

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BOZADAN İZOLE EDİLEN *Enterococcus faecium* YT52 SUŞU
TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Müge GÖK CHARYYEV

**Danışman
Doç. Dr. Yasin TUNCER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2016**



© 2016 [Müge GÖK CHARYYEV]

TEZ ONAYI

Müge GÖK CHARYYEV tarafından hazırlanan “Bozadan izole edilen *Enterococcus faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Yasin TUNCER
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. İbrahim ÇAKIR
Abant İzzet Baysal Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN
Süleyman Demirel Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Yasin TUNCER



TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Müge GÖK CHARYYEV

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Enterokokların Genel Özellikleri	3
2.2. LAB Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması	5
2.2.1. Grup I: Lantibiyotikler	5
2.2.2. Grup II: Lantibiyotik olmayan ısı stabil bakteriyosinler.....	6
2.2.3. Grup III: Yüksek moleküler ağırlığa sahip ısıya duyarlı bakteriyosinler.	7
2.2.4. Grup IV: Lipit veya karbonhidrat yan grupları içeren kompleks bakteriyosinler	7
2.3. Enterokoklar Tarafından Üretilen Bakteriyosinler.....	7
2.3.1. Enterosin A	7
2.3.2. Enterosin B.....	8
2.3.3. Enterosin C	8
2.3.4. Enterosin I	9
2.3.5. Enterosin EFS2.....	10
2.3.6. Enterosin F-58.....	11
2.3.7. Enterosin FH 99	11
2.3.8. Enterosin HJ35	11
2.3.9. Enterosin HZ	12
2.3.10 Enterosin EFS100.....	12
2.3.11. Enterosin 1071	13
2.3.12. Enterosin LM-2	13
2.3.13. Enterosin L50	14
2.3.14. Enterosin KP	14
2.3.15. Enterosin MC13	14
2.3.16. Enterosin M.....	15
2.3.17. Enterosin RJ-11.....	15
2.3.18. Enterosin SE-K4.....	16
2.3.19. Enterosin P	17
2.3.20. Enterosin ON-157	17
2.3.21. Enterosin T	18
2.3.22. Enterosin TW21	18
2.3.23. Enterosin AS-48.....	18
2.3.24. Enterosin W.....	22
2.3.25. Enterosin X.....	22
2.3.26. Enterosin Q.....	22
2.3.27. Enterosin 96	23
2.3.28. Enterosin 416K1.....	23
2.3.29. Bakteriyosin ST5Ha	23
2.3.30. Bakteriyosin ST15.....	24

2.3.31. Bakteriyosin T8.....	24
2.3.32. Bakteriyosin GM-1.....	25
2.3.33. Enterosin 62-6.....	25
2.4. Bakteriyosinlerin Gıda Muhafazasında Kullanımı.....	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Mikroorganizmalar	30
3.2. Yöntem	31
3.2.1. YT52 izolatının antibakteriyel aktivite spektrumunun belirlenmesi.....	31
3.2.2. Proteolitik enzim uygulaması	31
3.2.3. Bakteriyosin üreticisi YT52 izolatının fenotipik olarak tanısı	32
3.2.3.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi	32
3.2.3.2. Elliker broth ortamında gelişme	32
3.2.3.3. YT52 izolatının API 50 CH test kiti ile fenotipik tanısı....	33
3.2.4. YT52 izolatının genotipik tanısı.....	33
3.2.4.1. Genomik DNA izolasyonu	33
3.2.4.2. Genomik DNA örneğinin elektroforezi	34
3.2.4.3. YT52 izolatının 16S rDNA bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve sekans analizi	35
3.2.5. YT52 suşunun plazmit içeriğinin belirlenmesi.....	36
3.2.5.1. Plazmit DNA izolasyonu	36
3.2.5.2. Plazmit DNA örneklerinin elektroforezi	38
3.2.5.2. Plazmit büyüklüğünün hesaplanması	38
3.2.6. pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	39
3.2.6.1. pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi..	39
3.2.6.2. Enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	39
3.2.6.3. Sıcaklık uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	40
3.2.7. Bakteriyosin yapısal genlerinin PZR ile çoğaltılması	40
3.2.8. Bakteriyosin üretimi	42
3.2.9. Hücre lizizi.....	42
3.2.10. Bakteriyosinin kısmi saflaştırması.....	42
3.2.11. Trisin-sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (Trisin-SDS-PAGE).....	43
3.2.11.1. Bakteriyosinin moleküler büyüklüğünün hesaplanması...	46
3.2.11.2. Aktif protein bandının tespiti.....	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	47
4.1. YT52 İzolatının Antibakteriyel Aktivite Özelliğinin Belirlenmesi	47
4.2. Proteolitik Enzim Uygulaması	49
4.3. YT52 İzolatının Fenotipik ve Genotipik Tanısı	50
4.4. Plazmit DNA İzolasyonu.....	53
4.5. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine pH, Sıcaklık ve Enzim Uygulamalarının Etkisi	54
4.6. Bakteriyosin Yapısal Genlerinin Tespiti	56
4.7. Bakteriyosin Üretimi	58
4.8. Hücre lizizi.....	59
4.9. Trisin-Sodyum Dodesilsülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Trisin-SDS-PAGE)	60

