L. O'Sullivan, O. Stanton, C. Beresford, T. P. Ross, R. P. Fitzgerald, G. F. Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664-698.
- Rajoka, M. S. R. Hayat, H. F. Sarwar, S. Mehwish, H. M. Ahmad, F. Hussain, N. Shi, J. (2018). Isolation and Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Poultry Intestine. *Microbiology*, 87(1), 116-126. doi:10.1134/s0026261718010150
- Ramadan, K. S. Sameoto, D. Evoy, S. (2014). A review of piezoelectric polymers as functional materials for electromechanical transducers. *Smart Materials and Structures*, 23(3), 033001.
- Rastogi, S. Mittal, V. Singh, A. (2020). In vitro evaluation of probiotic potential and safety assessment of *Lactobacillus mucosae* strains isolated from Donkey's lactation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 1045-1056.
- Reid, G. Jass, J. Sebulsky, M. T. McCormick, J. K. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 658-672.
- Ren, D. Y. Li, C. Qin, Y. Q. Yin, R. L. Du, S. W. Ye, F. Jin, N. Y. (2014). In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, 30, 1-10. doi:10.1016/j.Anaerobe.2014.07.004
- Rogers, L. (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 16(5), 321-325.
- Ruas-Madiedo, P. Hugenholtz, J. Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 163-171.
- Sabir, F. Beyatli, Y. Cokmus, C. Onal-Darilmaz, D. (2010). Assessment of Potential Probiotic Properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. Strains Isolated from Kefir. *Journal of Food Science*, 75(9), M568-M573. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01855.x
- Sagdic, O. Tornuk, F. Öztürk, İ. Karasu, S. Yilmaz, M. T. Biological Preservation of Foods.
- Sagdic, O. Tornuk, F. Öztürk, İ. Karasu, S. Yilmaz, M. T. (2014). Biological Preservation of Foods. In *Microbial Food Safety and Preservation Techniques* (pp. 472-495): CRC Press.
- Sakandar, H. A. Usman, K. Imran, M. (2018). Isolation and characterization of gluten-degrading *Enterococcus mundtii* and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough (Khamir). *LWT-Food Science and Technology*, 91, 271-277. doi:10.1016/j.lwt.2018.01.023
- Schär-Zammaretti, P. Ubbink, J. (2003). The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical Journal*, 85(6), 4076-4092.
- Schleifer, K. H. Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(1), 31-34.

- Serio, A.Paparella, A.Chaves-Lopez, C.Corsetti, A. Suzzi, G. (2007). *Enterococcus* populations in Pecorino Abruzzese cheese: biodiversity and safety aspects. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1561-1568.
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), 1262-1277.
- Shekh, S. L.Dave, J. M. Vyas, B. R. M. (2016). Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and γ -amino butyric acid production. *LWT*, 74, 234-241.
- Shin, Y.Kang, C.-H.Kim, W. So, J.-S. (2019). Heat adaptation improved cell viability of probiotic *Enterococcus faecium* HL7 upon various environmental stresses. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 618-626.
- Taheur, F. B.Kouidhi, B. Fdhila, K. Elabed, H.Slama, R. B.Mahdouani, K. Chaieb, K. (2016). Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 97, 213-220.
- Tassou,C.C. Panagou,E.Z. Katsaboxakis,K.Z. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, 19(6), 605-615. doi:10.1006/fmic.2002.0480
- Temmerman, R.Pot, B.Huys, G. Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 1-10.
- Thiercelin, M. Jouhaud, L. (1903). Reproduction de l'enterocoque; taches centrales; granulations peripheriques et microblastes. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie Paris*, 55, 686-688.
- Tomaro-Duchesneau, C.Jones, M. L.Shah, D.Jain, P.Saha, S. Prakash, S. (2014). Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: an in vitro investigation. *Biomed Research International*, 2014.
- Tuncer, Y. (2009). Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. *African Journal of Biotechnology*, 8(24).
- Turchi, B.Mancini, S.Fratini, F.Pedonese, F.Nuvoloni, R.Bertelloni, F. Cerri, D. (2013). Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(10), 1913-1922. doi:10.1007/s11274-013-1356-7
- Vankerckhoven, V.Van Autgaerden, T.Vael, C.Lammens, C.Chapelle, S.Rossi, R. Goossens, H. (2004). Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4473-4479.
- Vasiljevic, T. Jelen, P. (2001). Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(2), 75-85.
- Vidhyasagar, V. Jeevaratnam, K. (2013). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 235-243.
- Vogel, R. F. Ehrmann, M. A. Gänzle, M. G. (2002). Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 631-638.

