



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİLAJ KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
BAKTERİYOSİN İÇERİKLERİ YÖNÜNDEN
İNCELENMESİ**

TANER İŞEVİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2011

**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİLAJ KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
BAKTERİYOSİN İÇERİKLERİ YÖNÜNDEN
İNCELENMESİ**

TANER İŞEVİ

**Bu tez,
Zootekni Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır.**

KAHRAMANMARAŞ 2011

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Taner İŞEVİ tarafından hazırlanan “Silaj Kaynaklı Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin İçerikleri Yönünden İncelenmesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 16/08/2011 tarihinde oy birliği ile Zootekni Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Ünvan, Ad ve Soyad (DANIŞMAN) Doç. Dr. Mehmet Ali BAL
Anabilim Dalı, Üniversite Adı Zootekni, K.S.Ü.

Ünvan, Ad ve Soyad (ÜYE) Prof. Dr. M. Sait EKİNCİ
Anabilim Dalı, Üniversite Adı Zootekni, K.S.Ü.

Ünvan, Ad ve Soyad (ÜYE) Yrd.Doç. Dr. E. Banu BÜYÜKÜNAL BAL
Anabilim Dalı, Üniversite Adı Biyoloji, K.S.Ü.

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. M. Hakkı ALMA

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Taner İŞEVİ

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2010/5-2YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

**SİLAJ KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOSİN
İÇERİKLERİ YÖNÜNDEN İNCELENMESİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

Taner İŞEVİ

ÖZ

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenen peptidler olup, üretildiği mikroorganizmaya yakın türler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptirler. Laktik asit bakteri (LAB) grubundaki *Enterococcus* türleri tarafından sentezlenen bakteriyosinler enterosin olarak isimlendirilmektedir. Bu çalışmada silaj kaynaklı 3 *Enterococcus* izolatında (2 adet *E. faecium* ve 1 adet *E. faecalis*) test bakterilerine karşı bakteriyosin aktivitesinin bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Buna ilaveten, izolatların β -hemoliz özellikleri ile plazmid içerikleri ve bazı enterosin yapısal genlerine sahip olup olmadıkları da incelenmiştir. Bakteriyosin aktivitesine ve yapısal genlere sahip olduğu belirlenen *E. faecium* U7 suşunun büyüme eğrileri ve bakteriyosin üretimi belirlenmiştir. Ayrıca, bu suşa ait hücre içermeyen süpernatant (CFS) ve kısmen saflaştırılmış enterosin (PPE) örneğinden bakteriyosinin karakterizasyonuna yönelik deneyler yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Silaj, Bakteriyosin, Enterosin, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı, Ağustos, 2011

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Ali BAL

Sayfa sayısı: 48

**A RESEARCH ON THE BACTERIOCIN CONTENTS OF SILAGE BASED
LACTIC ACID BACTERIA
(M.S. THESIS)**

Taner İŞEVİ

ABSTRACT

Bacteriocins are peptide like substances of bacteria and having an anti-microbial nature on their classes of closest microorganism. Bacteriocins produced by *Enterococcus* species in lactic acid bacteria (LAB) group are called enterocins. In this study, silage originated 3 *Enterococcus* isolates (2 *E. faecium* and 1 *E. faecalis*) were studied against test bacteria in terms of their bacteriocin activities. In addition, those isolates were tested for their β -hemolytic activities, plasmid contents and presence of structural enterocin genes. *E. faecium* U7 had both bacteriocin producing capability and structural genes. In addition, the experiments were performed with cell free supernatant (CFS) and partial purified enterocin (PPE) of this isolate for bacteriocin characterization.

Key Words: Silage, Bacteriocin, Enterocin, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*

Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Institute for Graduate Studies in Science and Technology
Department of Animal Science, August, 2011

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Ali BAL

Page number: 48

SİLAJ KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOSİN İÇERİKLERİ YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

ÖZET

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenen peptidler olup üretildiği mikroorganizmaya yakın türler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptirler. Laktik asit bakteri (LAB) grubundaki *Enterococcus* türleri tarafından üretilen bakteriyosinler ise enterosin olarak isimlendirilmektedir. Bu çalışmada silaj kaynaklı 3 adet *Enterococcus* izolatının (*E. faecium* U7, *E. faecium* N56 ve *E. faecalis* N57) bakteriyosin aktivitesi incelenmiştir. İzolatlardan iki tanesinde (*E. faecium* U7 ve *E. faecalis* N57) *Enterococcus* spp.'ye karşı antimikrobiyal aktivite saptanırken, bunlardan *E. faecium* U7'nin *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı bakteriyosin aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. İzolatlarda yaygın olarak bulunan enterosin yapısal genlerinin (*entA*, *entB*, *entP* ve *entL50B*) varlığı incelendiğinde, bu genlerden üçünün sadece *E. faecium* U7 izolatında bulunduğu belirlenmiştir. İzolatların plazmid içeriği ve hemoliz özellikleri benzerlik gösterirken, tümünün β -hemolitik olmadığı tespit edilmiştir.

E. faecium U7 izolatının büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretimi incelendiğinde, en fazla bakteriyosin üretiminin logaritmik fazın sonlarında meydana geldiği bulunmuştur. Bu izolattan elde edilen hücre-içermeyen süpernatant (CFS) örneklerinin *L. monocytogenes* ATCC 7644'in büyümesi üzerine etkisi incelendiğinde, CFS eklenen kültürlerdeki büyümenin en fazla 4. ve 6. saatlerde engellendiği görülmüştür.

E. faecium U7 izolatından elde edilen kısmen saflaştırılmış enterosin (PPE) örneğinin trisin-SDS-PAGE analizi sonrasında birden fazla protein bandına sahip olduğu görülürken, bunlardan hiçbirinin bakteriyosin aktivitesine sahip olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte, boyanma sonrası bant görünmeyen bir bölgede (yaklaşık 4 kDa) bakteriyosin aktivitesi tespit edilmiştir.

Çalışma sonuçlarının tümü ele alındığında *E. faecium* U7 izolatının birden fazla enterosin varlığına sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu izolatın *L. monocytogenes* üzerindeki özgün antibakteriyal etkisinin bulunması ve β -hemoliz özelliğe sahip olmaması farklı uygulama alanlarında kullanımını mümkün kılmaktadır.

A RESEARCH ON THE BACTERIOCIN CONTENTS OF SILAGE BASED LACTIC ACID BACTERIA

SUMMARY

Bacteriocins are peptide like substances of bacteria and having an antimicrobial nature on their classes of closest microorganism. Bacteriocins produced by *Enterococcus* species in lactic acid bacteria (LAB) group are called enterocins. In this study, bacteriocin activities of silage based 3 *Enterococcus* isolates (*E. faecium* U7, *E. faecium* N56, *E. faecalis* N57) were studied. Two isolates (*E. faecium* U7, and *E. faecalis* N57) showed an antimicrobial activity against *Enterococcus* spp., and *E. faecium* U7 showed a bacteriocin activity against *L. monocytogenes* ATCC 7644. Based on the common enterocin structural genes (*ent A*, *ent B*, *ent P*, and *ent L50B*), only three of them was present in *E. faecium* U7 isolate. Plasmid contents and hemolysis characteristics were similar among those isolates, and all isolates were non- β -hemolytic.

Based on the growth curve and bacteriocin production of *E. faecium* U7, the higher bacteriocin production was occurred at the end of logarithmic phase. Cell free supernatant (CFS) of *E. faecium* U7 on the growth of *L. monocytogenes* ATCC 7644 showed that the maximal CFS added culture growths were hindered at 4 and 6 h.

Partially purified enterocin (PPE) from *E. faecium* U7 with tricine-SDS-PAGE showed several protein bands and none of those protein bands had a bacteriocin activity. However there was a bacteriocin activity in one region (approximately 4 kDa) having no band after staining.

Results showed that *E. faecium* U7 isolate had enterocin presence, along with an antibacterial activity against *L. monocytogenes* and non- β -hemolytic nature. This strain can be used in various application points.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanmasında ve tezimin yazımı sırasında her türlü desteği ve kolaylığı sağlayan danışman hocam Doç.Dr. Mehmet Ali BAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar imkanlarını sunan ve çalışmanın yürütülmesinde desteklerini gördüğüm jüri üyem Yrd.Doç.Dr. E. Banu Büyükunal Bal'a da teşekkürlerimi sunarım. Tezime yapmış olduğu değerli katkılardan dolayı da jüri üyem Prof.Dr. M. Sait Ekinci'ye teşekkür ederim

Bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesindeki değerli önerilerinden dolayı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden Prof.Dr. Zeliha YILDIRIM'a da teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman olduğu gibi bu çalışmamda da içten desteğini esirgemeyen çok değerli aileme de teşekkür ederim.

Ağustos 2011, KAHRAMANMARAŞ

Taner İŞEVİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ	I
ABSTRACT	II
ÖZET	III
SUMMARY	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Laktik Asit Bakterileri (LAB).....	3
2.1.1. Enterococci.....	3
2.2. Bakteriyosinler.....	4
2.2.1. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları.....	9
2.2.2. Enterosinler.....	11
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. MATERYAL	15
3.1.1. Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri.....	15
3.1.1.1. Kristal Viyole Çözeltisi.....	15
3.1.1.2. Lugol Çözeltisi.....	15
3.1.1.3. Safranin Çözeltisi.....	16
3.1.1.4. TE Çözeltisi.....	16
3.1.1.5. 3X Gel Tampon Çözeltisi.....	16
3.1.1.6. Katot Çözeltisi.....	16
3.1.1.7. Anot Çözeltisi.....	16
3.1.1.8. Akrilamid/Bisakrilamid Karışımı.....	16
3.1.1.9. 3X Örnek Parçalama Tamponu.....	16
3.1.1.10. Sabitleme (Fixing) Çözeltisi.....	17
3.1.1.11. Boyama (Staining) Çözeltisi.....	17
3.1.1.12. Boya Uzaklaştırma (Destainin) Çözeltisi.....	17
3.1.1.13. Brain Hearth Infusion (BHI) Broth.....	17
3.1.1.14. Columbia Kanlı Agar.....	17
3.2. METOT.....	17
3.2.1. Gram Boyama	17

3.2.2. Hemoliz Özelliğinin Belirlenmesi.....	18
3.2.3. Kromozomal DNA Ekstraksiyonu.....	18
3.2.4. Plasmid DNA Ekstraksiyonu.....	18
3.2.5. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	18
3.2.6. Well Difüzyon Testi.....	18
3.2.7. Agar Spot Testi.....	19
3.2.8. Bakteriyosin Titresinin Belirlenmesi.....	19
3.2.9. CFS Ekstraktının <i>L. monocytogenes</i> 'in Üremesi Üzerine Etkisi.....	19
3.2.10. Enterosinin Kısmi Saflaştırılması.....	19
3.2.10.1. Amonyum Sülfat Çöktürme ve Diyaliz	19
3.2.10.2. Kloroform Ekstraksiyonu	19
3.2.11. Bakteriyosin Ekstraktlarında Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	20
3.2.12. Trisin-SDS Jelinin Hazırlanması.....	20
3.2.13. Trisin-SDS Jeli Üzerinde Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	20
3.2.14. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerinde Enzim ve Isı Etkisinin Belirlenmesi.....	20
3.2.15. PZR Amplifikasyonları ile Enterosin Yapısal Genlerinin Belirlenmesi.....	20
3.2.16. PZR Ürünlerinin Elektroforez ile Ayırımı.....	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	22
4.1. Silaj Kaynaklı <i>E. faecium</i> ve <i>E. faecalis</i> İzolatlarının Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
4.2. İzolatların Hemoliz Özelliğinin Belirlenmesi.....	26
4.3. İzolatların Plazmid İçeriğinin Belirlenmesi.....	27
4.4. İzolatlarda Enterosin Yapısal Genlerinin Belirlenmesi.....	28
4.5. <i>E. faecium</i> U7 İzolatının Büyüme Eğrisi ve Bakteriyosin Üretiminin Belirlenmesi.....	30
4.6. <i>E. faecium</i> U7 İzolatından Elde Edilen CFS Örneğinin <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644'ün Büyümesine Etkisi.....	32
4.7. <i>E. faecium</i> U7 İzolatına Ait Kısmen Saflaştırılmış Enterocinin Trisin-SDS PAGE Analizi.....	33
4.8. Jel Üzerinde Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	34
4.9. Farklı Enzimlerin ve Sıcaklık Uygulamalarının <i>E. faecium</i> U7 İzolatından Elde Edilen PPE Üzerine Etkisi.....	35
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 2.1. Lantiyonin ve β -lantiyonin oluşumu	7
Şekil 2.2. Bakteriyosin üretim potansiyeline sahip LAB'ların gıda güvenliği ve tıp alanlarında kullanımları	10
Şekil 4.1. <i>E. faecium</i> U7 izolatının bakteriyosin aktivitesinin well difüzyon testi ile belirlenmesi	25
Şekil 4.2. <i>E. faecium</i> U7, N56 ve <i>E. faecalis</i> N57 izolatlarının <i>Enterococcus</i> spp. üzerindeki bakteriyosin aktivitesinin agar spot testi ile belirlenmesi	25
Şekil 4.3. <i>E. faecium</i> U7, N56 ve <i>E. faecalis</i> N57 izolatlarının <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 üzerindeki bakteriyosin aktivitesinin agar spot testi ile belirlenmesi	26
Şekil 4.4. <i>E. faecium</i> U7, N56 ve <i>E. faecalis</i> N57 izolatlarının hemoliz özelliğinin belirlenmesi	27
Şekil 4.5. <i>E. faecium</i> ve <i>E. faecalis</i> izolatlarının plazmid içerikleri	28
Şekil 4.6. <i>E. faecium</i> ve <i>E. faecalis</i> izolatlarına ait hücresel DNA örnekleri üzerinde yapısal genlerin amplifikasyonu	30
Şekil 4.7. <i>E. faecium</i> U7 suşunun farklı besiyeri pH koşullarında büyüme eğrileri	31
Şekil 4.8. <i>E. faecium</i> U7 suşunun bakteriyosin üretimi	32
Şekil 4.9. <i>E. faecium</i> U7 suşuna ait CFS'nin <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644'nin büyümesi üzerine etkisi	33
Şekil 4.10. <i>E. faecium</i> U7 suşundan elde edilen PPE örneklerinin Trisin-SDS PAGE ile analizi	34
Şekil 4.11. Farklı enzimlerin PPE üzerindeki etkisi	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

	SAYFA
Çizelge 3.1. Enterosin yapısal genlerinin tespit edilmesinde kullanılan primerler	21
Çizelge 4.1. <i>E. faecium</i> ve <i>E. faecalis</i> izolatlarının bakteriyosin aktivitelerinin test bakterileri üzerinde agar spot testi ile belirlenmesi	24
Çizelge 4.2. Farklı enzim ve sıcaklık uygulamalarının PPE üzerindeki etkisi	35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

LAB: Laktik asit bakterisi

CFC: Hücre içermeyen süpernatant

PPE: Kısmen saflaştırılmış enterosin

EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid disodium salt dihydrate

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

kDA: Kilodalton

bç: Baz çifti

mM: Milimolar

rpm: Dakikadaki devir sayısı

dNTP: Deoksiribonükleotid trifosfat

TEMED: Tetramethylenediamine

APS: Ammonium persulfate

TE: Trizma base ve EDTA çözeltisi

1. GİRİŞ

Yem bitkilerinden yapılan silaj, ruminant hayvanların beslenmesinde tercih edilen önemli kaba yemlerdendir. Silaj, yeşil ve su içeriği yüksek yemlerin oksijensiz ortamda fermantasyonu sonucu elde edilen yem materyalidir. Yapılan araştırmalar ve maliyet hesapları, hayvanların rasyonlarında silaj kullanımının diğer fabrikasyon karma yemlerine göre daha ekonomik olduğunu göstermiştir.

Silaj, aneororik koşullar altında suda eriyebilen karbonhidratların öncelikle laktik asit sonrasında da asetik asite dönüştürüldüğü doğal bir fermantasyondur. Günümüzde silaj sadece AB’de yıllık üretimi 287 milyon tonu bulan dünyanın en geniş fermentasyon yöntemlerinden birisidir.