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	76



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BOZADAN İZOLE EDİLEN *Enterococcus faecium* YT52 SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN KARAKTERİZASYONU

Müge GÖK CHARYYEV

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Yasin TUNCER

Bu çalışmanın amacı, bozadan izole edilen bakteriyosin üreticisi *Enterococcus faecium* YT52 izolatının tanısı ve üretilen bakteriyosinin karakterizasyonudur. YT52 suşunun *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus* gibi çeşitli Gram pozitif bakterileri inhibe ettiği belirlenmiştir. YT52 izolatının tanısı fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Fenotipik tanı testleri sonucu YT52 izolatı *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* olarak tanımlanmıştır. Ancak, 16S rDNA dizi analizi YT52 izolatının *Enterococcus faecium* genomu ile % 99 homoloji gösterdiğini ortaya koymuştur. *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu için bakteriyosinin farklı pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarına karşı davranışı incelenmiştir. *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosin ısı stabil ve asidik ve alkali şartlarda (pH 2.0-11.0) aktivite gösterdiği, fakat çeşitli proteolitik enzimlere ve α -amilaza duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bilinen enterosin primerleri kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamaları sonucu YT52 suşunda enterosin A, B ve X yapısal genlerinin (*entA*, *entB* ve *entX*) varlığı tespit edilmiştir. YT52 suşunda bakteriyosin üretiminin gelişme fazında başladığı belirlenmiş ve maksimum bakteriyosin üretimi (6400 AU/mL) bu fazın sonunda ölçülmüştür. *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin primer metabolit kinetiğine sahip olduğu belirlenmiştir. Hücre liziz çalışması sonucu, *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin *L. monocytogenes* ATCC 15813 suşuna karşı bakterisidal etki gösterdiği belirlenmiştir. Trisin-SDS-PAGE analizi sonucu aktif protein bandının moleküler büyüklüğünün yaklaşık 5.5 kDa olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç *E. faecium* YT52 suşunda *entB* geninin fenotipik olarak ifade edildiğinin ancak *entA* ve *entX* genlerinin ise fenotipik olarak ya ifade edilmediğinin (sessiz “silent” gen) yada çok düşük düzeyde ifade edildiğinin güçlü delili olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Boza, *Enterococcus faecium*, bakteriyosin, enterosin B, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), sessiz enterosin geni, Trisin-SDS-PAGE.

2016, 77 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN PRODUCED BY *Enterococcus faecium* YT52 STRAIN ISOLATED FROM BOZA

Müge GÖK CHARYYEV

Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yasin TUNCER

The aim of this study was to identify bacteriocin producer *Enterococcus faecium* YT52 isolate from boza and characterization of producing bacteriocin. It has been determined that YT52 inhibits various Gram positive bacteria such as *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. The identification of YT52 isolate was done using phenotypic and genotypic methods. YT52 isolate was identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as the results of the phenotypic identification tests. However, 16S rDNA analysis put forward that YT52 isolate showed 99 % homology with *Enterococcus faecium* genome. The behaviour of the bacteriocin was examined against different pH, temperature and enzyme treatments for characterization of the bacteriocin produced by YT52 strain. It was determined that the bacteriocin produced by *E. faecium* YT52 was heat stable and active at acid and alkaline conditions (pH 2.0-11.0), but it was sensitive to several proteolytic enzymes and α -amylase. Present of the enterocin A, B and X structural genes (*entA*, *entB* and *entX*) in the YT52 strain were identified by polymerase chain reaction (PCR) assay by using known enterocin primers. It has defined that bacteriocin production started at logarithmic phase and maximum bacteriocin production (6400 AU/mL) was measured at the end of this phase. The result of the cell lysis study showed that bacteriocin produced by *E. faecium* YT52 strain was act as bactericidal against *L. monocytogenes* ATCC 15813 strain. After Tricin-SDS-PAGE analysis, it has been determined that there is only one active protein band with the molecular size approximately 5.5 kDa in the partial purification of supernatant of *E. faecium* YT52. This result has been assessed as strong evidence of expression of *entB* as phenotypically but *entA* and *entX* genes were not expressed (silent gene) or a too low phenotypic expression of these genes.

Keywords: Boza, *Enterococcus faecium*, bacteriocin, enterocin B, polymerase chain reaction (PCR), silent enterocin gene, Tricine-SDS-PAGE.