- Xu, H., Jeong, H., Lee, H., Ahn, J. (2009). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology*, 49(4), 434-442.
- Yerlikaya O., Akbulut, N. (2019). Potential use of probiotic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains in Izmir Tulum cheese as adjunct culture. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 56(4), 2175-2185. doi:10.1007/s13197-019-03699-5
- Yerlikaya O., Akbulut, N. (2020). In vitro characterisation of probiotic properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1), 98-107. doi:10.1111/1471-0307.12645
- Yuksekdag, Z., N. Beyatli, Y. Aslim, B. (2004). Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 37(6), 663-667. doi:10.1016/j.lwt.2004.02.004
- Zago, M., Fornasari, M., E. Carminati, D. Burns, P. Suarez, V. Vinderola, G. Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28(5), 1033-1040. doi:10.1016/j.fm.2011.02.009
- Zanella, R. C., Lima, M. d. J., C. Tegani, L. S., Hitomi, A., Brandileone, M. C. d. C., Palazzo, I. C. V., Darini, A. L. d. C. (2006). Emergence of vanB phenotype-vanA genotype in vancomycin-resistant enterococci in Brazilian hospital. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 117-118.
- Zhao, G., Zhang, G. (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 333-338.
- Zommiti, M., Cambrone, M., Maillot, O., Barreau, M., Sebei, K., Connil, N. (2018). Evaluation of Probiotic Properties and Safety of *Enterococcus faecium* Isolated From Artisanal Tunisian Meat "Dried Ossban". *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01685
- Zommiti, M., Bouffartigue, E., Maillot, O., Barreau, M., Szunerits, S., Sebei, K., Ferchichi, M. (2018). In vitro Assessment of the Probiotic Properties and Bacteriocinogenic Potential of *Pediococcus pentosaceus* MZF16 Isolated From Artisanal Tunisian Meat "Dried Ossban". *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02607
- Zoumpopoulou, G., Tzouvanou, A., Mavrogonatou, E., Alexandraki, V., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Kletsas, D. (2018). Probiotic features of lactic acid bacteria isolated from a diverse pool of traditional Greek dairy products regarding specific strain-host interactions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(2), 313-322.

EKLER

EK-1: Varyans Analiz sonuçları

Tablo 1: *Enterococcus* spp. izolatlarının lizozim toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	0.dakika			30.dakika			120.dakika		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	12	0.049438	96.48**	12	0.0412	1.65**	12	0.532	1.42*
Hata	13	0.000712		13	0.0250		13	0.375	
Toplam	25			25			25		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz

Tablo 2: 192, 258 ve 262 no'lu *Enterococcus faecium* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	192			258			262		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	0.04220	17.22**	2	0.080317	104.76**	2	0.036867	50.27*
Hata	3	0.00245		3	0.000767		3	0.000733	
Toplam	5			5			5		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 3: 270, 427 ve 436 no'lu *Enterococcus faeium* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	270			427			436		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	0.139050	166.86*	2	0.9867	26.17**	2	0.00140	0.21**
Hata	3	0.000833		3	0.0377		3	0.00672	
Toplam	5			5			5		

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns önemsiz.

Tablo 4: 455, 656, 736 ve 1130 no'lu *Enterococcus faecium* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	455			656			736			1130		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	0.0827	3.61**	2	0.0626	2.63**	2	0.0404	0.96*	2	0.0193	0.65*
Hata	3	0.0229		3	0.0238		3	0.0423		3	0.0297	
Toplam	5			5			5			5		

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns önemsiz.

Tablo 5: 28, 367 ve 388 no'lu *Enterococcus faecalis* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	28			367			388		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	0.0363	0.90**	2	0.0074	0.45**	2	0.02162	8.88*
Hata	3	0.0404		3	0.0162		3	0.00243	
Toplam	5			5			5		

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns önemsiz.

Tablo 6: *Enterococcus spp.* izolatlarının safra toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	% 0.06			% 0.125			% 0.25		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
<i>Enterococcus spp.</i>	12	0.00626	4.77*	12	0.01742	16.14**	12	0.01750	13.21**
Hata	13	0.00131		13	0.00108		13	0.00132	
Toplam	25			25			25		
Varyasyon Kaynağı	% 0.5			% 1					
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri			
<i>Enterococcus spp.</i>	12	0.00860	7.83**	12	0.01630	11.18**			
Hata	13	0.00110		13	0.00146				
Toplam	25			25					

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns önemsiz.