Silaj yapımı 3 aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar; başlangıç fazı, fermentasyon fazı ve silo açıldıktan sonraki aerobik fazdır. Son faz, hayvanlar tarafından tüketilen silajın kalitesinin belirlenmesinde çok büyük bir öneme sahiptir (Mueller ve ark., 2001). Silonun açıldıktan sonra havayla teması veya başlangıçta yetersiz bir şekilde sıkıştırılma işlemi yapıldığında aerobik bozulmalar oluşmakta buna bağlı olarak da, ısı ve pH artışı sonucu silaj kalitesi etkilenmektedir (Woolford, 1990). *Bacillus* sp., *Listeria* sp., küfler ve mayalar silaj bozulmalarının ana unsurunu oluşturmaktadır (Merry ve Davies, 1999). Böylece silaj mikroflorasını kontrol altına almak çok büyük bir önem arz etmektedir. Laktik asit bakterisi (LAB) içeren inokulantlar silaj katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Kullanım amaçlarının temelini, fermantasyonu hızlandırmaları ve yukarıda sözü edilen bozulmaların önüne geçmede yardımcı olmalarıdır (Saele, 2002).

Laktik asit bakterileri (LAB), temelde suda çözünebilen karbonhidratları kullanabilme kabiliyetine sahipken beraberinde organik asit, diacetyl, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler-enterosinler olarak da bilinen doğal antimikrobiyal maddeleri de üretebilmeleridir (Klaenhammer, 1993).

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen protein yapısında ve diğer bakterilere karşı antagonistik etkiye sahip bileşiklerdir. Bu bileşikler, özellikle üretici türle yakınlığı olan mikroorganizmalara karşı bakteriyostatik veya bakteriyosidal etki gösterirler. Enterik bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, spesifik hücre yüzey reseptörleri sayesinde bu etkilerini göstermektedirler (James ve ark., 1996). Bakteriyosinler diğer türlerin de bulunduğu bir mikroorganizma topluluğunda, floranın yayılmasını engelleme yeteneğine de sahiptir (Riley ve Wertz, 2002).

Bakteriyosinlerin çoğunlukla gram-pozitif bakteriler tarafından üretildiği bilinmektedir. Ancak gram-negatif bakteriler tarafından da üretilen bakteriyosinlerin varlığı bilinmekte ve bunlar mikrosinler olarak adlandırılmaktadır (Gouaux ve ark., 1997). Gram-pozitif bakterilerde bakteriyosin üretimi, logaritmik fazdan durağan faza geçiş sırasında gerçekleşmektedir. Bakteriyosinlerin ekspresyon yoğunluğu hücre döngüsüne değil, kültür yoğunluğuna bağlı olarak şekillenir (Hammami ve ark., 2007).

Günümüzde en yoğun çalışılan bakteriyosin grubu LAB'lar tarafından üretilen bakteriyosinlerdir. Klaenhammer (1988), LAB bakteriyosinlerini moleküler ağırlıkları, ısı duyarlılıkları, enzimatik duyarlılıkları, translasyon sonrası modifiye edilen amino asitlerinin olup olmayışı gibi çeşitli etki mekanizmalarına göre sınıflandırmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Laktik Asit Bakterileri (LAB)

Laktik asit bakterileri (LAB), gram pozitif, spor üretmeyen, kompleks besinsel ihtiyaca sahip fermentatif bakterilerin meydana getirdiği bir gruptur. Karbonhidrat fermentasyonu sonucunda son ürün olarak çoğunlukla laktik asit meydana getirmektedirler. G+C içerikleri %55 mol'den azdır. Filogenetik olarak çeşitli mikroorganizmaları içeren bu grup bazı ortak morfolojik, metabolik ve fizyolojik özellikleri ile karakterize edilmektedir. Kok veya çubuk şeklinde olabilen grup üyeleri mikroaerofilik ya da fakültatif aerobik özelliktedir. Son taksonomik çalışmalara göre; *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus* ve *Weissella* cinsleri bu grup kapsamındadır (Stiles ve Holzapfel, 1997).

Çoğu LAB genellikle güvenli olarak nitelendirilmekte ve gıda fermentasyonunda doğal veya seçilmiş starter olarak önemli bir görev üstlenmektedir. Bu görev, onların gıda yapısı, tadı ve lezzetinde arzu edilen değişiklikleri meydana getirebilme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır (Stiles ve Holzapfel, 1997; Cintas ve ark. 2001; Reddy ve ark., 2008). LAB'nin metabolik ürünlerinden olan laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, karbon dioksit ve bakteriyosinler, gıdaların bozulması ile ilişkili bazı patojenik mikroorganizmaların üremesini etkin şekilde durdurmakta ve bu şekilde gıdaların raf ömrünün uzamasını emniyetli bir şekilde sağlayabilmektedir (Cleveland ve ark. 2001; Chen ve Hoover, 2003; Drider ve ark., 2006).

2.1.1. Enterococci

Enterococcus cinsi, LAB grubunda yer almaktadır (Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984; Devriese ve ark., 1993; Devriese ve Pot, 1995; Franz ve ark., 2003). Bunlar bazı peynirlerinin olgunlaşması ve aroma gelişimine katkıda bulunan yardımcı kültür olarak kullanılmaktadır (Giraffa ve ark., 1997; Manolopoulou ve ark., 2003). Bazı *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* suşları çoğu ülkelerde probiyotik olarak kullanılmaktadır (Franz ve ark., 2003). Buna rağmen, çoğu nokozomiyal enfeksiyona sebep olan enterokokların güvenilirlik durumu hala sorgulanmaktadır (Giraffa, 2002). Bazı virulens faktörleri ve antibiyotik direnç özelliği *Enterococcus* türlerinde tanımlanmıştır (Mundy ve ark., 2000;

Eaton ve Gasson, 2001; Archimbaud ve ark., 2002). Çalışmalar enterekokların sahip olduğu plazmid ya da konjugatif transpozon aracılı etkin gen transfer mekanizmaları ile bu bakterilerce kodlanan antibiyotik direnç genlerinin patojenik bakterilere transfer edilebileceğini ve bu şekilde onları antibiyotiklere karşı dirençli hale getirebileceğini önermektedir (Landman ve Quale, 1997; Lukasova ve Sustackova, 2003).

2.2. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, protein ya da peptidler olup özellikle üretici türe yakın akraba olan türlere karşı bakteriyostatik veya bakteriyosidal etkiye sahiptirler (Jack ve ark., 1995). Bakteriyosinler çoğunlukla gram-pozitif ve gram negatif bakterilerde bulunmaktadır. Ancak son yıllarda özellikle LAB tarafından üretilenler gıda endüstrisinde doğal koruyucu potansiyelleri nedeniyle yoğun ilgi görmektedir (Ennahar ve ark., 1999). Bununla birlikte bazı Arke üyeleri tarafından da bakteriyosinlerin üretildiği bildirilmiştir. Farklı organizmalar tarafından üretilen bakteriyosinlerin protein dizilimlerinin karşılaştırılması sonucunda, halobakterler tarafından üretilen halosinin karakterizasyonu yapılan diğer bakteriyosinler ile hiçbir dizi benzerliğine sahip olmadığı anlaşılmıştır. Ancak *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen S pyosinin, *Escherichia coli* tarafından üretilen kolisinlerin bir kısmının, *Enterobacter cloacae* tarafından üretilen kloasin'in, *Klebsiella pneumonia* tarafından üretilen klebsin ve *Serratia marcescens* tarafından üretilen marcesin'in birbirine benzelik gösterdiği ve elde edilen bu sonucun ortak bir atadan evrim yönünde değerlendirilebileceğini göstermektedir (Riley ve Wertz, 2002).

Gram negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler genel olarak mikrosinler olarak adlandırılmaktadır. Mikrosinler; protein büyüklükleri, mikrobiyel hedefleri, etki mekanizmaları ve direnç sistemleri açısından farklılıklar içermektedir. Örneğin CoIV gibi mikrosinler sadece doğal amino asitler içerirken (modifiye olmayan), mikrosin B17 ve mikrosin C7 pek çok modifikasyona uğrarlar. MccB17 heterosiklik oksalaz, tiazol halkaları ve yüksek oranda glisin kalıntıları içerirken, mikrosin C7 amino ve karboksi uçlara sahip bir heptapeptit yapıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda translasyon sonrası modifikasyona uğrayan, 21 amino asit uzunluğunda bir peptit olan yeni bir mikrosin (mikrosin J25) tanımlanmıştır. Mikrosin J25, 58 amino asite sahip öncü bir peptit halinde sentezlenmekte ve sonrasında 37 amino asitlik öncü peptit proteolitik olarak yapıdan

uzaklaştırılarak 21 amino asitlik aktif peptidin halka yapısını oluşturmaktadır. Mikrosin J25 aktif peptid haline dönüşmesi esnasındaki olayların hangi mekanizmalar ile gerçekleştiği henüz tanımlanamamıştır (Gouaux ve ark., 1997). Kolisin gram negatif bakterilerden *Escherichia coli* tarafından üretilen bakteriyosinler arasında en çok çalışılanıdır (Pugsley, 1984; James ve ark., 1996; De Vuyst ve Vandamme, 1994).

Dar etki spektrumları yanında, farklı bakteriyosinlerin hedeflerine yönelme ve translokasyon mekanizmaları da antibiyotiklerden farklıdır. Enterik bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, hedefi bulma ve bağlanmada BtuB gibi spesifik hücre yüzey reseptörlerinden yararlanmaktadır. Hedefe tutunma gerçekleştikten sonra, Ton ve Tol yollar gibi spesifik translokasyon mekanizmalar ile hücre içine taşınırlar (James ve ark., 1996). Bu hedef ve translokasyon sistemlerinin spesifite göstermesi nedeni ile bakteriyosinlerin yalnız benzer reseptör ve translokasyon sistemine sahip olan az sayıda hedefi tanıdığı düşünülmektedir. Uzak akraba olan taksonların tamamen farklı yapılarda reseptörlere ve translokasyon sistemlerine sahip olması, bakteriyosinlerin üreticiye yakın akraba türlere karşı etkinliğinin ana nedenidir. Yapılan araştırmalar sonucunda, bakteriyosinlerin popülasyon ve komünite düzeyinde mikrobiyel çeşitliliğin sağlanmasında rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca bakteriyosinler diğer türlerin de bulunduğu bir nişte, yarışmacı floranın yayılmasını engelleme yeteneği de içermektedir (Riley ve Wertz 2002).

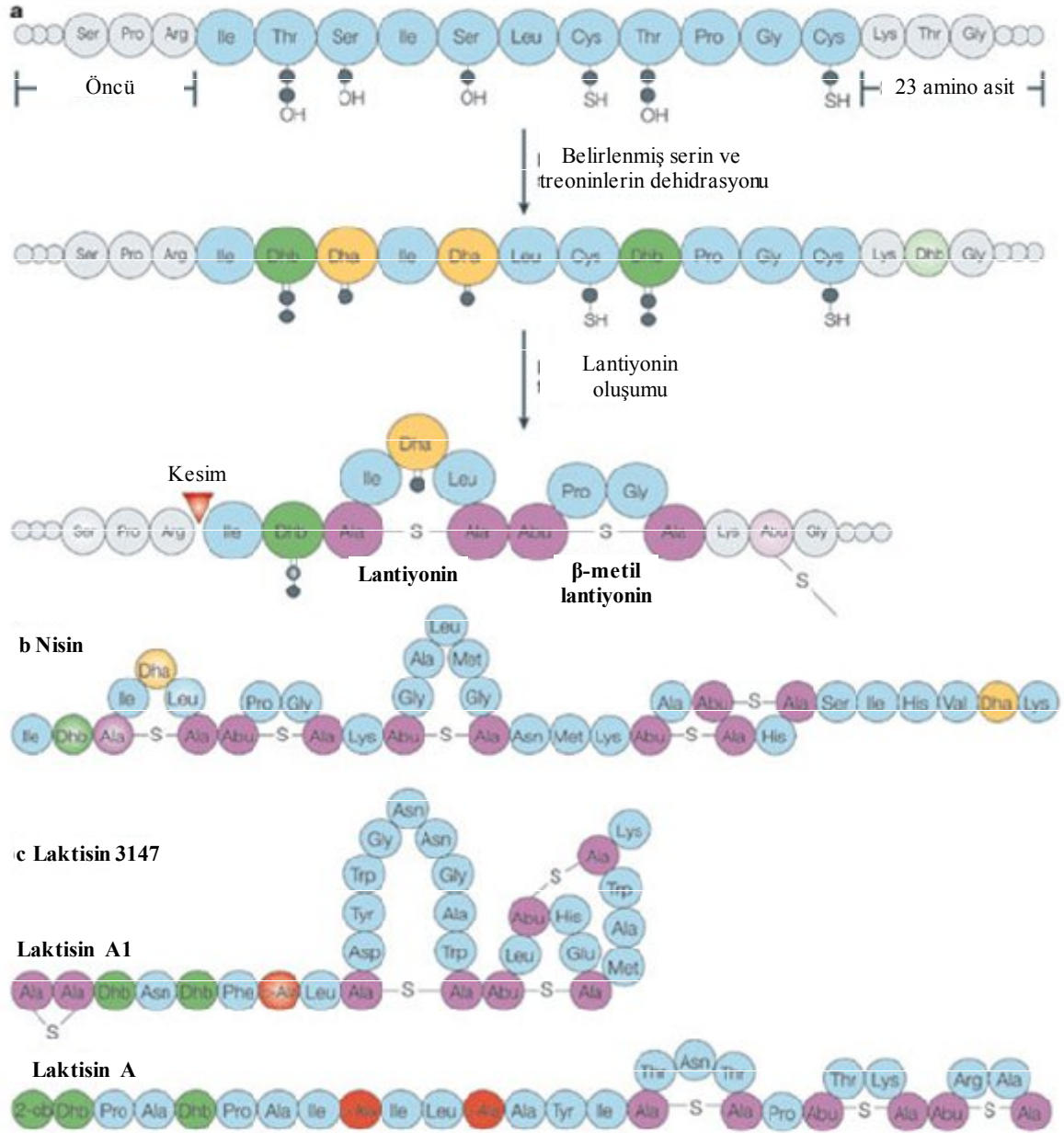
Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler gram-pozitifler tarafından üretilenlerden temelde farklılık göstermektedir (Klaenhammer, 1993). Gram-negatif bakterilerin bakteriyosinleri hücre parçalanması aracılığıyla konakçı regülasyon mekanizmalarına bağımlı olarak salgılanmaktadır (Braun ve ark., 1994; Smarda ve Smajs, 1998). Bunun aksine gram-pozitif bakterilerde bakteriyosinlerin biyosentezi kendi kendine düzenlenmekte ve salınma özgün transport mekanizmaları ile gerçekleşmektedir (van der Wal ve ark., 1995). Bununla birlikte her iki tipteki bakteriyosin bazı ortak özelliklere sahiptir (Pugsley, 1984; James ve ark., 1996; De Vuyst ve Vandamme, 1994). Öncelikle bakteriyosinler hedef hücreleri üç farklı şekilde: inaktif hale getirmektedir: 1) Sitoplazmik membranda iyon- geçirgen kanalların oluşumu, 2) Hücresel DNA'nın spesifik olmayan şekilde parçalanması veya 3) peptidoglukan ya da protein sentezinin inhibisyonu (Riley, 1998). İkincisi, bakteriyosin üreticilerinin kendilerini sentezledikleri bakteriyosinin etkilerinden korumak için genellikle bakteriyosinin C-terminal ucuna bağlı bir immünite

proteini üretmeleridir. Buna ilaveten, üretim, olgunlaşma, immünite ve regülasyon gibi özelliklerden sorumlu genler bir küme içinde ifade edilmektedir.

Bakteriyosin veri tabanında (<http://www.cck.rnu.tn/pfba/bactibase/main.php>) (Hammami ve ark., 2007) yer alan 145 adet bakteriyosinin 39'u lantiyonin içeren bakteriyosini (sınıf I), 40'ı lantiyonin içermeyen bakteriyosini (sınıf II) ve geri kalanı sınıflandırılmayan türleri kapsamaktadır (Linde ve ark. 2008). LAB tarafından üretilen bakteriyosinler en çok çalışılan bakteriyosinleri meydana getirmekte olup, biyokimyasal ve genetik özellikleri esas alındığında 4 grup altında toplanmaktadır (Klaenhammer, 1993).