2016, 77 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan, bilimsel çalışma disiplini öğreten ve akademik gelişimimde bana destek olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Yasin TUNCER'e;

Çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Banu ÖZDEN TUNCER'e;

Laboratuvar günlerini beraber geçirdiğim ve benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Bilim Uzmanı Didem AKPINAR KANKAYA'ya, Yüksek Gıda Mühendisi Furkan DEMİRGÜL, Mine AVCI, Burak GENİŞ ve Özge YÜCEER'e;

3914-YL2-14 Nolu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Eğitim ve öğrenim hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan annem Münire GÖK ve eşim Kemal CHARYYEV'e

sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Müge GÖK CHARYYEV
ISPARTA, 2016

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Enterosin 1071(<i>ent1071a</i> ve <i>1071B</i>), laktokoksin G (<i>LcnGa</i> ve <i>LcnGβ</i>) ve laktokoksin Q (<i>LcnQα</i> ve <i>LcnQβ</i>) ile enterosin C 'nin (<i>entC1</i> ve <i>entC2</i>) amino asit sekanslarının karşılaştırılması	9
Şekil 2.2. Enterosin M ile Enterosin P'nin amino asit sekanslarının karşılaştırılması.....	15
Şekil 2.3. Enterosin RJ-11 'in amino asit sekansının enterosin L50A ve L50B ile karşılaştırılması.....	16
Şekil 2.4. Enterosin SE-K4 ve bakteriyosin 31'in N-uç bölgesindeki ilk 43 amino asitin sekansının karşılaştırılması	17
Şekil 2.5. (A) Enterosin AS-48'in üç boyutlu heliks yapısı. (B) Enterosin AS-48'in amino asit sekansı	19
Şekil 2.6. (A) Enterosin AS-48'in yapısal gen üretiminin prosesi. (B) Peptidin baş kısmından uç kısmına doğru birleşip halkasal yapı oluşturması ve olgun halkasal enterosin AS-48 peptidinin α -heliks yapı olarak düzenlenmesi	20
Şekil 2.7. (A) Enterosin AS-48'in suda çözülebilir dimerik form-1 bölümünden geçiş mekanizması (B) dimerik form-2 bölümünde görülen membran bağlantısı.	20
Şekil 4.1. YT52 izolatının <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15813 suşuna karşı verdiği inhibisyon zonu	48
Şekil 4.2. YT52 izolatı tarafından üretilen antibakteriyel maddenin α -kemotripsin uygulaması sonucu kalan aktivitesi	49
Şekil 4.3. YT52 izolatının genomik DNA örneği	52
Şekil 4.4. <i>E. faecium</i> YT52 suşunun PZR ile çoğaltılan 16s rDNA fragmenti...	52
Şekil 4.5. Bakteriyosin üreticisi YT52 suşunun plazmid içeriği	54
Şekil 4.6. <i>E. faecium</i> YT52 suşunun genomik DNA'sında enterosin genlerinin PZR amplifikasyonu	58
Şekil 4.7. <i>E. faecium</i> YT52 suşu tarafından bakteriyosin üretimi ve kültür yoğunluğundaki değişim	59
Şekil 4.8. <i>E. faecium</i> YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15813 suşunun gelişimi üzerine etkisi	60
Şekil 4.9. <i>E. faecium</i> YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin trisin-SDS-PAGE jel elektroforez profili	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin gruplandırılması.....	5
Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan PZR karışımı	35
Çizelge 3.2. Enterosin genlerinin tespitinde kullanılan PZR primerleri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün büyüklükleri	41
Çizelge 4.1. YT52 izolatının indikatör bakterilere karşı oluşturduğu zon çapları	47
Çizelge 4.2. YT52 izolatının API 50 CH karbonhidrat fermentasyon test sonuçları	51
Çizelge 4.3. <i>E. faecium</i> YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivitesi üzerine farklı pH, enzim ve sıcaklık uygulamalarının etkisi	57