Tablo 7: Farklı safra konsantrasyonunun 192, 258 ve 262 no'lu *Enterococcus faecium* izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	192			258			262		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
Safra oranı	4	0.005742	8.42**	4	0.005036	5.72**	4	0.009639	11.80*
Hata	5	0.000682		5	0.000880		5	0.000817	
Toplam	9			9			9		

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns önemsiz.

Tablo 8: Farklı safra konsantrasyonunun 270, 427 ve 436 no'lu *Enterococcus faecium* izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	270			427			436		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	4	0.002737	3.39	4	0.00134	0.70**	4	0.007611	66.59**
Hata	5	0.000808		5	0.00193		5	0.000114	
Toplam	9			9			9		

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns önemsiz.

Tablo 9: Farklı safra konsantrasyonunun 455, 656, 736 ve 1130 no’lu *Enterococcus faecium* izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	455			656			736			1130		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	4	0.004569	11.74**	4	0.00518	4.95**	4	0.02197	11.54ns	4	0.01763	7.59*
Hata	5	0.000389		5	0.00105		5	0.00190		5	0.00232	
Toplam	9			9			9			9		

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns önemsiz.

Tablo 10: Farklı safra konsantrasyonunun 28, 367 ve 388 no’lu *Enterococcus faecalis* izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	28			367			388		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	4	0.02727	8.47ns	4	0.01976	19.53**	4	0.01776	2.13**
Hata	5	0.00322		5	0.00101		5	0.00834	
Toplam	9			9			9		

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns önemsiz.

Tablo 11: *Enterococcus* spp. izolatlarının asit toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	pH 2						pH 3					
	0. s			2. s			0. s			2. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
<i>Enterococcus</i> spp.	12	9.585	17.63**	12	10.4715	21270.30*	12	0.0695	3.91**	12	1.01904	1249.77**
Hata	13	0.544		13	0.0005		13	0.0178		13	0.00082	
Toplam	25			25			25			25		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 12: *Enterococcus* spp. izolatlarının gastrik ve pankreatik özsuya toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Gastrik Özsuya Tolerans						Pankreatik Özsuya Tolerans					
	0. s			3. s			0. s			24. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
<i>Enterococcus</i> spp.	12	0.022807	22.90**	12	0.30307	64.12**	12	0.08786	10.09**	12	0.07045	22.73**
Hata	13	0.000996		13	0.00473		13	0.00871		13	0.00310	
Toplam	25			25			25			25		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 13: *Enterococcus* spp. izolatlarının adezyon kabiliyetine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Hidrofobisite						Oto-agregasyon					
	n-hekzadekan			ksilen			3. s			24. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
<i>Enterococcus</i> spp.	12	111.3	9.28**	9	1287	8.99**	12	20.1	1.46ns	12	35.8	2.73*
Hata	13	12.0		13	143		13	13.8		13	13.1	
Toplam	25			25			25			25		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 14: *Enterococcus* spp. izolatlarının antibakteriyal aktivitelerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644			<i>Staph. aureus</i> ATCC 25923			<i>B. cereus</i> ATCC 11778		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
<i>Enterococcus</i> spp.	12	4.476	15.02ns	12	10.992	26.59**	12	62.545	224.30**
Hata	13	0.298		13	0.413		13	0.279	
Toplam	25			25			25		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 15: *Enterococcus spp.* izolatlarının β -galaktosidaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu ve EPS üretimlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	β -galaktosidaz Aktivitesi			Kolesterol Asimilasyonu			EPS Üretimi		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
<i>Enterococcus spp.</i>	12	14.100	46.54 ^{ns}	12	282.3	6.79 ^{**}	12	39815	190.86 ^{**}
Hata	13	0.303		13	41.6		13	209	
Toplam	25			25			25		

^{**} $p < 0.01$, ^{*} $p < 0.05$, ns önemsiz.

Tablo 16: *Enterococcus spp.* izolatlarının dondurma işlemlerine dayanıklılık sonuçlarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Dondurma Öncesi			Dondurma Sonrası		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
<i>Enterococcus spp.</i>	12	0.1044	3.01 ^{**}	12	0.05980	27.62 ^{**}
Hata	13	0.0347		13	0.00217	
Toplam	25			25		

^{**} $p < 0.01$, ^{*} $p < 0.05$, ns önemsiz