Sınıf I Bakteriyosinler (Lantibiyotikler): Bu grup üyeleri, yapılarında lantiyonin ve metillanlantiyonin gibi translasyon sonrası modifiye olan, dehidre ve ender rastlanan amino asitlere sahiplerdir. Lantiyoninler, enzimatik olarak dehidre olmuş serinin (dehidro alanin, Dha), komşu bir sisteinin (Cys) sülfidril grubu ile kondensasyonu sonucu oluşmaktadır (Şekil 2.1.a). Sonuç olarak, her iki aminoasit arasında bir köprü oluşmakta ve bu şekilde modifiye peptid veya lantibiyotik içinde bir halka meydana gelmektedir. Bu süreçte görev alan ikili treonin (Thr) ve sistein ise meydana gelen farklı bir amino asit metil-lantiyonindir. Meydana gelen lantiyonin ve metil-lantiyonin köprüleri Şekil 2.1.a'da pembe renkli olarak gösterilen Ala-S-Ala (alan-S-alan) ve Abu-S-Ala (aminobütrat-S-alanin)'dir. Çok sayıda lantibiyotik ayrıca dehidre serinler (Ser) ve treoninler (Dhb) içermektedir. Bir lantibiyotik, nisin örneğinde olduğu gibi tek bir peptide sahip olabileceği gibi laktisin 3147 örneğinde olduğu gibi sinerjik olarak hareket eden iki peptide de sahip olabilmektedir (Şekil 2.1.b ve c).

Lantibiyotikler olarak da isimlendirilen bu bakteriyosinlerin, yapısal özellikleri ve antimikrobiyal aktiviteleri göz önüne alındığında A ve B olmak üzere iki alt grupta incelenmektedir. A alt grubundaki lantibiyotikler hedef hücrenin sitoplazmik zarını depolarize ederek etkilerini gösterirken, B alt grubundaki lantibiyotikler konakçı hücre enzimlerini inhibe etmektedir (Guder ve ark., 2000). Ortalama büyüklükleri 21-38 amino asit arasında olan lantibiyotiklerin büyüklükleri göz önüne alındığında B alt grubundakilerin, A alt grubundakilere göre daha küçük olduğu bilinmektedir.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Şekil 2.1. Lantiyonin ve β -lantiyonin oluşumu (Cotter ve ark., 2005)

Sınıf II Bakteriyosinler (Non-lantibiyotikler): Bu grupta yer alan bakteriyosinler küçük (<10 kDa) ve ısıya dayanıklı olup lantiyonin içermeyen peptitlerdir. Glisin gibi küçük amino asitlerce zengindirler. Genellikle katyonik ve sıklıkla amphiphilictir. Sınıf IIa ve Ib olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (Ennahar ve ark., 2000). Sınıf IIa bakteriyosinleri

pediocin-benzeri bakteriyosinler olup, N-terminal bölgelerinde %38-80 arasında benzerlik göstermektedirler (Aymerich ve ark., 1996; Cintas ve ark., 2001). Bu bakteriyosinler ayrıca N-terminal kısımda pediocin-benzeri korunmuş (konsensus) bir dizilime YGNGVxC (Nieto-Lozano ve ark., 1992; Ennahar ve ark., 2000) sahiptirler. Cintas ve ark. (2001) tarafından yapılan bilgisayar analizleri sonuçlarına göre diğer bazı korunmuş konsensus bölgelere sahip oldukları bulunmuştur. Bunlar N-terminal bölgesindeki x_1 YGNGV x_2 C x_3 K/N x_4 x_5 C x_6 VN/D x_7 x_8 x_9 A dizilimidir. Belirtilen dizilimde x_1 , tirozini veya yüksüz polar amino asitleri; x_2 , tirozini veya nötr veya pozitif yüklü polar amino asitleri; x_3 , nötr polar amino asitleri veya glisini; x_4 , nötral polar amino asitleri, x_5 , pozitif yüklü polar amino asitleri veya glisini veya nötr polar aminoasitleri; x_6 , nötr polar veya aromatik (triptofan) aminoasitleri; x_7 , triptofan veya pozitif yüklü polar amino asitleri; x_8 , glisin ya da yüksüz aromatik olmayan amino asitleri ve x_9 , yüklü veya nötr polar amino asitleri temsil etmektedir. Daha hidrofobik ve çeşitli C-terminal bölgelerinin de korunmuş pozisyonlara sahip olduğu bulunmuştur. Örneğin, alifatik polar olmayan amino asitlerden izolösin, lösin, valin ve alanin 4 ve 9. pozisyonlarda, aromatik (triptofan veya fenilalanin) veya alifatik lösin polar olmayan aminoasitleri 12. pozisyonda bulunabilmektedir. Buna ilaveten pediosin-benzeri bakteriyosinler, molekülün C-terminal bölgesinde pozitif yüklü amino asitlere sahiptir (Cintas ve ark., 2001).

Bu grup üyeleri sitoplazmik membranda por oluşturarak etki gösterdiği bilinmekle beraber, son yıllarda yapılan çalışmalar etki mekanizmasının detaylarını açıklamaktadır. Bunlardan en çok tanımlanan pediosin-benzerlerinin genel etki mekanizmasına ait olup, katyonik N-terminal yapısının β -sheet benzeri bir yapı oluşturarak hedef hücre yüzeyine bağlanırken, daha hidrofobik sarmal içeren C-terminal hedef hücre membranının hidrofobik kısmına nüfus ederek ve mannoz fosfotransferaz permeaza membran kaçağına sebep olacak şekilde bağlanması şeklindedir. Bununla birlikte çoğu membran-aktif bakteriyosin peptidinin hedef membrana nüfus eden kısımlarının, membran integral proteinlerini etkileyerek yapılarını değiştirdiği ve bu durumun membran kaçağı ve hücre ölümüne sebep olduğu düşünülmektedir (Nissen-Meyer ve ark., 2009).

Bu bakteriyosinler içinde pediocin PA-1 ilk kez ve en çok karakterize edilene oluşturmaktadır (González ve Kunka,1987; Nieto-Lozano ve ark., 1992). Iib alt grubu bakteriyosinlerden, laktokoksin G, laktokoksin F ve laktasin F, iki peptitli bakteriyosinler olup, hedef zarında por meydana getirebilmek için her iki peptide ihtiyaç duymaktadır

(Nes ve ark., 1996). Bu peptitler, tek başına oldukça zayıf inhibisyon aktivitesine sahipken, bir arada bulduklarında çok daha aktif moleküller meydana getirmektedir (Fimland ve ark., 1996, Nes ve ark., 1996, Ramnath ve ark., 2004). Bu gruba dahil diğer bazı bakteriyosinleri pediosin AcH (Bhunja ve ark., 1987), sakasin A (Schillinger ve Lucke, 1989) ve lökosin A (Hastings ve ark. 1991) oluşturmaktadır. Bir diğer alt grup ise salgı sinyallerine bağlı olarak üretilen peptitleri içeren grup IIc bakteriyosinlerdir (Guder ve ark. 2000).

Sınıf III Bakteriyosinler: Bu grupta yer alan bakteriyosinler büyük olup, ısıya duyarlı özellik göstermektedir. helvetisin J ve V (Joerger ve Klaenhammer, 1986), laktasin B (Vaughan ve ark., 1992) bu grubun en bilinen üyelerindedir.

Sınıf IV Bakteriyosinler: Bu grupta yer alan glikoproteinler (laktosin 27) ya da lipoproteinler (lakstrepsinler) aktiviteleri için protein doğasında olmayan yapılara ihtiyaç duyarlar (Upreti ve Hinsdill, 1975; Kozak ve ark., 1977).

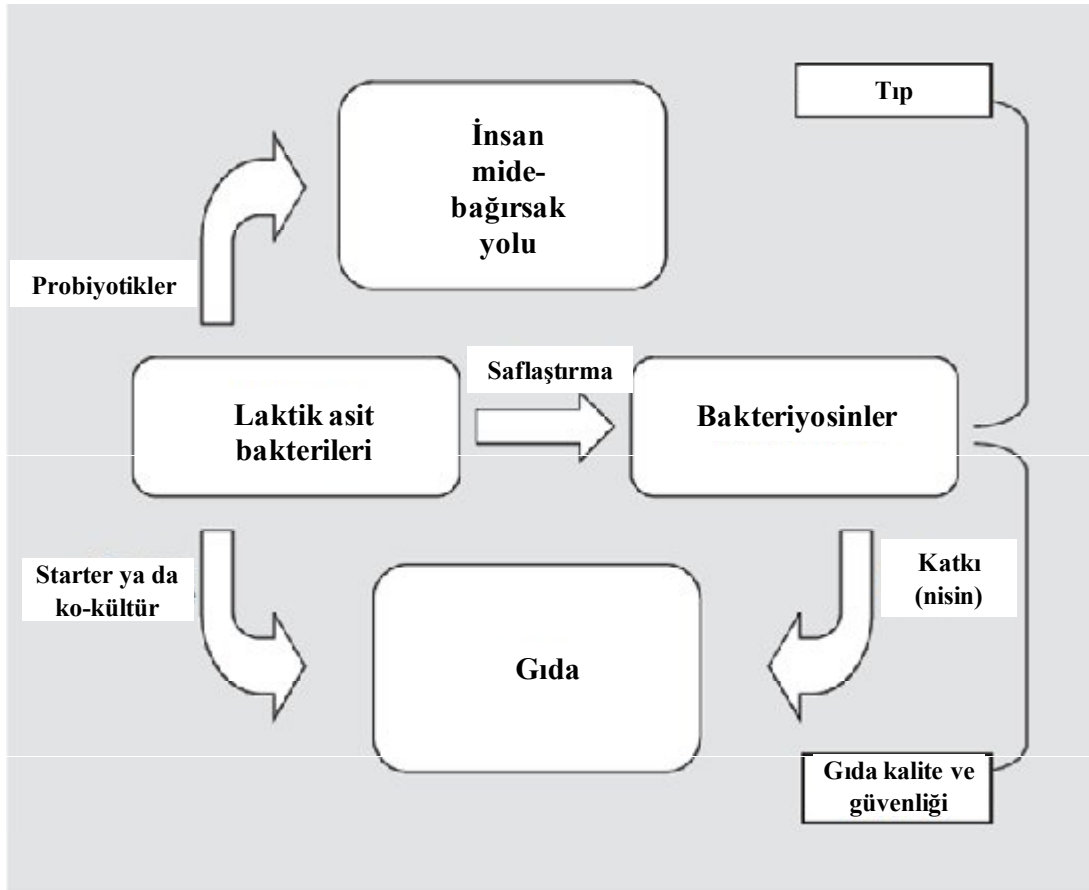
LAB'ların bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerinin konjugatif transpozonlar ya da plazmidler gibi transfer edilebilen elementler ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bakteriyosinler N-terminal öncü peptide sahip inaktif pre-peptit halinde sentezlenirler. Öncü peptidin üretici hücrede inaktif formda kalması, taşıyıcılar ile interaksyonunu sağlamakta ve modifikasyon sistemleri tarafından tanınmasında rol oynamaktadır (Xie ve ark. 2004). Peptit genellikle taşıma sistemleri ve nadiren de hücrenin genel salgı sistemleri ile hücre dışına taşınırken, kırılma gerçekleşir. Öncü dizisi bulunmayan çok az sayıda bakteriyosin tanımlanmıştır (Diep ve Nes, 2002). Bakteriyosinlerin yapısal genleri ve direnç genlerinin çoğunlukla aynı operonda ya da birbirine yakın operonlarda kodlu olduğu bilinmektedir (Nes ve ark., 1996).

2.2.1. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları

Bakteriyosinler günümüzde gıdaların lezzet ve görüntüsünü artırıcı katkıları olarak kullanılmaktadır. Bunlardan nisin kısmen saf halde ticari olarak hazırlanmıştır (De Vuyst ve Vandamme, 1994). Bu şekilde hazırlanan bir diğer bakteriyosin örneği pediosin PA-1'dir (Rodriquez ve ark. 2002). Bakteriyosinlerin gıdalara bu şekilde eklenmesine alternatif olarak, bakteriyosinler gıdalar içinde starter ya da ko-kültür aktiviteleri ile üretilebilir (Leroy ve De Vuyst, 1999). Bu tarz uygulamalarda bakteriyosin üretimi esnasında istenmeyen bakterilerin (gıda bozulmaları ile ilişkili ya da patojen olan) üremesi

de engellenebilmektedir. Gıda matriksinin karmaşıklığı ve gıdalarda bulunan bakteriyosin aktivitesini niceliksel olarak belirlemedeki zorluklar nedeniyle bakteriyosin aktivitesine sahip starterlerin görevleri *in vitro* simulasyonlar ile çalışılmaktadır (Şekil 2.2.).

Probiyotikler tarafından bakteriyosin üretimi de bakteriyosinlerin gıdalarda önemli bir kullanım alanını oluşturmaktadır. Probiyotikler canlı mikroorganizmalar olup, gıda olarak yeterli miktarda tüketildiklerinde konakçı sağlığına faydalı olmaktadır. Deneysel çalışmalar, bakteriyosin üreten probiyotiklerin insan mide-bağırsak yolundaki *in vivo* etkileşimlerde (örneğin *H. pylori*'ye karşı) önemli göreve sahip olabileceğini belirtmektedir (Kim ve ark., 2003).



Şekil 2.2. Bakteriyosin üretim potansiyeline sahip LAB'ların gıda güvenliği ve tıp alanlarında kullanımları (DeVuyst ve Leroy, 2007).

Bakteriyosin üreten organizmaların diğerk bir kullanım amacı, gıdalardakine benzer şekilde katkı maddesi olarak silajlara eklenmesidir. Bu uygulamadaki amaç da silaj oluşumu sırasında silaj kalitesini bozabilecek istenmeyen bakterilerin ortadan kaldırılmasıdır (Marcinakova ve ark., 2008).

2.2.2. Enterosinler

Enterococcus türlerinin ürettiğı bakteriyosinler enterosin olarak isimlendirilmektedir. Enterosin üreten türler doğada oldukça yaygın olup, bugüne kadar çeşitli ortamlardan (çevresel örneklerden, fermente gıda ürünlerinden, klinik materyallerden, mide-bağırsak kanallarından ve silajlardan) izole edilerek bunların bir kısmı karakterize edilmiştir (De Vuyst ve ark., 2003).

Aymerich ve ark. (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, pediosin ailesine dahil bakteriyosinlerden anti-listeriyal aktiviteye sahip bir enterosin olan enterosin A bir *Enterococcus faecium* suşundan elde edilerek, biyokimyasal ve genetik karakterizasyonu yapılmıştır.

Casaus ve ark. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada, kurutulmuş fermente sosisten elde edilen *Enterococcus faecium* TI36 adlı suşta enterosin A ile sinerjetik olarak hareket eden enterosin B ilk kez karakterize edilmiştir. Aynı çalışmada enterosin A ve B'nin inhibisyon spektrumlarının birbirinden çok az farklılık gösterdiği ve çok sayıda gram-pozitif türe karşı etkin olduğu bulunmuştur.

Cintas ve ark. (1997) tarafından yapılan bir başka çalışmada, kurutulmuş fermente sosisten izole edilen *Enterococcus faecium* P13 isimli suşta enterosin P isimli sec-bağımlı, geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip yeni bir enterosinin üretildiğı bulunmuştur.

Cintas ve ark. (1998) yaptıkları bir başka çalışmada, *Enterococcus faecium* L50 izolatında enterosin L50A ve L50B isimli iki yeni bakteriyosini tanımlayarak, bunların çoğı bakteriyosinlerin aksine N-terminal lider dizilim veya lider peptid olmaksızın salgılandığını dolayısıyla translasyon sonrası modifikasyona uğramadığını bildirmişlerdir. Buna ilaveten, bu bakteriyosinlerin sınıf II bakteriyosinlerde bulunan bazı ortak özelliklere sahip olmayıp, bazı Staphylococci üyeleri tarafından salgılanan sitolitik peptidler ile ortak özelliklere sahip olduğu bulunmuştur.

Laukova ve Marekova (2001) tarafından yapılan bir çalışmada ise, değişik hayvanların rumen içeriklerinden (buzağı, kuzu, koyun, geyik, muflon, bizon) ve atıklarından enterokokların izole edilmiş ve bunların sahip oldukları bakteriyosinlerin karakterizasyonları yapılmıştır. Sonuç olarak; farklı ruminantların rumen içeriklerinden izole edilmiş 1185 enterokok suşunda antimikrobiyal maddelerin üretimi incelendiğinde test edilen izolatların yaklaşık %70'nin en az iki test bakterisinin üremesini engelleyici bakteriyosin aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Laukova, 1992). Elde edilen bakteriyosinlerin bazı gram-negatif türler dahil geniş bir inhibitör spektrumuna sahip olmakla birlikte ısıya dayanıklı olduğu ancak proteolitik enzimlere karşı hassasiyetinin bulunduğu gözlemlenmiştir.