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS	Amonyum persülfat
bç	Baz çifti
Da	Dalton
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
g	Gram
GRAS	İnsan ve hayvan tüketiminde güvenilir
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
LAB	Laktik asit bakterisi
RNA	Ribonükleik asit
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
sn	Saniye
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	Tetrametil etilen diamin
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
µL	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Gıda muhafazası, gıda kaynaklarının etkin kullanılması ve sağlıklı beslenme gıda sanayisinin en önemli çalışma konularındandır. Hızla artan nüfus ve gıda piyasasının globalleşmesi fonksiyonel, minimal işleme tabi tutulmuş, dayanıklı, sağlıklı, taze ve güvenilir yeni gıdalara olan talebi arttırmıştır. Gıda bozulmalarından dolayı meydana gelen ekonomik kayıpların önlenmesi, gıda üretim maliyetlerinin düşürülmesi ve gıdaların taşınması esnasında meydana gelebilecek herhangi bir patojen kontaminasyonunun engellenmesi gıda sanayisinin en önemli amaçlarındandır. Alternatif gıda koruma işlemlerinden olan biyokoruma gıdanın mikrobiyolojik olarak bozulmasını önlemekte ve böylece gıdalar güvenilir bir şekilde muhafaza edilebilmektedir. Özellikle tüketiciler tarafından sağlıklı beslenme, katkısız ve organik beslenme talebinin artmasıyla biyokoruma ile doğal olarak ürün muhafazası yönündeki çalışmalar günümüzde önem kazanmıştır. Üretilen gıdaların uzun süre bozulmadan saklanabilmesi için kullanılan en yaygın biyokoruma yöntemlerin başında fermentasyon gelmektedir. Ürünün organoleptik özelliklerinin gelişmesi, tekstür, kıvam gibi fiziksel özelliklerinin değişmesi laktik asit bakterileri (LAB) gibi sağlığa zararı bulunmayan, ürün oluşumunda etkili bakterilerin fermentasyonu ile gerçekleşmektedir. LAB gıda ortamlarında fermentasyon ile aynı zamanda karbon dioksit, diasetil, hidrojen peroksit, bakteriyosin, organik asit gibi antimikrobiyal maddeler üretmektedirler. Bu antimikrobiyal maddeler gıdalarda bulunan, fermentasyonda görevi olmayan hatta patojen özelliğe sahip olan diğer mikroorganizmaların gelişimini inhibe edebilmekte veya bakterisidal etki gösterebilmektedirler. Aslında LAB ve onların ürettikleri bakteriyosinler farkında olmadan yüzyıllardır tüketilmektedirler. Bakteriyosinlerin gıdalarda patojen ve bozucu mikroorganizmalara karşı inhibisyon etkileri, pH ve ısı işlem gibi değişen koşullara göreceli tolerans göstermeleri, küçük peptit yapısında olmaları, sindirim enzimleri ile kolayca sindirilebilmeleri ve toksik özellikte olmamaları biyokoruyucu olarak rol oynamasında önemini arttırmaktadır.

Enterokoklar peynir ve sosis gibi çeşitli geleneksel fermente gıdalarda dominant mikroflorayı oluştururlar. Bu bakteriler laktik asit üretimi, proteolitik ve lipolitik aktiviteleri, sitrat metabolizması, probiyotik özellikleri ve bakteriyosin üretimi gibi çeşitli fonksiyonel özelliklerinden dolayı fermente gıda endüstrisinde önemli rol

oynamaktadırlar. Enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler (enterosinler) özellikle *Listeria monocytogenes*'e karşı güçlü bakterisidal etki göstermektedir. *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş gıdaların tüketimi tüketici sağlığı açısından büyük risk teşkil etmektedir. Bu yüzden her türlü gıda prosesine dayanıklılık gösterebilen *L. monocytogenes*'in gelişimini inhibe eden ve gıda prosesinde önemli rolü olan enterokokların ve bunlar tarafından üretilen enterosinlerin gıda endüstrisinde büyük bir kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Yapılan bu yüksek lisans tez çalışmasında bozadan izole edilen bakteriyosin üreticisi YT52 izolatının tanısı ve üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Enterokokların Genel Özellikleri

Enterokoklar ilk olarak 1899 yılında Thiercelin tarafından tanımlanmıştır (Franz vd., 1999). *Streptococcus* cinsi bakteriler 1937 yılında Sherman tarafından piyojenik streptokoklar, viridans streptokoklar, laktik streptokoklar ve enterokoklar olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. *Streptococcus* cinsi daha sonra fizyolojik testler, karşılaştırmalı serolojik çalışmalar ve süperoksit dismutaz enzim analizlerinin yanı sıra nükleik asit hibridizasyonu (DNA:DNA ve DNA:RNA) gibi moleküler tanımlama tekniklerinin geliştirilmesiyle beraber *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Enterococcus* olmak üzere 3 ayrı cins olarak anılmaya başlanmıştır (Franz vd., 2003; Klein, 2003).

16S rRNA dizilimi dikkate alındığında enterokoklar 4 gruba ayrılmıştır. *Enterococcus faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii* “faecium” grubunu, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus* ve *E. pseudoavium* “avium” grubunu, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* “gallinarum” grubunu, *E. columbae* ve *E. cecorum* da dördüncü grubu oluşturmaktadır. *E. faecalis*, *E. dispar*, *E. flavescens*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfurous* ve *E. seriolicida* gibi diğer tüm enterokoklar ise bireysel olarak sınıflandırılmaktadır. Enterokok türleri arasında özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* fermente gıdaların kendine has tat, aroma ve tekstür özelliklerinin gelişiminde önemli rol oynamalarından dolayı önem arz etmektedirler. Bu iki tür ayrıca probiyotik olarak da değerlendirilmektedir (Franz vd., 1999; Franz vd., 2003; Klein, 2003; Gomes vd., 2008; Özmen-Toğay and Temiz, 2011).

Enterokoklar, karbonhidratları L-laktik aside fermente edebilme özelliklerinden dolayı homofermentatif laktik asit bakterileri içinde yer alan, Gram pozitif, spor oluşturmeyen, bazı suşlarının pseudo-katalaz reaksiyonu göstermesine karşın genellikle katalaz negatif, fakültatif anaerobik, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* gibi bazı türleri dışında hareketsiz, kok morfolojisine sahip bakterilerdir. Sıvı besi ortamlarında tek, çift veya kısa zincir formunda üreme gösterirler. Enterokoklar mikroskopik olarak streptokok türlerinden ayırt edilemezler. Bazen Gram-pozitif kokobasil şeklinde görülebilirler. Optimum üreme sıcaklıkları 35 °C olmakla beraber

10-45 °C sıcaklık aralığında, % 6.5 NaCl ve pH 9.6 ortamında da üreyebilmekte, 60 °C'de 30 dakikalık ısıtma işlemine dayanabilmekte ve suşların çoğu % 40 safra tuzu varlığında esculini hidrolize edebilmektedir. Ancak, *E. avium*, *E. saccharominimus*, *E. cecorum* ve *E. columbae* gibi nadir türler % 6.5 NaCl içeren ortamda az gelişmekte veya hiç gelişmemektedir. Enterokoklar genellikle hemolitik aktivite göstermezler. Ancak bazı suşlarının α -hemolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Schleifer ve Kilpper-Bälz, 1987; Devriese vd., 1993; Franz vd., 1999; Gardin vd., 2001; Vancanneyt vd., 2004; Özmen-Toğay and Temiz, 2011).

Bazı geleneksel fermente gıdaların kendine has yapı, tat ve aromasının oluşumunda önemli rol oynayan enterokoklar primer patojen olarak kabul edilmemelerine rağmen, ikincil patojen olarak özellikle insan bağışıklığını tehlikeye atan bakteriler içerisinde tanımlanmaktadırlar (Larson vd., 2008). Düşük su aktivitesi, yüksek ısı gibi çevresel koşullara, bazı antiseptiklere dirençli olmaları ve cansız yüzeylerde uzun süre yaşayabilmeleri nedeniyle, hastane enfeksiyonları açısından büyük önem taşımaktadırlar (Facklam, 2002). Enterokoklar bakteriyemi, üriner, sistem enfeksiyonu ve endokarditis gibi hastane enfeksiyonlarında önemli rol oynamaktadırlar (Lukasova ve Sustackova, 2003).

Enterokoklar bazı geleneksel fermente gıdalarda dominant mikroflora olarak rol oynarlar. Enterokoklar, fonksiyonel özelliklerinden dolayı yani laktik asit üretimi, proteolitik ve lipolitik aktiviteleri, sitrat metabolizması, probiyotik özellikleri ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal aktiviteye sahip proteinleri sentezleme yeteneklerinden dolayı fermente gıda endüstrisinde önemli rol oynayan LAB'dir (Andrighetto vd., 2001; Saraninopoulos vd., 2001; Giraffa, 2003; Franz vd., 2003; Foulquie-Moreno vd., 2006; Ogier vd., 2008). Enterokoklar bazı peynirlerin olgunlaşması esnasına ürünün organoleptik özelliklerinin gelişimine sağladıkları katkıdan dolayı süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanılabilmektedirler. İngiltere'de "Advisory Committee on Novel and Processes" Komitesi fermente süt ürünlerinde *E. faecium* k77D suşunun starter kültür olarak kullanımını onaylamıştır (Franz vd., 2003; Saraninopoulos vd., 2001). Yapılan bir çalışmada, Tunus fermente süt ürünü olan "Rayeb" den izole edilen *E. faecium* MMRA suşunun mide asidi ve safra tuzlarına karşı toleranslı, sindirim sistemindeki mukozal dokulara tutunabilme

ve bakteriyosin üretebilme yeteneklerinden dolayı probiyotik kültür olarak kullanım potansiyeli olduğu belirlenmiştir (Rehaiem vd., 2014).