Bir başka çalışmada, farklı orijinlerden (et, köpek dışkısı, su kuşları dışkısı ve insan dışkısından) elde edilen 48 adet *E. faecium* ve 91 adet *E. faecalis*'den meydana gelen toplam 129 izolatin antibakteriyel aktivitesi *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* üzerinde test edilmiş ve izolatların %37'sinin en az bir test bakterisine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada 46 izolatin 24 tanesinde *entA*, *entB*, *entL50AB* ve *cyL* yapısal genlerinin en az birinin var olduğu ve bunların aynı zamanda BAC+ fenotipe sahip olduğu bulunurken, 27 izolatin BAC+ fenotipe sahip olduğu halde bu yapısal genlere sahip olmadığı bulunmuştur. (Theppangna ve ark., 2007). Günümüzde farklı enterosin genlerinin klonlanarak farklı organizmalarda heterolog ifadesine yönelik çok sayıda araştırma bulunmaktadır (O'Keeffe ve ark., 1999; Martinez ve ark., 2000; Gutierrez ve ark., 2005).

Marcinakova ve ark. (2004) silajdan izole ettikleri *Enterococcus faecium* EF9296 suşunun probiyotik özelliklerini araştırmışlardır. Bu suşun ampillicin (10 µg), erythromycin (15 µg), tetracycline, rifampicin, vancomycine (30 µg)'e karşı hassas olduğu kanamycin (30 µg)'e karşı ise dirençli olduğu belirlenmiştir. *In vitro* çalışmalar sonucunda EF9296 suşunun köpek mukozasının yanı sıra insan mukozasına iyi yapışma özelliğine sahip olduğu gözlemlenmiştir (insan için 5.5 log₁₀ kob/ml'de etkili, köpek için 4.7 log₁₀ kob/ml'de etkili). EF9296 zincirinin trypticase-soy broth (TSY) ortamında ve rumen sıvısında büyüme ilişkilerine bakılmış olup arasındaki fark araştırılmıştır. Sonuç olarak EF9296 zinciri TSY ortamında sabit faza 8 saatte (11.57 ± 0.07 log 10 kob/ml) ulaşırken, rumen sıvısında bununun 10 saatte (9.25 ± 0.48 log 10 kob/ml) olduğu gözlemlenmiştir.

Poeta ve ark. (2007) farklı vahşi hayvan kaynaklı *E. faecium* izolatlarının %37'sinin ve *E. faecalis* izolatlarının %49'unun test edilen bakterilerin en az birine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Bakteriyosin üreten silaj kaynaklı bakteriler hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Sparo ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada mısır silajından izole edilen bir *Enterococcus faecium* izolatından MR99 adlı bir enterosin karakterize edilmiştir. MR99 enterosini'nin moleküler ağırlığının yaklaşık 5000 Da ve izoelektrik noktasının 6.2 olduğu saptanırken, enterosinin proteolitik enzimlerle muamele sonrasında aktivitesini kaybettiği bulunmuştur.

Strompfova ve ark. (2008) farklı kaynaklardan (tavuk, köpek, at, domuz, tavşan, kemirici hayvan, geviş getiren evcil ve vahşi hayvanların sindirim sistemlerinin farklı kısımları, fermente edilmiş etler, köpek maması ve ot silajları) izole edilmiş 427 adet *Enterococcus faecium* (368) ve *Enterococcus faecalis* (59) suşunda enterosin A, B, P ve L50B genlerinin bulunma sıklığını incelemişlerdir. Sonuç olarak test edilen suşların %54.8'inde bir veya birden fazla yapısal gen tespit edilmiştir. PZR pozitif suşlar arasında en sık tespit edilen genler enterosin A ve P genleri olmuştur. Buna ilaveten, farklı kaynaklardan elde edilen suşların sahip oldukları genlerin bulunma sıklığında farklılık görülürken, at ve silaj kaynaklı suşlarda enterosin genlerine daha sık rastlanıldığı bulunmuştur.

Simonova ve Laukova (2007), farklı yaş gruplarına ait 23 tavşan dışkısından izole edilen *Enterococcus* izolatlarının ürettiği bakteriyosinlerin antimikrobiyal spektrumlarını belirleyerek bunların biyokimyasal karakterizasyonlarına ilaveten izolatlarda bulunan bakteriyosin yapısal genlerinin varlığını araştırmışlardır. Tavşan dışkılarında elde edilen enterokoklardan 6 tane *E. faecium* izolatının, *Enterococcus avium* EA5, *Listeria innocua* LMG13568, *Listeria monocytogenes* CCM4699 ve kullanılan diğer test bakterilerinden olan enterokok ve stafilokoklara karşı antibakteriyal aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada *entA*, *entP* ve *entL50B* yapısal genlerinin varlığı bütün enterokoklarda tespit edilirken, *entB* geninin varlığına hiçbir izolatta rastlanmamıştır. Ayrıca, *E. faecium* EF2019 izolatının en geniş engelleyici aktiviteye sahip olduğu belirlenirken, bu suşun ürettiği protein yapısındaki madde kısmen saflaştırılmış olup, pH 4.0, 7.0 ve 9.0'da stabil olduğu ve erken logaritmik büyüme fazından başlayarak üretildiği

gözlenmiştir. EF2019 izolatından elde edilen kısmen saflaştırılmış bakteriyosinin, büyümekte olan *Listeria innocua* LMG13568 kültürüne eklenmesi sonrasında 4. saatten itibaren belirgin bir büyüme inhibisyonuna sebep olarak *L. innocua* LMG13568 hücrelerinin sayısını azalttığı ve bu etkinin 24 saat boyunca devam ettiği bulunmuştur.

Marcinakova ve ark. (2008) silajdan izole edilmiş bakteriyosin üreticisi *E. faecium* EF9296 suşunu inokulat olarak çayır otu silajında kullanmışlardır. İnokulant eklenmesi sonrasında silajın besinsel değeri, aerobik stabilitesi ve antimikrobiyal etkilerini belirlemişlerdir. EF9296 ile inoküle edilmiş silajda *E. coli*, *Enterobacteriae*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* gibi bakterilerin özellikle 7. ve 14. günlerde azaldığı gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra *Listeria* ve küflerin miktarı aerobik stabilite testi süresince azalmıştır. Silaja yapılan bu ilave pH'nın hızlı bir şekilde düşmesine, laktik asitin en yüksek seviyelerde olmasına ve asetik ve bütirik asit konsantrasyonlarının azalmasına sebep olmuştur. EF9296'nın etkisi ile pH değerindeki düşüş aerobik stabilite testi dahil deneyin sonuna kadar devam etmiştir. Silaj periyodu boyunca silajın kuru madde içeriğinde de bir artma olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, *E. faecium* EF9296 izolatının hem silaj kontaminasyonunun önlenmesinde, hem de iyi kalitede bir silaj üretiminde silaj katkı maddesi olarak umut verici olduğu sonucuna varılmıştır.

Line ve ark. (2008) tavuk dışkısından elde ettikleri bir *Enterococcus* türünde *Campylobacter jejuni*'ye karşı etkili enterosin E-760'ı saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enterosin'in çeşitli proteolitik enzimler ile muamele sonrasında antimikrobiyal etkisi ortadan kalkarken, lizozim ve lipaz muamelelerinin antimikrobiyal aktiviteyi etkilemediği gösterilmiştir.

Hu ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *Enterococcus faecium* KU-B5 suşunda iki peptidli yeni bir bakteriyosin olan enterosin X bulunmuştur. Enterosin X peptidlerinin bir arada bulunma durumunda, yalnız başlarına bulunma durumlarına göre birbiri ile sinerjetik veya antagonistik etki göstererek zenginleştirilmiş veya azaltılmış bir antibakteriyel etkiye sahip olabilecekleri gösterilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

Buğday silajı kaynaklı LAB izolatları (2 adet *E. faecium* ve 1 adet *E. faecalis*), Dr. E. Banu Büyükcunal Bal'ın kültür koleksiyonundan temin edilmiş ve bakteriyosin içeriklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

İzolatların sahip olduğu bakteriyosin aktivitesi çeşitli test mikroorganizmaları üzerinde incelenmiştir. Bu test organizmaları: *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli*, *Shigella boydi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acitenobacter baumannii*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., VRE, *E. faecium*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Staphylococcus aureus* (n= 3) olup, Kahramanmaraş Sütçü İmam ve Çukurova Üniversiteleri Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dallarından temin edilmişlerdir.

3.1.1. Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri

3.1.1.1. Kristal Viyole Çözeltisi

İzolatların gram metoduna göre boyanması amacıyla kullanılmıştır (Özçelik, 1998).

Hazırlanışı

Çözelti A

Kristal viyole	2 g
Etil alkol (%95)	10 ml

Çözelti B

Amonyum okzalit	0.8 g
Distile su	80 ml

Çözelti A ve B'den eşit hacim alınarak karıştırılmış ve distile su ile 1/10 oranında sulandırılıp filtre kağıdından süzülmüştür.

3.1.1.2. Lugol Çözeltisi

Gram boyama yönteminde kristal viyolenin hücre içerisine iyice girmesi için kullanılmıştır (Özçelik, 1998).

Hazırlanışı

İyot	1 g
Potasyum iyodür	2 g
Distile su	300 ml

3.1.1.3. Safranin Çözeltisi

Gram boyama yönteminde gram negatif bakterilerin belirlenmesi için kullanılmıştır (Özçelik, 1998).

Hazırlanışı

Safranin (%95'lik etanolde %2.5'lik solüsyon)	10 ml
Distile su	100 ml

3.1.1.4. TE Çözeltisi

10 mM Trizma base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) ve 1 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate), pH 8.0 konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.1.5. 3X Gel Tampon Çözeltisi

3 M Tris-HCL, %0.3 SDS, pH 8.45 olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.1.6. Katot Çözeltisi

100 mM Tris, 100 mM Trisin, %0.1 SDS, pH 8.25 içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.1.1.7. Anot Çözeltisi

100 mM Tris-HCl, pH 8.9 olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.1.8. Akrilamid/Bisakrilamid Karışımı

%48 Akrilamid ve %1.5 bisakrilamid içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.1.1.9. 3X Örnek Parçalama Tamponu

%6 merkaptoetanol, %12 SDS, 150 mM Tris, ve %30 gliserol içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.1.1.10. Sabitleme (Fixing) Çözeltisi

%50 metanol, %10 asetik asit, ve 100 mM amonyum asetat içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.1.1.11. Boyama (Staining) Çözeltisi

%0.025 Coomasie blue R250 boyası %10 asetik asit içinde hazırlanmıştır.

3.1.1.12. Boya Uzaklaştırma (Destainin) Çözeltisi

% 10 asetik asit içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.1.1.13. Brain Hearth Infusion (BHI) Broth

İzolatların büyütülmesi ve bakteriyosin varlığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Gerekliğinde agar eklenerek (15g/litre) BHI agar elde edilmiştir.

BHI içeriği

Beyin kalp ekstraktları ve peptonlar	27.5 g
D(+) glukoz	2 g
Sodyum klorür	5 g
di-sodyum hidrojen fosfat	2.5 g
Toplam	37 g
Distile su	1000 ml

3.1.1.14. Columbia Kanlı Agar

İzolatların hemoliz özelliklerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

3.2. METOT

3.2.1. Gram Boyama

Gram boyama için, örnekten temiz bir lam üzerine steril öze ile 2-3 öze dolusu su konulmuş ve 24 saatlik bakteri kültüründen de öze ile alınarak su ile karıştırılarak lam üzerine yayılmıştır. Lam havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek fikse edilmiş ve kristal viyole ile 1 dk boyanmıştır. Bu süre sonunda boya dökülmüş ve lam üzerine lügol çözeltisi damlatılarak 1 dakika beklenmiş ve bu süre sonunda lügol çözeltisi dökülerek kurutma kağıdı ile kurulanmıştır. Lam %96'lık etil alkole daldırılıp çıkarılarak 10-15

saniye süreyle alkol ile yıkanmış daha sonra ise saf su ile yıkanarak kurutma kağıdı ile kurulanmıştır. Son olarak lam üzerine safranin damlatılarak 30 saniye süreyle boyanmış ve örnek saf su ile yıkanarak kurulandıktan sonra mikroskopta incelenmiştir (Özçelik, 1998). Mikroskopta gram (+) özellik gösteren örnekler belirlenmiştir.

3.2.2. Hemoliz Özelliğinin Belirlenmesi

İzolatların β -hemoliz gösterip göstermedikleri, %5 koyun kanı içeren Columbia Agar üzerine ekilmelerini takiben 37°C'de 24 saat inkübasyona maruz bırakılmaları sonunda bakteriler etrafında kan hücrelerinin parçalanması anlamına gelen saydam bölgelerin oluşup oluşmamasına göre belirlenmiştir. Saydam oluşumun bulunmaması negatif β -hemoliz fenotipik özelliği olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. Kromozomal DNA Ekstraksiyonu

E. faecium (n=2) ve *E. faecalis* (n=1) olarak tanımlanan izolatlara ait kromozomal DNA gece boyu 30°C'de büyütülen kültürlerden önceden belirtildiği şekilde elde edilmiştir (Bal ve ark., 2010). DNA örneklerinden 5 μ l PZR amplifikasyonları için kullanılmıştır.

3.2.4. Plasmid DNA Ekstraksiyonu

Laktik asit bakterileri için geliştirilmiş metoda göre yapılmıştır (Anderson ve McKay, 1983).

3.2.5. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

Farklı pH'lara sahip BHI broth içinde 30°C'de büyütülen kültürlerin optik yoğunluğu 12 saat boyunca 600 nm'de her saat kaydedilmiştir.

3.2.6. Well Difüzyon Testi

İzolatların bakteriyosin aktivitesine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla yapılmıştır (Schillinger ve Lucke, 1989). Gece boyu BHI içinde büyütülmüş test bakterilerinden 150 μ l alınarak BHI agarlı petrilere yayılmıştır. Agar aseptik koşullarda delinerek, hücre içermeyen süpernatant (CFS) ya da kısmen saflaştırılmış enterosin (PPE) boşluklara uygulanmıştır. Petrilere 37°C'de gece boyu inkübe edilmiştir.

3.2.7. Agar Spot Testi

İzolatların bakteriyosin aktivitesine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla yapılmıştır (Schillinger ve Lucke, 1989).

3.2.8. Bakteriyosin Titresinin Belirlenmesi

Seri dilüsyon ile hazırlanan CFS ya da PPE örnekleri, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 test organizması üzerinde well difüzyon testine tabii tutulmuştur. İnhibisyona sebep olan en yüksek dilüsyona göre AU/ml olarak titre belirlenmiştir.

3.2.9. CFS Ekstraktının *L. monocytogenes*'in Üremesi Üzerine Etkisi

L. monocytogenes ATCC 7644'nın üremesi üzerine CFS'nin etkisi BHI besiyerinde belirlenmiştir. Kontrol olarak CFS eklenmemiş *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 kültürleri kullanılırken, test grubunda üreyen kültürlerle farklı miktarlarda CFS eklenmiştir (Osmanagaoglu, 2007).

3.2.10. Enterosinin Kısmi Saflaştırılması

Enterosin iki farklı şekilde saflaştırılarak PPE elde edilmiştir. Bunlar amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz ile kloroform ekstraksiyonudur.

3.2.10.1. Amonyum Sülfat Çöktürme ve Diyaliz

%0.1 (v/v) gece boyu kültürle aşıl原因 600 ml BHI sıvı besiyeri, 30°C'de geç logaritmik faza kadar büyütülmüştür. Bakteri hücrelerinin 14000 rpm'de 15 dakika uzaklaştırılmasını takiben, elde edilen CFS proteinleri %40 amonyum sülfat konsantrasyonunu sağlayacak miktarda amonyum sülfat ile 8 saat boyunca 4°C'de çöktürülmüştür. Amonyum sülfat çöktürme işlemi sonrasında 9000 rpm'de 30 dakika santrifuj edilen pelet 10 ml 50 mmol sodium phosphate çözeltisi ve pH 8.0 içinde karıştırıldıktan sonra suya karşı diyaliz edilmiştir (Serva Visking® Dialysis Tubing, MWCO 12000-14000).

3.2.10.2. Kloroform Ekstraksiyonu

Yukarıda açıklandığı üzere elde edilen CFS'den, kloroform ekstraksiyonu ile kısmen saflaştırılmış bakteriyosin elde edilmiştir (Burianek ve Yousef, 2000).

3.2.11. Bakteriyosin Ekstraktlarında Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

CFS ve PPE ekstraktlarında bulunan protein konsantrasyonu Bioquant Bradford Reagent (Merck) kiti ile BSA (Sigma-Aldrich) standardı kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.12. Trisin-SDS Jelinin Hazırlanması

16% ayırma jeline sahip Trisin-SDS-PAGE jeli; 3X Gel Tampon Çözeltisi, Akrilamid/Bisakrilamid Karışımı, su, gliserol, TEMED ve APS karıştırılarak hazırlanmıştır (Schagger ve Von Jagov, 1987). Jele yükleme öncesi örneklere 3X örnek parçalama tamponu eklenmiştir.