2.2. LAB Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

Tagg vd. (1976), tarafından belirtilen kriterlere göre, bakteriyosinler protein yapısında antagonistik maddeler olup sınırlı sayıda bakterilere, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip bileşiklerdir. Bakteriyosinler için farklı sınıflandırmalar yapılmakla birlikte, daha çok Klaenhammer'in özellikle Gram pozitif bakterileri dikkate alarak yaptığı sınıflandırma kullanılmaktadır. Bakteriyosinlerin biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak yapılan bu sınıflandırmaya göre bakteriyosinler molekül büyüklükleri, kimyasal yapıları, etki mekanizmaları ve ısı stabilitelere göre 4 gruba ayrılmışlardır (Çizelge 2.1). Ancak biyokimyasal tanımlanması bakımından daha çok ilk 3 grup dikkate alınmaktadır (Chen ve Hoover, 2003).

Çizelge 2.1. LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin gruplandırılması

Grup I. Lantibiyotikler
Ia: Nisin benzeri lantibiyotikler. Katyonik özellik içerirler.
Ib: Duramisin benzeri lantibiyotikler. Globüler proteinler olup düşük negatif yük içerirler.
Grup II. Lantibiyotik olmayan ısı stabil bakteriyosinler
Ila: Antilisterial etkili pediosin benzeri bakteriyosinler
Ilb: İki bileşenli (iki peptitli) bakteriyosinler
Ilc: Siklik bakteriyosinler
Ild: Diğer grup II bakteriyosinler
Grup III. Yüksek moleküler ağırlığa sahip ısıya duyarlı bakteriyosinler
Grup IV. Lipit veya karbonhidrat yan grupları içeren kompleks bakteriyosinler

2.2.1. Grup I: Lantibiyotikler

Bu grup üyesi bakteriyosinler daha çok “lantiyonin” içermeleri nedeniyle lantibiyotikler olarak adlandırılmakta ve yapılarında bilinen amino asitlerden farklı

olarak lantiyonin (Lan) ve metillantiyonin (MeLan) amino asit türevlerini içermektedirler. Bununla birlikte yapılarında biyokimyasal özelliklerini etkileyen dehidroalanin ve dehidrobütirin de bulunmaktadır. Molekül ağırlıkları 5 kDa'dan daha düşüktür. Bu grupta yer alan nisin, laktisin 3147A ve 3147B ile plantarisin C'nin ısı stabiliteyi yüksek olup, asidik pH'da 100 °C'ye kadar stabiliteyi koruyabilmektedirler (Chen ve Hoover, 2003). Bu gruptaki bakteriyosinler kimyasal yapılarına ve antimikrobiyal aktiviteye göre Ia ve Ib lantibiyotikler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Twomey vd., 2002; Chen ve Hoover, 2003). Grup Ia bakteriyosinler pozitif yüke sahip hidrofobik polipeptitlerdir. Membran aktif peptitler olan bu grup üyesi bakteriyosinler membranda por oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Twomey vd., 2002; Chen ve Hoover, 2003). Grup Ib üyesi bakteriyosinler ise yüksüz veya negatif yüklü olup, globüler proteinlerdir. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Twomey vd., 2002).

2.2.2. Grup II: Lantibiyotik olmayan ısı stabil bakteriyosinler

Bu grup üyesi bakteriyosinler Grup I'den farklı olarak lantiyonin içermezler. Isı stabil olan bu bakteriyosinlerin molekül ağırlıkları 10 kDa'dan düşüktür. Antimikrobiyal aktiviteyi membran aktif olmalarından kaynaklanmaktadır. Çok sayıda bakteriyosin içeren bu grup 3 alt gruba ayrılmaktadır (de Martinis vd., 2002). Grup IIA üyesi bakteriyosinler özellikle *Listeria*'ya karşı aktiftirler. Bakteriyosinin N-terminal ucunda Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys amino asit dizisi yer almaktadır (Chen ve Hoover, 2003). Grup IIB üyesi bakteriyosinler yapısal olarak birbirinden farklı iki polipeptit içerirler. Bu polipeptitler tek başlarına aktivite gösterikleri gibi birlikte sinerjik etki gösterirler. Bu grup üyesi bakteriyosinler hücre membranında por oluşturarak antimikrobiyal aktivite gösterirler (Hécharde ve Sahl, 2002). Grup IIC üyesi bakteriyosinler, grup II bakteriyosinlerin özelliklerini gösteren ancak, grup IIA ve grup IIB altında sınıflandırılmayan diğer bakteriyosinleri içermektedir. Bu grup üyesi bakteriyosinlerin birçoğu sistein kalıntısı içermektedir. Bu nedenle bu bakteriyosinlere tiolbiyotik'ler veya sistibiyotik'ler denilmektedir. Bu bakteriyosinler Tiyo-aktif bakteriyosinler olup, aktiviteyi için indirgenmiş sistin kalıntısına gereksinim duyarlar (de Martinis vd., 2002).

2.2.3. Grup III: Yüksek moleküler ağırlığa sahip ısıya duyarlı bakteriyosinler

Grup III üyesi bakteriyosinler, ısıya duyarlı ve büyük moleküler ağırlığa sahip (30 kDa ve üzeri) bakteriyosinlerdir. *Lactobacillus helveticus* tarafından üretilen helvetisin J ve helvetisin V-1829 ve *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen laktisin B bu grubun en bilinen üyeleridir (Chen ve Hoover, 2003; Jeevaratnam vd., 2005; de Vuyst ve Leroy, 2007; Todorov, 2009).

2.2.4. Grup IV: Lipit veya karbonhidrat yan grupları içeren kompleks bakteriyosinler

Grup IV üyesi bakteriyosinlerin biyolojik aktiviteleri için, polipeptit yapısı dışında karbonhidratlar veya lipitler gibi ilave bazı yapılar içermeleri gerekmektedir. Plantarisin S, laktosin 27 ve leukonosin S bu grubun bazı üyeleridir (Ennahar vd., 2000; Nes ve Holo, 2000; Jeevaratnam vd., 2005).

2.3. Enterokoklar Tarafından Üretilen Bakteriyosinler

Enterokokların ürettiği bakteriyosinler enterosin olarak isimlendirilmektedir. Enterosinlerin kullanımı sucuk fermentasyonunda ve dilimlenmiş vakum paketli pişmiş et ürünlerinde *Listeria monocytogenes*'in gelişiminin ve LAB tarafından üründe yapışkan tabaka önlenmesinde ek koruma yöntemi olarak yarar sağlamaktadır. Enterosin üreticisi enterokoklar kimyasal koruyuculara alternatif olarak et ürünlerinde patojen kontrolü için kullanılabilir (Hugas vd., 2003; İşleroğlu vd., 2008)

2.3.1. Enterosin A

Enterosin A'nın ilk olarak *E. faecium* CTC492 suşu tarafından sentezlendiği tespit edilmiştir (Aymerich vd., 1996). Ayrıca enterosin A'nın *E. faecium* DPC1146, *E. faecium* P21 gibi bazı *E. faecium* suşları tarafından da sentezlendiği belirlenmiştir (O'Keeffe vd., 1999; Herranz vd., 2001). Enterosin A, grup IIa bakteriyosinleri sınıfına dahil küçük moleküler ağırlığa sahip, ısı stabil bir bakteriyosindir. Enterosin A birçok grup IIa bakteriyosinleri gibi N-uç zincirinde YGNGV konsensus serisini

içermektedir. Enterosin A'nın moleküler ağırlığı 4828.67 Da'dur. Enterosin A tripsin, pronaz E ve proteinaz K gibi proteolitik enzimlerle muamele edilmesi sonucu aktivitesini kaybetmektedir. Enterosin A 100 °C'de 15 dakika ısı uygulamasına dirençlidir. Geniş pH aralığında (2.0-10.0) enterosin A'nın aktivitesi stabildir. Enterosin A *E. faecalis*'in yanı sıra önemli gıda patojenlerden *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *S. aureus* bakterilerine karşı inhibitör aktivite göstermektedir (Ghraiiri vd., 2008). *entA* geni tarafından kodlanan enterosin A, 18 amino asit kalıntısı içeren öncü peptitin translokasyonu sonrası 47 amino asit içeren olgun peptite dönüşerek sentezlenmektedir (Borrero vd., 2011).