3.2.13. Trisin-SDS Jeli Üzerinde Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi

Jel elektroforezi sonrası jelin boyanmamış yarısı üzerinde önceden belirtildiği şekilde yapılmıştır (Osmanagaoglu, 2007).

3.2.14. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerinde Enzim ve Isı Etkisinin Belirlenmesi

PPE, 1 mg/ml son konsantrasyonuna sahip proteinase K (Sigma), lizozim (Amersham), ve α -amilaz (Sigma) enzimleri ile 37°C'de 2 saat tutularak aktivite üzerindeki etki *L. monocytogenes* ATCC 7644'ye karşı well diffusion metodu ile belirlenmiştir. Kontrol örnekleri hiçbir enzim uygulamasına maruz bırakılmamışlardır.

Benzer şekilde PPE, farklı sıcaklıklarda (60, 80, 90, 95°C) değişen sürelerde 10 ila 30 dakika inkübasyona tabii tutularak bakteriyosin aktivitesi üzerindeki etki, kontrol grubu ile karşılaştırılarak, *L. monocytogenes* ATCC 7644'ye karşı well diffusion metodu ile bulunmuştur.

3.2.15. PZR Amplifikasyonları ile Enterosin Yapısal Genlerinin Belirlenmesi

Enterosin yapısal genlerinden *entA*, *entB*, *entP*, *entL50B* genlerine özgü primerlerin dizilimi önceki çalışmalardan elde edilmiştir (Çizelge 3.1.). Her bir PZR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, 5 µl tüm hücre DNA'sı, 0.2 mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP), 60 pmol primer, 5 µl 10X PZR tampon çözeltisi (500 mM KCl, 15mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0) ve 1 ünite Taq DNA Polymerase (Fermentas) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PZR koşulları original kaynağa göre değiştirilerek uygulanmıştır. Buna göre 94°C'de 3 dakikalık bir denatürasyon sonrası, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 56°C'de 40 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye sentez aşamalarından oluşan 30 döngü

uygulanmıştır. 30 döngünün tamamlanması sonrası reaksiyonlar 72°C’de 2 dakika daha bekletilmiştir. *entA* ve *entL50B* genlerine özgü primerlerin PZR amplifikasyonları sırasında kullanılan döngü profili aynı olmuştur. *entA*, *entB* ve *entP* genleri taşıyan pozitif PZR kontrol DNA’sı PZR amplifikasyonlarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Enterosin yapısal genlerinin tespit edilmesinde kullanılan primerler

Gen	Dizilim	Kaynak
<i>entA</i>	5'-GAGATTTATCTCCATAATCT-3'	Aymerich ve ark., 1996
	5'-GTACCACTCATAGTGGAA-3'	
<i>entB</i>	5'-GAAAATGATCACAGAATGCCTA-3'	Casaus ve ark., 1997
	5'-GTTGCATTTAGAGTATACATTTG-3'	
<i>entP</i>	5'-ATGAGAAAAAATTATTTAGTTT-3'	Cintas ve ark., 1997
	5'-TTAATGTCCCATACCTGCCAAACC-3'	
<i>entL50B</i>	5'-ATGGGAGCAATCGCAAATTA-3'	Cintas ve ark., 1998
	5'-TAGCCATTTTCAATTTGATC-3'	

3.2.16. PZR Ürünlerinin Elektroforez ile Ayrımı

Enterosin yapısal genlerinin amplifikasyonları sonrası elde edilen PZR ürünleri ml’inde 1 µg Etidyum Bromür bulunan %1 agaroz jel elektroforezinde ayrılmıştır. Elektroforez sonrası ayrılan PZR ürünleri jel görüntüleme sisteminde belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Silaj Kaynaklı *E. faecium* ve *E. faecalis* İzolatlarının Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılan izolatların bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan well difüzyon test sonucu Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesi için yapılan bir diğer test olan agar spot test sonuçları da well difüzyon testi sonuçlarına uygunluk göstermiştir (Şekil 4.1., 4.2., 4.3.). Buna göre, *E. faecium* U7 izolatı için kullanılan test bakterileri içinde sadece vankomisin dirençli *Enterococcus* spp. ve *L. monocytogenes*'e karşı bakteriyosin aktivitesi gözlenirken, *E. faecalis* N57 izolatı için sadece vankomisin dirençli *Enterococcus* spp.'ye karşı bakteriyosin aktivitesi saptanmıştır. *E. faecium* N56 izolatının ise kullanılan hiçbir test bakterisine karşı bakteriyosin aktivitesi olmadığı tespit edilmiştir.

Farklı kaynaklardan izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının sahip olduğu bakteriyosin aktivitesi üzerinde çok sayıda araştırma bulunmakla birlikte, silaj kaynaklı *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarına ait bakteriyosinler hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar farklı izolatların sahip olduğu enterosinlerin antibakteriyel aktivite spektrumlarında da farklılıklar bulunabileceğini göstermektedir. Bu tarz çalışmaların sonuçlarının bir kısmı aşağıda özetlenmiştir.

Cintas ve ark. (2000), *E. faecium* L50 suşunda Enterosin L50 (EntL50) isimli bir bakteriyosin tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın ardından yaptıkları bir başka çalışmada EntL50 bakteriyosinini kodlayan lokusun nükleotid diziliminin incelenmesi esnasında iki açık okuma çerçevesi (ORF) bularak, bunlar tarafından EntL50-benzeri iki polipeptidin (EntL50A ve EntL50B) kodlandığını göstermişlerdir (Cintas ve ark. 1997). Belirtilen çalışma sonuçları, EntL50A ve EntL50B'nin ayrı ayrı bulduklarında, *P. acidilactici*, *E. faecium*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ve *L. sake* bakterilerine karşı belirli düzeyde bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu, ancak bir arada bulduklarında sinerjistik bir etki ile her biri için saptanan düzeyin çok üzerinde bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir. Çalışmamızda kullanılan *E. faecium* U7 ve *E. faecalis* N57 suşlarının *Enterococcus* spp.'ye karşı bakteriyosin aktivitesi göstermesi belirtilen çalışmaya benzerlik göstermektedir.

Aymerich ve ark. (1996) fermente sosislerden izole ettikleri *E. faecium* CTC492 suşunun pediosin-benzeri Enterosin A isimli yeni bir bakteriyosine sahip olduğunu bularak, antimikrobiyal aktivitesini üç farklı pediosin-benzeri bakteriyosin (Sakasin A, Sakasin P ve Pediosin PA-1) ile karşılaştırmışlardır. Çalışılan tüm bakteriyosinlerin *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. plantarum* ve *L. sake* bakterilerine karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bulunurken, Enterosin A ve Pediosin PA-1'in bu bakterilere ilaveten *Pediococcus acidilactici* ve *P. pentosaceus* türlerine karşı da antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Belirtilen çalışmaya benzer şekilde, *E. faecium* U7 suşu *Enterococcus* spp. ile birlikte *L. monocytogenes* ATCC 7644'ye karşı bakteriyosin aktivitesi göstermiştir.

Cintas ve ark. (1997) fermente sosislerden izole ettikleri *E. faecium* P13 suşunun gram pozitif gıda kaynaklı patojen bakterilerden *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* ve *C. botulinum* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip enterosin P isimli yeni bir enterosine sahip olduğunu bulmuşlardır.

Cocolin ve ark. (2007) keçi sütünden izole ettikleri M241 ve M249 isimli *E. faecium* izolatlarının antibakteriyel bileşikleri ürettiğini saptarken, izolatların sahip olduğu bakteriyosinlerin *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium butyricum*'a karşı aktif olduğunu buna karşılık diğer LAB türlerine karşı inaktif olduğunu gözlemlemişlerdir.

Sparo ve ark. (2006) mısır silajından izole ettikleri *Enterococcus faecalis* MR99 izolatının diğer enterococlar, *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* ve *Shigella flexneri* test organizmalarına karşı bakteriyosin aktivitesine sahip olduğunu bulmuşlardır.

Ohmomo ve ark. (2000) silaj ve fermente sebzelerden elde ettikleri 690 adet LAB'ın sahip olduğu bakteriyosin-benzeri aktiviteyi araştırmışlardır. Sonuç olarak, *Enterococcus faecium* NIAI 157 izolatından saflaştırılan enterosin ON-157'nin diğer enterococci, *Lactobacillus sake* ve *L. monocytogenes* türleri üzerinde bakteriyosin-benzeri aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Belirtilen çalışmada kullanılan izolatların hiçbirinin *E. coli* test bakterisine karşı bakteriyosin aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde *E. coli*'ye karşı 3 izolatın da bakteriyosin aktivitesine sahip olmadığı bulunmuştur.

Losteinkit ve ark. (2001), pirinç kavuzlarından izole edilen *E. faecium* N15 bakteriyosininin *L. monocytogenes* ve *Bacillus circulans* dahil çok sayıda test organizması üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğunu bulmuştur.

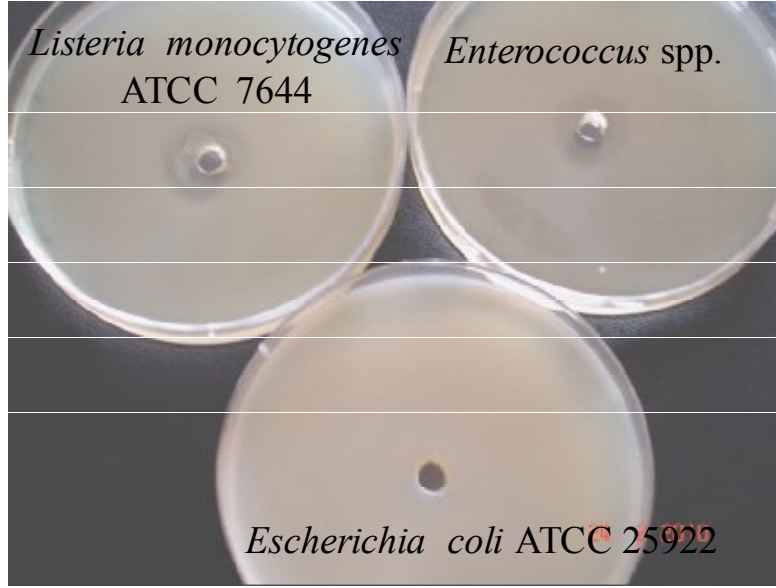
De Vuyst ve ark. (2003) coğrafik olarak oldukça geniş bir bölgeden ve farklı kaynaklardan (yem, gıda, hayvan, insan izolatları) elde ettikleri 122 adet *Enterococcus* suşunun antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışma sonuçları, suşlardan *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerine ait olan 72 suşun bakteriosinogenik aktiviteye sahip olduğunu, ancak suşların kaynağı ve antibakteriyel spektrumları arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığını göstermiştir.

Marekova ve ark. (2007), foseptik kaynaklı çevresel bir izolat olan *E. faecium* AL4'in moleküler ağırlığı enterosin P'ye yakın olan enterosin M adlı yeni bir enterosin içerdiğini, ancak enterosin M'nin amino ucundaki ilk 39 amino asidin 20. ve 35. pozisyonundaki amino asitlerin enterosin P'ye göre farklılık gösterdiğini bulmuşlardır. *E. faecium* AL4'in farklı cins ve türleri kapsayan oldukça geniş bir test bakterisi grubuna karşı değişen oranda antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Örneğin *S. aureus* dahil çok sayıda farklı *Staphylococcus* türüne karşı antimikrobiyal etki gözlenmiştir. Belirtilen çalışmadan farklı olarak, çalışmamızda *E. faecium* U7'nin *S. aureus* bakterisine karşı antimikrobiyel etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir.

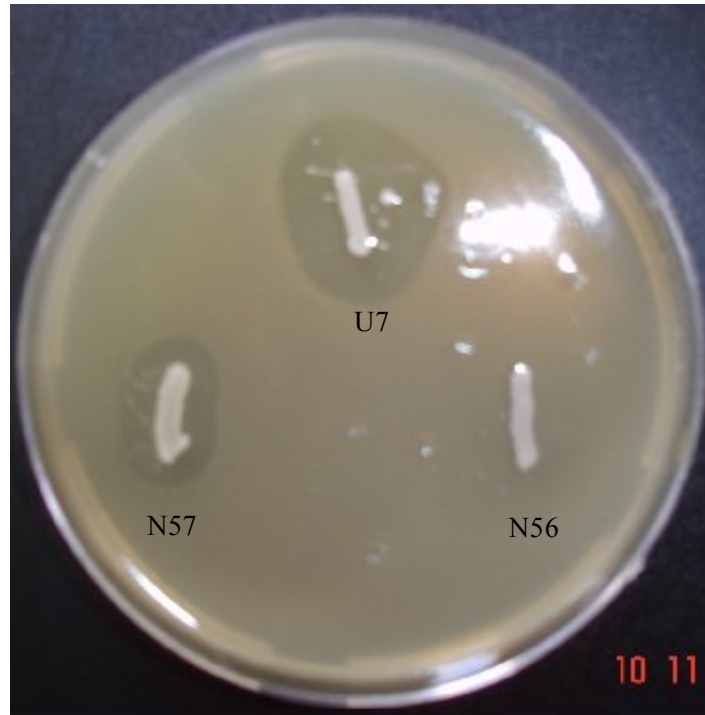
Çizelge 4.1. *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının bakteriyosin aktivitelerinin test bakterileri üzerinde agar spot testi ile belirlenmesi

Test Bakterisi	<i>E. faecium</i> U7	<i>E. faecium</i> N56	<i>E. faecalis</i> N57
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-
<i>Shigella boydi</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Acitenobacter baumannii</i>	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	-
<i>Klebsiella</i> spp.	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	+++	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	+++	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 3	-	-	-

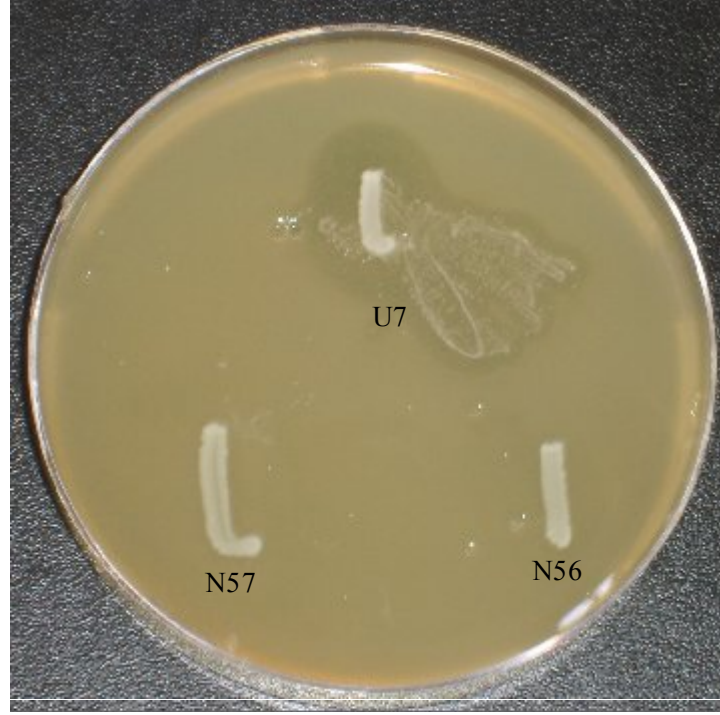
-: hiçbir inhibisyon zonunun tespit edilmemesini; +: 5 mm'den büyük 10 mm'den küçük inhibisyon zonunu; +++: 15 mm'den büyük inhibisyon zonunu belirtmektedir.



Şekil 4.1. *E. faecium* U7 izolatının bakteriyosin aktivitesinin well difüzyon testi ile belirlenmesi



Şekil 4.2. *E. faecium* U7, N56 ve *E. faecalis* N57 izolatlarının *Enterococcus* spp. üzerindeki bakteriyosin aktivitesinin agar spot testi ile belirlenmesi



Şekil 4.3. *E. faecium* U7, N56 ve *E. faecalis* N57 izolatlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644 üzerindeki bakteriyosin aktivitesinin agar spot testi ile belirlenmesi

4.2. İzolatların Hemoliz Özelliğinin Belirlenmesi

E. faecium U7, *E. faecium* N56 ve *E. faecalis* N57 izolatlarının tümünün fenotipik olarak β -hemoliz özelliğe sahip olmadıkları kanlı besi yeri üzerinde tam parçalanma olmaması ile belirlenmiştir (Şekil 4.4.). Bunun aksine, β -hemoliz özelliğe sahip *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatları gıda ve gıda-kaynaklı olmayan örneklerden tespit edilmiştir (De Vuyst ve ark. 2003). Bununla birlikte, β -hemoliz özelliğe sahip olmayan çoğu izolatın β -hemoliz ile ilgili bazı genleri (*cylM*, *cylB*, *cylA*) taşıyabileceği gösterilmiştir (Klibi ve ark. 2008, Togay ve ark., 2010). Bu nedenle, çalışmamızda kullanılan izolatlarda benzer bir durumun olup olmadığının araştırılması yarar sağlayacaktır.



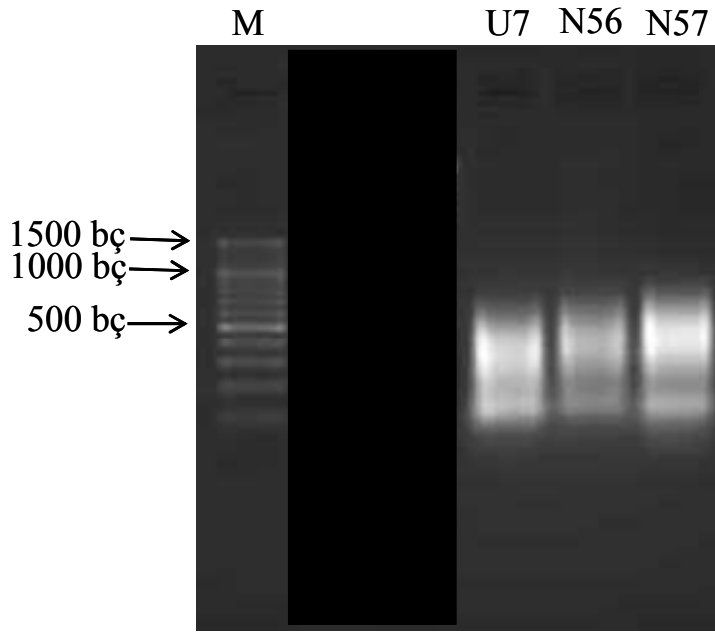
Şekil 4.4. *E. faecium* U7, N56 ve *E. faecalis* N57 izolatlarının hemoliz özelliğinin belirlenmesi

4.3. İzolatların Plazmid İçeriğinin Belirlenmesi

Önceki çalışma sonuçları, LAB plazmidlerinin pek çok önemli özellik ile ilgili genlere sahip olduğunu göstermektedir. Bunlar arasında bakteriyosin üretiminden sorumlu birçok gen de bulunmaktadır (Abriouel ve ark. 2006). Bu nedenle, LAB bakterilerinin plazmid içeriğinin bilinmesi önem taşımaktadır.

Yapılan çalışmalarda farklı kaynaklardan izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının plazmid içeriklerinde farklılık olduğu saptanmıştır. Abriouel ve ark. (2006), gıda kaynaklı bakteriyosin üreticisi *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının büyüklükleri 2-53 kilobaz arasında değişen plazmid içeriklerine sahip olduğunu ve bakteriyosin üretiminde farklılık gösteren suşların farklı plazmid içeriğine sahip olduğunu göstermiştir. Belirtilen çalışmadan farklı olarak, çalışmamızda bakteriyosin üretimi yönünden farklılık gösteren üç suşun (*E. faecium* U7, *E. faecium* N56, *E. faecalis* N57) benzer plazmid içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. İzolatların plazmid içerikleri Şekil 4.5.'de gösterilmektedir. Tüm

izolatların büyüğü 0.5 ve küçüğü 0.12 kilobaz olan iki plazmide sahip olduğu bulunmuştur. Tespit edilen plazmid büyüklükleri, Abriouel ve ark. (2006) tarafından elde edilen plazmid büyüklükleri ile karşılaştırıldığında oldukça küçük olmuştur. Benzer şekilde mısır silajı izolatu *E. faecalis* MR99'un iki plazmide sahip olduğu bulunmuş, ancak saptanan plazmid büyüklüklerinin çalışma sonuçlarımızdan farklılık gösterdiği bulunmuştur. Plazmid içeriği ile ilgili olarak yapılan diğer bir çalışma, izolatlar arasında farklı sayı ve büyüklükte plazmidler bulunabileceğini göstermektedir (Togay ve ark. 2010).



Şekil 4.5. *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının plazmid içerikleri. M, 100 bç marker; U7: *E. faecium* U7; N56: *E. faecium* N56, N357: *E. faecalis* N57.

4.4. İzolatlarda Enterosin Yapısal Genlerinin Belirlenmesi

Farklı enterosinleri kodlayan yapısal genlerin farklı kaynaklardan izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında bulunma sıklığının incelenmesi ile ilgili olarak çok sayıda çalışma yapılmıştır (Poeta ve ark. 2007, Klibi ve ark. 2008, Stropfova ve ark. 2008). Bu çalışmalardan elde edilen ortak sonuç, yapısal genlerin bakteriyosin üreticisi *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları arasında sıklıkla tespit edildiği ve yapısal genlerin birden fazlasının bulunduğu kombinasyonların izolatlar arasında görüldüğü şeklindedir. Örneğin, Poeta ve

ark. (2007) yabani hayvan dışkılarından izole ettikleri 140 adet enterococci'nin 25 tanesinde *L. monocytogenes*'e karşı antibakteriyal etki tespit ederken, bunlardan 17 tanesinde çalışılan enterosin yapısal genlerinden (*entA*, *entB*, *entP*, *entQ*, *cyiL*, *entAS-48*, *bac31* ve *entL50A/B*) en az birinin bulunduğunu göstermişlerdir.

Klibi ve ark. (2008), bakteriyosin üreticisi 7 adet *E. faecium* klinik izolatının *entA*, *entB*, *entP* ve *entL50A/B* genlerinin farklı kombinasyonlarının varlığını göstermişlerdir.

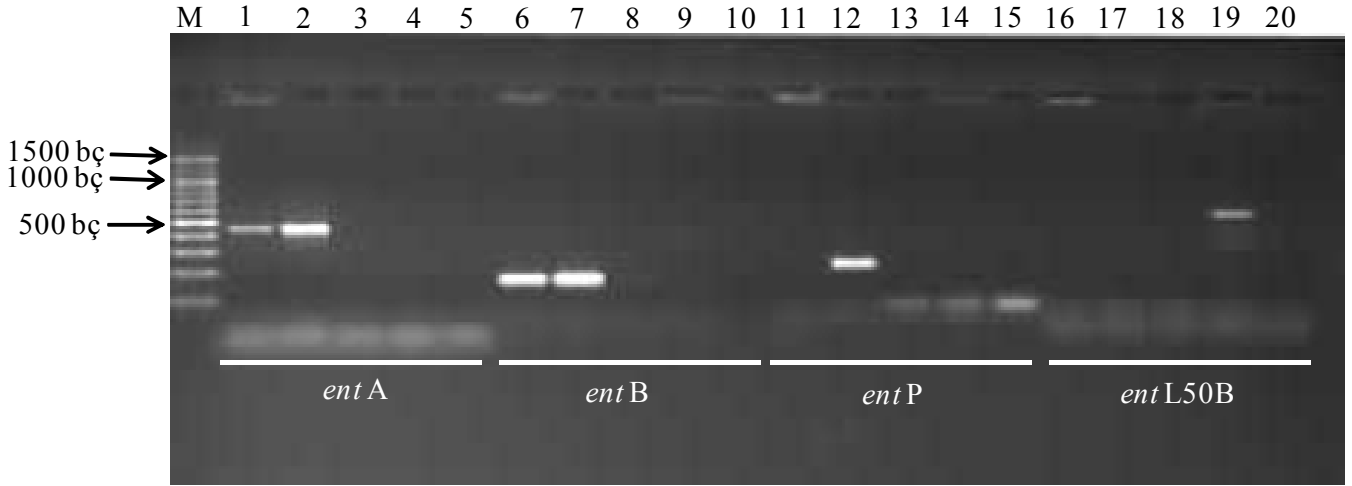
Strompfova ve ark. (2008), içerisinde silaj kaynaklı olanların da bulunduğu farklı kaynaklardan izole ettikleri *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında *entA*, *entB*, *entP* ve *entL50B* genlerinin varlığını inceledikleri çalışmada, 20 adet silaj kaynaklı izolatın 18 tanesinde en az bir gen bulunduğunu göstermişlerdir.

Renye ve ark. (2009), peynir örneklerinden izole ettikleri *E. faecium* ve *E. durans* suşlarında *Listeria*'ya karşı etkin bakteriyosine sahip olanlar arasında farklı enterosin yapısal genlerinin varlığını tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan *E. faecium* U7, *E. faecium* N56 ve *E. faecalis* N57 suşlarında *entA*, *entB*, *entP* ve *entL50B* yapısal genlerinin varlığı PZR ile incelenmiştir. PZR amplifikasyonlarının sonucu Şekil 4.6.'da verilmiştir. Buna göre, bakteriyosin aktivitesine sahip 2 suştan sadece birinde (*E. faecium* U7) *entA*, *entB* ve *entP* genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Enterosin yapısal genlerinin bakteriyosin aktivitesine sahip suşlarda sıkça tespit edilmesi, belirtilen çalışmalara uygunluk göstermektedir. Bununla birlikte, Strompfova ve ark. (2008) tarafından silaj izolatlarında görülen yapısal genlerin kombinasyonu ile *E. faecium* U7 için tespit edilen kombinasyon arasında farklılık saptanmıştır. Bu sonuç, farklı silaj habitatlarında bulunan *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının farklı özelliklere sahip olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Şekil 4.6.'da *entP* genini taşıyan pozitif kontrolde amplifikasyon sonrası bir bant gözlenmemiştir. Bu durum, örnekteki primer bağlanma bölgesinin taşıyabileceği bir mutasyon olasılığı ile açıklanmıştır. Ayrıca *entL50B* genine özgü primer ile *E. faecium* N57 DNA'sından elde edilen bant spesifik-olmayan bir ürün olarak nitelendirilmiş ve örnek bu gen yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu durum iki şekilde açıklanabilir. Birincisi, meydana gelen ürünün uzunluğu, primerlerin meydana getirmesi beklenen uzunlukla uyuşmamasından; ikincisi, bant elde edilen PZR koşullarındaki bağlanma sıcaklığının primerlerin ortalama erime sıcaklığından daha düşük olmasındandır.

Yapısal genler ile ilgili bir diğer bulgu, *entA* ve *entB* geninin en sık rastlanan genler olduğu ve genellikle birlikte tespit edildiği şeklindedir (Poeta ve ark. 2007). *E. faecium* U7 izolatında belirtilen genlerin bir arada bulunması bu sonuca benzerlik göstermektedir.

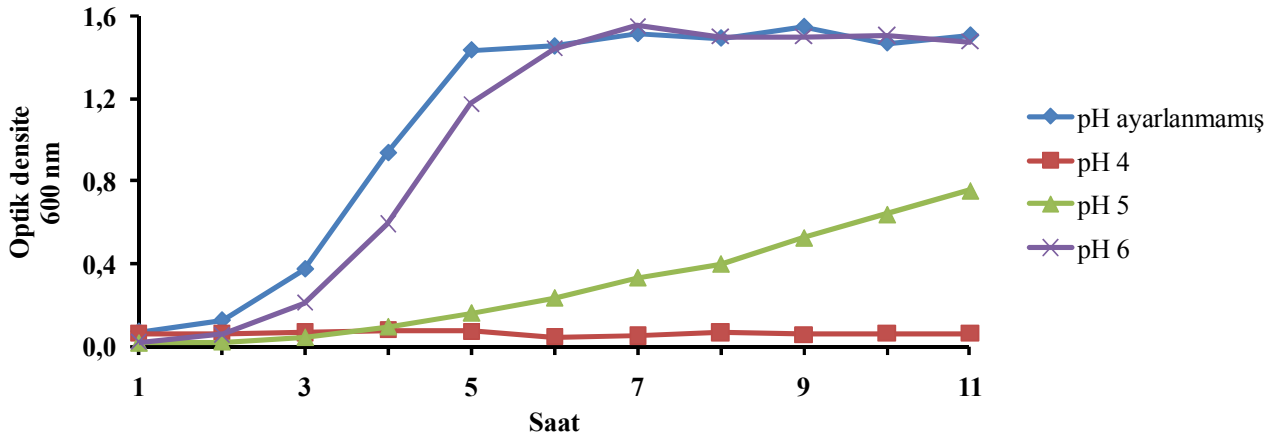


Şekil 4.6. *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarına ait hücresel DNA örnekleri üzerinde yapısal genlerin amplifikasyonu. Şekilde belirtilen örnek şu şekildedir. M, 100 bp marker; 1, entA için pozitif kontrol; 2, *E. faecium* U7; 3, *E. faecium* N56; 4, *E. faecium* N57; 5, entA için negatif PZR kontrolü (DNA içermeyen); 6, entB için pozitif kontrol; 7, *E. faecium* U7; 8, *E. faecium* N56; 9, *E. faecium* N57; 10, entB için negatif PZR kontrolü (DNA içermeyen); 11, entP için pozitif kontrol; 12, *E. faecium* U7; 13, *E. faecium* N56; 14, *E. faecium* N57; 15, entP için negatif kontrol; 16, entL50B için negatif kontrol (gene sahip olmayan örnek); 17, *E. faecium* U7; 18, *E. faecium* N56; 19, *E. faecium* N57; 20, entL50B için negatif PZR kontrolü (DNA içermeyen). Çizgiler her bir spesifik primer ile amplifikasyona tabii tutulan örnek grubunu belirtmektedir.

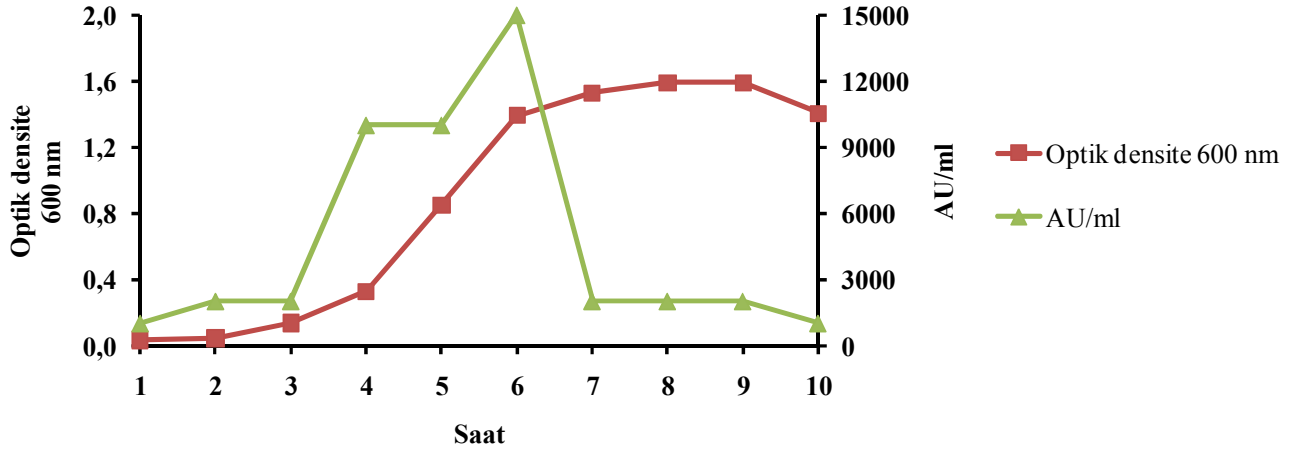
4.5. *E. faecium* U7 İzolatının Büyüme Eğrisi ve Bakteriyosin Üretiminin Belirlemesi

Bakteriyosin üreticisi *E. faecium* U7 suşunda yapısal genlerin de tespit edilmiş olması nedeniyle bu suşun büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretimi incelenmiştir. Şekil 4.7.'de farklı besi yeri pH'larında üreyen bakterinin büyüme eğrisi gösterilmektedir. Buna göre, besi yeri pH'sı sabit olarak 4 ve 5 olduğunda büyüme olumsuz şekilde etkilenirken,

besi yeri pH'sının sabit olarak 6 ve ayarlanmamış olması durumunda bakteri büyümesinin optimal düzeyde kaldığı görülmektedir. Bu nedenle, bakterinin optimal büyümesinin sağlandığı koşullarda bakteriyosin üretimi incelenmiştir (Şekil 4.8.). Bakteriyosin üretimi, büyümenin tüm zamanlarında belirli bir düzeyde gerçekleşse de, en fazla bakteriyosin üretimi logaritmik fazın sonlarında (6. saat) görülmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuç bakteriyosin üretiminin logaritmik fazda başladığı ve bu fazın sonunda maksimum düzeye eriştiği mısır silajı izolatu *E. faecalis* MR99'dan elde edilen sonuca uygunluk göstermektedir (Sparo ve ark. 2006).



Şekil 4.7. *E. faecium* U7 suşunun farklı besiyeri pH koşullarında büyüme eğrileri

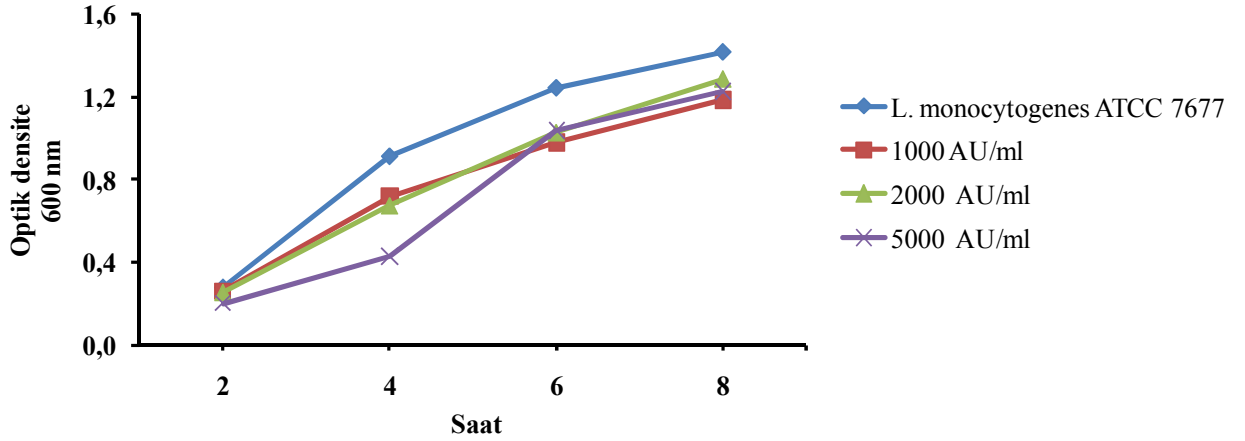


Şekil 4.8. *E. faecium* U7 suşunun bakteriyosin üretimi

4.6. *E. faecium* U7 İzolatından Elde Edilen CFS Örneğinin *L. monocytogenes* ATCC 7644'ün Büyümesine Etkisi

Bakteriosinlerin etkili olduğu bir organizma kültürüne belirli konsantrasyonlarda eklenmesinin ardından, hedef bakterinin büyüme ya da canlılığı üzerindeki etki bakteriyosin eklenmemiş hedef hücre kültürü ile karşılaştırılarak belirli zaman aralıklarında incelenebilmektedir. Bu tarz yapılan çok sayıdaki araştırmaya örnek olarak, lökisin OZ'nin *L. plantarum*'un canlılığı üzerindeki etkinin belirlenmesi verilebilir (Osmanagaoglu, 2007). Belirtilen çalışmada artan lökisin konsantrasyonuna bağlı olarak hedef hücrede canlılık kaybı meydana gelmiştir. Çalışmamızda *L. monocytogenes* ATCC 7644 hedef organizmasının büyümesine olan etki 3 farklı CFS konsantrasyonu (1000, 2000, 5000AU) ilavesinden sonra 6 saat boyunca optik densite değerleri ile takip edilmiştir. Sonuçlar, bakteriyosin ilavesinin hedef hücre kültürünün büyümesinde 4., 6. ve 8.saatlerde azalma meydana getirdiğini göstermekle beraber, en fazla azalmanın 4. saatte olduğunu göstermiştir. Buna ilaveten 4. saatte bakteri büyümesinin engellenmesinin eklenen bakteriyosin konsantrasyonuna bağlı olarak en fazla düzeyde 5000AU'da gerçekleştiği bulunurken, diğer iki konsantrasyonda farklılık saptanmamıştır. 4. ve 8. saatlerde bakteri büyümesinin engellendiği görülürken, bu zamanlarda konsantrasyona bağımlı bir inhibisyon gözlenmemiştir.

Izquierdo ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada bir ot izolatu olan *E. faecium* IT62 suşundan elde edilen üç farklı enterosinin (L50A, L50B ve IT) saflaştırılmasını takiben *L. lactis* kültürlerine eklenmesi sonrasında, çalışmamız sonuçlarına benzer şekilde kısa süreli ancak etkin bir optik densite azalışı görülmüştür.



Şekil 4.9. *E. faecium* U7 suşuna ait CFS'nin *L. monocytogenes* ATCC 7644'nin büyümesi üzerine etkisi

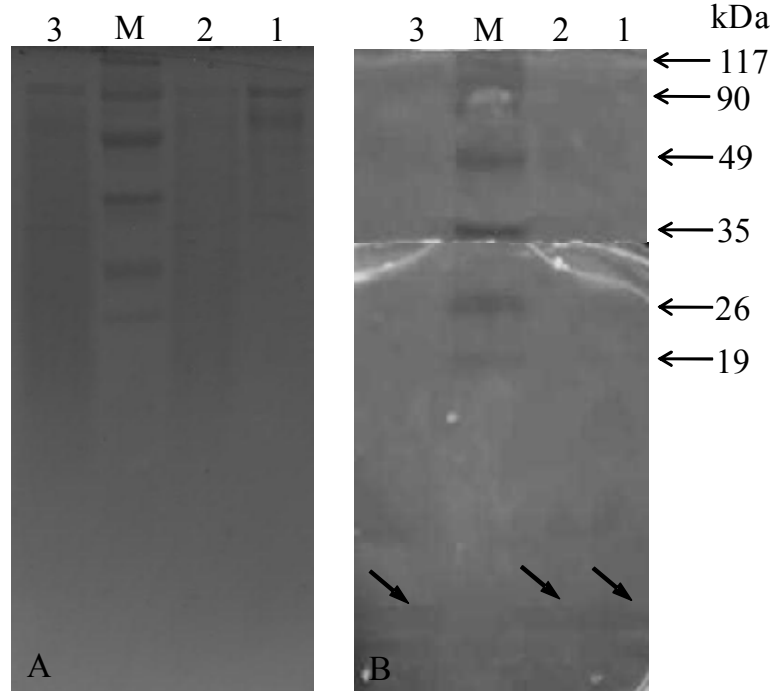
Lee ve Kim (2010) tarafından yapılan bir çalışmada fermente balıktan izole edilen *Enterococcus faecium* DB1 suşundan elde edilen anti-listeriyal bir bakteriyosinin, *L. monocytogenes* kültürlerine 3. saat sonunda eklendiğinde, optik densite azalışının 10 saat boyunca devam ettiği ve bu azalışın aynı şekilde kaldığı görülmüştür. Belirtilen çalışmadan farklı olarak, çalışmamızda bakteri büyümesinin engellenmesi daha az oranda ve daha kısa sürede gerçekleşmiştir. Bu farklılığın çalışılan bakteriyosinlerin inhibisyon etkilerindeki ya da konsantrasyonlarındaki farklılıktan meydana gelebileceği gibi deneysel koşullardaki farklılıktan da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.7. *E. faecium* U7 İzolatına Ait Kısmen Saflaştırılmış Enterocinin Trisin-SDS PAGE

Analizi

Kısmen ya da tamamen saflaştırılmış bakteriyosinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde elektroforetik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır (Losteinkit ve ark. 2001). Bununla birlikte kütle-spektrofotometri de molekül ağırlık tayininde

kullanılmaktadır (Hu ve ark., 2010). Çalışmamızda PPE örneklerinin Trisin-SDS PAGE analizi sonrasında Coomasie ile boyanmasında molekül büyüklükleri 90 ila 35 kDa olan bantlar görülmüştür (Şekil 4.10A.). Ancak bunların hiçbirinin bakteriyosin aktivitesi taşımadığı görülmüştür.



Şekil 4.10. *E. faecium* U7 suşundan elde edilen PPE örneklerinin Trisin-SDS PAGE ile analizi. A. Trisin-SDS PAGE sonrasında Coomasie blue ile boyanma; B. Trisin-SDS PAGE sonrasında bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesi. 1, U7 örneğinden amonyum sülfat çöktürme ve takiben diyaliz sonrası elde edilen ekstrakt; 2, U7 örneğinden kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrakt; 3, U7 örneğinden amonyum sülfat çöktürme sonrası elde edilen ekstrakt.

4.8. Jel Üzerinde Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi

Şekil 4.10.B’de, Şekil 4.10.A’da boyanan jel ile aynı içeriğe sahip jelin diğer yarısı üzerinde yapılan bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesi ile ilgili sonuç verilmiştir. Sonuç *L. monocytogenes* ATCC 7644 üzerinde bakteriyosin aktivitesine sahip jel bölgesinin, boyanan bantların bulunduğu bölgeden farklı olarak 4 kDa civarında olduğunu göstermektedir. Bulunan sonuç bakteriyosinlerin genellikle SDS-PAGE analizi ile

belirlenen küçük moleküler ağırlıklarına uygunluk göstermektedir. Örneğin, bir mısır silajı izolatu olan *E. faecalis*'den saflaştırılan enterosin MR99'un Trisin-SDS PAGE analizi sonrasında yapılan aktivite belirlenmesi sonucunda bakteriyosin aktivitesine sahip bandın moleküler ağırlığının yaklaşık 5 kDa olduğu bulunmuştur (Sparo ve ark. 2006). Belirtilen çalışma sonuçlarının, mevcut sonuçlar ile bir diğer benzerliği ise aktivite belirlenen bölgenin boyanmamış olmasıdır. Diğer çalışmalarda da, Laktasin B ve laktasin F bakteriyosinlerinin de SDS-PAGE analizi sonrasında Coomassie Blue veya gümüş boyanma ile boyanmadığı bildirilmiştir (Barefoot ve Klaenhammer 1984, Muriana ve Klaenhammer 1991).

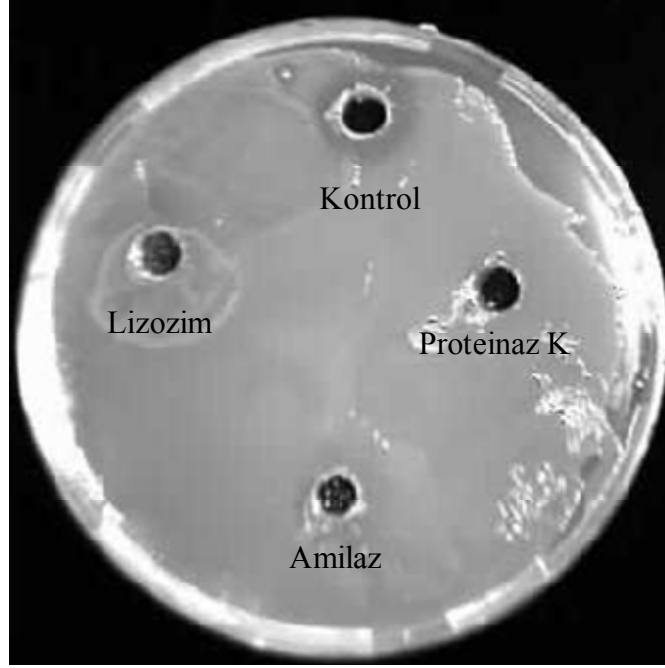
4.9. Farklı Enzimlerin ve Sıcaklık Uygulamalarının *E. faecium* U7 İzolatından Elde Edilen PPE Üzerine Etkisi

E. faecium U7 izolatından elde edilen PPE üzerinde farklı enzimlerin ve sıcaklıkların etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.'de özetlenmiştir. PPE ekstratının proteinaz K ile muamelesi sonrasında aktivitesini kaybetmesi, PPE'nin protein yapısında olduğunu göstermektedir (Şekil 4.11). Benzer şekilde protein hidrolizi yapan enzimlerin bakteriyosin aktivitesini ortada kaldırdığı ve dolayısıyla protein yapısında oldukları gösterilmiştir (Sparo ve ark., 2006, Osmanagaoglu, 2007).

Çizelge 4.2. Farklı enzim ve sıcaklık uygulamalarının PPE üzerindeki etkisi

Enzimler	Aktivite*
Kontrol	+
Proteinaz K	-
Lizozim	-
α -Amilaz	-
Sıcaklık	
Kontrol	+
60 °C, 10 dakika	+
60 °C, 30 dakika	+
80 °C, 10 dakika	+
80 °C, 30 dakika	+
90 °C, 10 dakika	+
90 °C, 30 dakika	+
95°C, 10 dakika	+
95°C, 30 dakika	+

*+: aktivitenin varlığı; -: yokluğu şeklinde belirtilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı enzimlerin PPE üzerindeki etkisi

Buna ilaveten, *E. faecium* U7 izolatından elde edilen PPE, lizozim ve amilaz'a karşı da hassas olarak bulunmuştur (Şekil 4.11). Çalışma sonuçlarına uygun şekilde amilaz'a karşı hassas enterosinler çeşitli araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Ohmomo ve ark. 2000; Losteinkit ve ark. 2001; Lee ve Kim, 2010). Bu sonuç enterosinin glikoprotein yapısında olduğunu belirtmektedir.

PPE örneğinin farklı sıcaklıklara maruz bırakıldıktan sonra aktivitesinin belirlenmesi sonucunda bakteriyosin aktivitesinin çalışılan sıcaklık ve sürelerdeki muamelelerinden etkilenmediğini göstermektedir (Çizelge 4.2).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada silaj kaynaklı 3 adet *Enterococcus* izolatının (*E. faecium* U7, *E. faecium* N56 ve *E. faecalis* N57) bakteriyosin aktivitesi incelenmiştir. Sonuçlar izolatların iki tanesinde (*E. faecium* U7 ve *E. faecalis* N57) bakteriyosin aktivitesinin bulunduğunu gösterirken, bu aktivitenin sadece *E. faecium* U7 izolatında *L. monocytogenes*'e karşı antibakteriyal etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Yaygın olarak bulunan enterosin yapısal genlerinin (*entA*, *entB*, *entP* ve *entL50B*) izolatlardaki varlığı araştırılmış, izolatların sadece birinde (*E. faecium* U7) enterosin yapısal genlerinden *entA*, *entB*, *entP* genlerinin bulunduğu görülürken, diğer iki izolatda hiçbir enterosin yapısal geni tespit edilememiştir.

Çalışma sonuçları, *E. faecium* U7 izolatı için fenotipik olarak belirlenen bakteriyosin aktivitesinin tespiti ile yaygın enterosin genlerinin bulunması arasında bir ilişki bulunduğunu göstermiştir. Diğer izolatlar için bu şekilde bir ilişki gözlenmemiştir.

İzolatların plazmid içeriklerinin incelenmesi sonucunda, benzer plazmid içeriğine sahip oldukları bulunmuştur. Tüm izolatların hemoliz özelliği incelendiğinde, hiçbirinin β -hemoliz özelliği sahip olmadığı bulunmuştur.

E. faecium U7 izolatının büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretimi incelendiğinde, en fazla bakteriyosin üretiminin logaritmik fazın sonlarında meydana geldiği bulunmuştur. Bu izolattan elde edilen CFS örneklerinin *L. monocytogenes* ATCC 7644'in büyümesi üzerine etkisi incelendiğinde, CFS eklenen kültürlerdeki büyümenin en fazla 4. ve 6. saatlerde engellendiği bulunmuştur.

E. faecium U7 izolatından elde edilen PPE örneğinin Trisin-SDS-PAGE analizi sonrasında birden fazla protein bandına sahip olduğu görülürken, bunlardan hiçbirinin bakteriyosin aktivitesine sahip olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte, boyanma sonrası bant görünmeyen bir bölgede (yaklaşık 4 kDa) bakteriyosin aktivitesi tespit edilmiştir.

Çalışma sonuçlarının tümü ele alındığında *E. faecium* U7 izolatının birden fazla enterosin varlığına sahip olduğu bulunmuştur. Buna ilaveten, bu izolatın *L. monocytogenes* üzerindeki özgün antibakteriyal etkisinin bulunması ve β -hemoliz özelliği sahip olmaması farklı yem bitkilerinden yapılacak silajlarda uygulama imkanı doğuracaktır. Bununla birlikte, bu izolatın gıda amaçlı veya hayvan sağlığı alanında kullanımı olasılıkları da söz konusu olduğunda sahip olabileceği diğer virulans faktörlerinin de detaylı olarak incelenmesi yarar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- ABRIOUEL, H., BEN OMAR, N., LUCAS, R., MARTINEZ-CANAMERO, M., GALVEZ, A., 2006. Bacteriocin production, plasmid content and plasmid location of enterocin P structural gene in enterococci isolated from food sources. *Let. Appl. Microbiol.*, 42: 331-337.
- ANDERSON, D.G., MCKAY, L.L., 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 549-552.
- ARCHIMBAUD, C., SHANKAR, N., FORESTIER, C., BAGHDAYAN, A., GILMORE, M.S., CHARBONNE, F., JOLY, B., 2002. In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res. Microbiol.* 153: 75-80.
- AYMERICH, T., HOLO, H., HAVARSTEIN, L.S., HUGAS, M., GARRIGA, M., NES, I.F., 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1676-1683.
- BAL, E.B.B., BAYAR, S., BAL, M.A., 2010. Antimicrobial susceptibilities of coagulase-negative Staphylococci (CNS) and Streptococci from bovine subclinical mastitis cases. *J. Microbiol.*, 48: 267-274.
- BAREFOOT, S., KLAENHAMMER, T.R., 1984. Purification and characterization of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26: 328-334.
- BHUNIA, A.K., JOHNSON, M.C., RAY, B., 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.*, 2:319-322.
- BRAUN, V., PILSL, H., GROSS, P., 1994. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Arch. Microbiol.*, 161:199-206.
- BURIANEK, L.L., YOUSEF, A.E., 2000. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31: 193-197.

- CASAUS, P., NILSEN, T., CINTAS, L.M., NES, I.F., HERNANDEZ, P.E., HOLO, H., 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiol.*, 143: 2287-2294.
- CINTAS L.M., CASAUS, P.L., HAVARSTEIN, S., HERNANDEZ, P.E., NES, I.F., 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4321-4330.
- CINTAS, L.M., CASAUS, P., HOLO, H., HERNANDEZ, P.E., NES, I.F., HAVARSTEIN, L.S., 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, 180: 1988-1994.
- CINTAS, L.M., CASAUS, P., HERRANZ, C., HAVARSTEIN, L.S., HOLO, H., HERNANDEZ, P.E., NES, I.F., 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, 182: 6806-6814.
- CINTAS, L.M., CASAUS, M.P., HERRANZ, C., NES, I.F., P.E. HERNANDEZ. 2001. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.* 7: 281-305.
- CHEN, H., HOOVER, D.G., 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2:82-100.
- CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F., CHIKINDAS, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International J. Food Microbiol.*, 71:1-20.
- COCOLIN, L., FOSCHINO, R., COMI, G., FORTINA M.G., 2007. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiol.* 24:752-758.
- COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R.P.. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3:777-788.

- DE VUYST, L. VANDAMME E.J., 1994. Bacteriosins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, genetics and applications. London, Blakie Academic and Profesional, 1994.
- DE VUYST, L., FOULQUIE MORENO, M.R. REVETS, H., 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 299-318.
- DE VUYST, L., LEROY, F., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13:194-199.
- DEVRIESE, L.A., POT, B., COLLINS, M.D., 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 399-408.
- DEVRIESE, L.A., POT, B., 1995. The genus *Enterococcus*. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (Eds.), *The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2. Blackie Academic & Professional, London, UK, pp. 327-367.
- DIEP, D.B., NES, I.F., 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. *Curr. Drug Tar.*, 3: 107-122
- DRIDER, D., FIMLAND, G., HECHARD, Y., MCMULLEN, L.M., PREVOST, H., 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564-582.
- EATON, T.J. GASSON, M.J., 2001. Molecular screening of and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:1628-1635.
- ENNAHAR, S., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A., 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.*, 87:705-716.
- ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A., 2000. ClassIIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:85-106.
- FIMLAND, G., BLINGSMO, O.R., SLETTEN, K., JUNG, G., NES, I.F., NISSENMEYER, J., 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by

- combining regions from various pediocinlike bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:3313-3318.
- FRANZ, C.M.A.P., STILES, M.E., SCHLEIFER, K.H., HOLZAPFEL W.H.. 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 88:105-122.
- GIRAFFA, G., CARMINATI D., NEVIANI, E., 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.*, 60: 732-738.
- GIRAFFA, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26:163-171.
- GONZALEZ, C.F., KUNKA, B.S., 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2534-2538.
- GOUAUX, E., HOBAUGH, M., SONG, L., 1997. α -Hemolysin, γ -hemolysin, and leukocidin from *Staphylococcus aureus*: Distant in sequence but similar in structure. *Protein Sci.* 6:2631-2635.
- GUDER A., WIEDEMANN I., SAHL H.G., 2000. Posttranslationally modified bacteriocins--the lantibiotics. *Biopoly.*, 55:62-73.
- GUTIERREZ, J., CRIADO, R., MARTIN, M., HERRANZ, C., CINTAS, L.M., HERNANDEZ, P.E., 2005. Production of Enterocin P, an Antilisterial Pediocin-Like Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agent. Chemo.*, 49:3004-3008.
- HAMMAMI, R., ZOUHIR, A., BEN HAMIDA, J., FLISS, I., 2007. BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiol.*, 7:89.
- HASTINGS, J.W., SAILER, M., JOHNSON, K., ROY, K.L., VEDERAS, J.C., STILES M.E., 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.*, 173:7491-7500.
- HU, C., MALAPHAN, W., ZENDO, T., NAKAYAMA, J., SONOMOTO, K., 2010. Enterocin X, a Novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:4542-4545.

- JACK, R.W., TAGG, J.R., RAY, B., 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59: 171-200.
- JAMES R., KLEANTHOUS C., MOORE G.R., 1996. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiol.*, 142:1569-1580
- JOERGER, M.C., KLAENHAMMER, T.R., 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.*, 167, 439-446.
- IZQUIERDO, E., BEDNARCZYK, A., SCHAEFFER, C., CAI, Y., MARCHIONI, E., DORSSELAER, A.V., ENNAHAR, S. 2008. Production of enterocins L50A, L50B, and IT, a new enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolated from Italian Ryegrass in Japan. *Antimicrob. Agent. Chemo.*, 52: 1917-1923.
- KIM, T.S., HUR, J.W., YU, M.A., CHEIGH, C.I., KIM, K.N., HWANG, J.K., PYUN, Y.R., 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 66:3-12.
- KOZAK, W., BARDOWSKI, J., DOBRZANSKI, W.T., 1977. Lactostrepcin-a bacteriocin produced by *Streptococcus lactis*. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 25:217-221.
- KLAENHAMMER, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochi.*, 70:337-349.
- KLAENHAMMER, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12:39-85.
- KLIBI, N., JOUINI, A., ROJO-BEZARES, B., MASMOUDI, A., RUIZ-LARREA, F., BOUDABOUS, A., TORRES, C., 2008. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in clinical enterococcal isolates of Tunisia. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24:653-657.
- LANDMAN, D., QUALE, J.M., 1997. Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40:161-170.
- LAUKOVA, A., 1992. Biochemical and physiological properties of enterococci isolated from the rumen of calves. (In Czech) *Anim. Prod.*, 37:857-860.

- LAUKOVA, A., MAREKOVA, M., 2001. Production of bacteriocins by different enterococcal isolates. *Folia Microbiol.* 46:49-52.
- LEE, H.J., KIM, W.J., 2010. Isolation and characterization of anti-listerial and amylase sensitive enterocin producing *Enterococcus faecium* DB1 from Gajami-sikhae, a fermented flat Fish in Korea. *Food Sci. Biotechnol.*, 19:373-381.
- LEROY, F., DE VUYST L., 1999. Temperature and pH conditions that prevail during the fermentation of sausages are optimal for the production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:974-981.
- LINDE, A., ROSS, C.R., DAVIS, E.G., DIB, L., BLECHA F., MELGAREJO T., 2008. Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. *J. Vet. Int. Med.*, 22:247-265.
- LINE, J.E., SVETECH, E.A., ERUSLANOV, B.V., PERELYGIN, V.V., MITSEVICH, E.V., MITSEVICH, I.P., LEVCHUK, V.P., SVETECH, O.E., SEAL, B.S., SIRAGUSA, G.R. STERN, N.J., 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agnt. Chemo.*, 52:1094-1100.
- LOSTEINKIT, C., UCHIYAMA, K., OCHI, S., TAKAOKA, T., NAGAHISA, K., SHIOYA, S., 2001. Characterization of bacteriocin N15 produced by *E. faecium* N15 and cloning of the related genes. *J. Biosci. Bioeng.*, 91:390-395.
- LUKASOVA, J., SUSTACKOVA, A., 2003. Enterococci and antibiotic resistance. *Acta Vet. Brno.* 72: 315-323.
- MANOLOPOULOU, E., SARANTINOPOULOS, P., ZOIDOU, E., AKTYPIS, A., MOSCHOPOULOU, E., KANDARAKIS, I.G., ANIFANTAKIS, E.M., 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 153-161.
- MARCINAKOVA, M., SIMONOVA, M., LAUKOVA, A., 2004. Probiotic properties of *Enterococcus faecium* EF9296 strain isolated from silage. *Acta Vet. Brno.* 73:513-519.
- MARCINAKOVA, M., LAUKOVA, A., SIMONOVA, M., STROMPFOVA, V., KORENEKOVA, B., NAD, P., 2008. A new probiotic and bacteriocin-producing

- strain of *Enterococcus faecium* EF9296 and its use in grass ensiling. Czech J. Anim. Sci., 53:336-345.
- MAREKOVA, M., LAUKOVA, A., SKAUGEN, M., NES, I., 2007. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 34:533-537.
- MARTINEZ, J.M., KOK, J., SANDERS, J.W., HERNANDEZ, P.E., 2000. Heterologous co-production of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. Appl. Environ. Microbiol. 66:3543-3549.
- MERRY R.J., DAVIES D.R., 1999. Propionibacteria and their role in the biological control of aerobic spoilage in silage. Lait, 79:149-164.
- MUELLER, T., ULRICH, A., OTT, E.M., MUELLER, M., 2001. Identification of plant-associated enterococci. J. Appl. Microbiol, 91:268-278.
- MUNDY, L.M., SAHM, D.F., GILMORE, M., 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev. 13:513-522.
- MURIANA, P.M., KLAENHAMMER, T.R., 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl. Environ. Microbiol., 57:114-121.
- NES, I. F., DIEP, D.B., HAVARSTEIN, L.S., BRURBERG, M.B., EIJSINK, V., HOLO, H., 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Anton. van Leeuwen. 70:113-128.
- NIETO-LOZANO, J.C., MEYER, J.N., SLETTEN, K., PELZE, C., NES, I.F., 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Gen. Microbiol., 138:1985-1990.
- NISSEN-MEYER, J., ROGNE, P., OPPEGARD, C., HAUGEN, H.S. KRISTIENSEN, P.E., 2009. Structure-Function Relationships of the Non-Lanthionine-Containing Peptide (class II) Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria. Cur. Pharm. Biotech., 10:19-37.
- OHMOMO, S., MURATA, S., KATAYAMA, N., NITISINPRASART, S., KOBAYASHI, M., NAKAJIMA, T., YAJIMA, M., NAKANISHI, K., 2000. Purification and some

- characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. J. Appl. Microbiol., 88:81-89.
- O'KEEFFE, T., HILL, C., ROSS, R.P., 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. Appl. Environ. Microbiol. 65:1506-1515.
- OSMANAGAOGLU, O., 2007. Detection and characterization of Leucocin OZ, a new anti-listerial bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* with a broad spectrum of activity. Food Cont., 18:118-123.
- ÖZÇELİK, S., 1998. Genel Mikrobiyoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Yayın No: 1, İkinci Basım, Isparta, s. 91.
- POETA, P., COSTA, D., ROJO-BEZARES, B., ZARAZAGA, M., KLIBI, N., RODRIGUES, J., TORRES, C., 2007. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. Microbiol. Res., 162:257-263.
- PUGSLEY, A., 1984. The ins and outs of colicins. Microbiol. Sci. 1:168-175.
- RAMNATH, M., AROUS, S., GRAVESEN, A., HASTINGS, J.W., HECHARD, Y., 2004. Expression of mptC of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. Microbiol. 150:2663-2668.
- REDDY, G., M. ALTAF, B. J. NAVEENA, M. VENKATESHWAR, AND E. VIJAY-KUMAR., 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation- A review. Biotechnol. Adv. 26:22-34.
- RENYE JR, J.A., SOMKUTI, G.A. PAUL, M., VAN HEKKEN, D.L., 2009. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolates from Hispanic-style cheeses. J. Ind. Microbiol Biotechnol. 36:261-268.
- RILEY, M.A., 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. Annu. Rev. Genet. 32:255-278.
- RILEY, M.A., WERTZ, J.E., 2002. BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application. Annu. Rev Microbiol., 56:117-137.

- RODRIGUEZ, J.M., MARTINEZ, M.I., KOK, J., 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*,42:91-121.
- SAELE D., 2002. Use of inoculants to improve silage quality. *Int Dairy Topics*, 7:1
- SCHAGGER, H., VON JAGOW, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166:368-379.
- SCHILLINGER, U., LUCKE, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*,55:1901-1906.
- SCHLEIFER, K.H. KILPPER-BALZ, 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:31-34.
- SIMONOVA, M., LAUKOVA, A., 2007. Bacteriocin activity of enterococci from rabbits. *Vet. Res. Comm.*, 31:143-152.
- SMARDA, J., SMAJS, D., 1998. Colicins – exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol. (Praha)* 43:563-582.
- SPARO, M.D., CASTRO, M.S., ANDINO, P.J., LAVIGNE, M.V., CERIANI, C., GUTIERREZ, G.L., FERNANDEZ, M.M., DE MARZI, M.C., MALCHIODI, E.L., MANGHI, M.A., 2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.*, 100:123-134.
- STILES, M.E., HOLZAPFEL, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36:1-29.
- STROMPFOVA, V., LAUKOVA, A., SIMONOVA, M., MARCINAKOVA, M., 2008. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Vet. Microbiol.*, 132:293-301.
- THEPPANGNA, W., MURASE, T., TOKUMARU, N., CHIKUMI, H., SHIMIZU, E., OTSUKI, K., 2007. Screening of the enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins. *J. Vet. Med. Sci.*, 69:1235-1239.

- TOGAY, S.O., KESKIN, A.C., ACIK, L., TEMIZ A., 2010. Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. *J. Appl. Microbiol.*, 109:1084-1092.
- UPRETI G.C., HINS DILL R.D., 1975. Production and mode of action of Lactocin 27: Bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 7:139-145.
- VAN DER WAL, F. J., LUIRINK, J., OUDEGA, B., 1995. Bacteriocin release proteins: mode of action, structure and biotechnological application. *FEMS Microbiol. Rev.* 17:381-399.
- VAUGHAN, E.E., DALY, C., FITZGERALD, G.F., 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.*, 73: 299-308.
- WOOLFORD, M.K., 1990. A review: The detrimental effects of air on silage. *J. Appl. Bacteriol.*, 68:101-116.
- XIE, L., MILLER, L.M., CHATTERJEE, C., AVERIN, O., KELLEHER, N.L., VAN DER DONK, W.A., 2004. Lactocin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Sci.*, 303:679-681.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Taner İŞEVI
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 28.08.1984 Şile
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (505) 454 26 25
Faks : -
e-posta : tanerisevi@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	KSÜ/ Ziraat Mühendisliği Bölümü	2008
Lise	Anadolu Öğretmen Lisesi	2002

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010	Ordu\Kumru	Ziraat Mühendisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. İŞEVI, T., 2008. Buğday ve Mercimek Samanlarının İvesi ve Bafra kuzularında Besi Sonu Performansı ve Yem Seçme Davranışları Üzerine Etkileri. 4. Ulusal Zootekni Öğrenci Kongresi
2. Buyukunal Bal, E.B., Bal, M.A., Isevi, T., and Yula, E., 2010. Application of PCR-RFLP of gap gene method as a molecular typing tool for coagulase negative Staphylococci from bovine and human origin identified with VITEK 2. Afr. J. Microbiol. Res. 4: 775-782
3. Bal, M.A., Büyükunal Bal, E.B., İŞEVI, T., 2010. Buğday silajı kaynaklı *Enterococcus* türlerinde enterosin yapısal genlerinin tespiti ve bakteriyosin aktivitelerinin belirlenmesi. 20. Biyoloji Kongresi, s.538-539, Denizli.

Hobiler

Doğa Bilimleri, Kitap okumak, Yüzmek