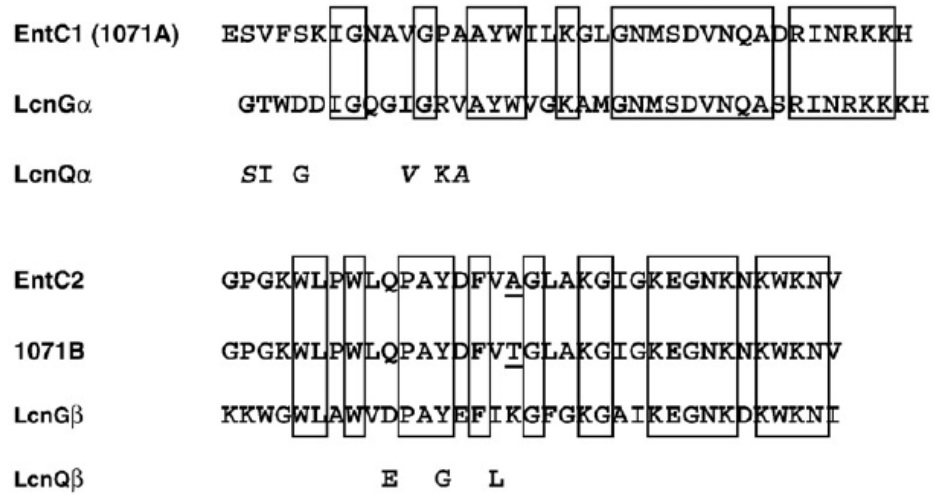
2.3.2. Enterosin B

Enterosin B, *E. faecium* T136 suşu tarafından sentezlenmektedir (Casaus vd., 1997). Ayrıca Enterosin B'nin Tunus süt ürünü olan "Rigouta" peynirinden izole edilen *E. faecium* MMT21 suşu tarafından (Ghraiiri vd., 2008) ve çiğ süttten izole edilen *E. faecalis* MYE58 suşu (Tuncer vd., 2014) tarafından da sentezlendiği tespit edilmiştir. Grup Ila bakteriyosinleri sınıfında yer alan enterosin B diğer grup Ila üyesi bakteriyosinlerde görülen YGNGV konsensus motifini içermemesi açısından farklılık göstermektedir. Ancak grup Ila bakteriyosinlerinin içerdiği bakteriyosin transport sisteminde rol oynayan çift glisin-tip lider sekansı içermesi açısından ise benzerlik göstermektedir (Casaus vd., 1997). Enterosin B'nin moleküler ağırlığı 5463.8 Da'dur. Enterosin B tripsin, pronaz E ve proteinaz-K gibi proteolitik enzimlerle muamele edilmesi sonucu aktivitesini kaybetmektedir. Enterosin B'nin inhibitör aktivitesi 100 °C'de 15 dakika süreyle ısıl işlem uygulaması sonrası ve pH 2.0-10.0 değerleri arasında stabildir (Ghraiiri vd., 2008). Gıda bozulmasına ve gıda zehirlenmesine yol açan patojenlerden *E. faecalis*, *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus* ve *L. innocua*, bakterilerine karşı inhibitör aktivite göstermektedir (Ghraiiri vd., 2008; Tuncer vd., 2014).

2.3.3. Enterosin C

Enterosin C, insan kolostridiumundan izole edilen *E. faecalis* C901 tarafından üretilen grup IIB üyesi bir bakteriyosindir. Enterosin C, C1 ve C2 olarak adlandırılan ve sinerjik antimikrobiyal aktivite gösteren iki farklı peptitten oluşmaktadır.

Enterosin C1 ve C2 yapısal genleri ve bağışıklık genleri 9 kb'lık pEntC plazmiti üzerinde kodlanmaktadır. Enterosin C1 ve C2'nin moleküler ağırlıkları sırasıyla 4284 ve 3867 Da'dur. Enterosin C, *Actinomyces neuui*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Facklamia hominis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus anginosus* ve *Streptococcus intermedius* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Enterosin C1 ve C2'nin amino asit sekans analizi sonucu enterosin C1'in *E. faecalis* BFE1071 tarafından üretilen olgun enterosin 1071A'nın N-uç bölgesindeki ilk 10 amino asit ile % 100 homolog olduğu enterosin 1071B'nin sekansında ise enterosin C2'den bir amino asit farklı olduğu belirlenmiştir. Enterosin 1071B'de 17. pozisyonda treonin bulunurken enterosin C2'de 17. pozisyonda apolar alanin kalıntısı bulunmaktadır (Şekil 2.1.) (Maldonado-Barragan vd., 2009).



Şekil 2.1. Enterosin 1071 (*ent1071A* ve *1071B*), laktokoksin G (*LcnGa* ve *LcnGb*) ve laktokoksin Q (*LcnQa* ve *LcnQb*) ile enterosin C'nin (*entC1* ve *entC2*) amino asit sekanslarının karşılaştırılması (Maldonado-Barragan vd., 2009).

2.3.4. Enterosin I

Enterosin I, İspanyol fermente yeşil zeytininden izole edilen *E. faecium* 6T1a suşu tarafından üretilen 44 amino asitten oluşan bir bakteriyosindir. Saflaştırılmış enterosin I'nın SDS-PAGE analizi sonucu moleküler ağırlığı 5 kDa olarak hesaplanmıştır. Enterosin I zeytin fermentasyonunda doğal olarak bulunan *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Pediococcus pentosaceus* suşlarına, Gram-pozitif

zeytinde bozunmaya yol açan bakterilerden *Propionibacterium* spp., *Clostridium* spp. ve *Bacillus* spp. suşlarına, zeytin fermentasyonunu yaygın olarak kontamine eden *E. faecalis* ve ayrıca *L. innocua* ve *L. monocytogenes* suşlarına karşı inhibitör aktivite göstermektedir. Enterosin I üretimi, *E. faecium* 6T1a suşunda bakteriyosin üretimi ve bağışıklık genlerinin pEF1 plazmiti üzerinde kodlu olduğu gözlenmiştir (Floriano vd., 1998). Enterosin I 100 °C’de 5 dakika ısıl işlem sonrasında aktivitesini kaybetmemekte ancak, otoklavlandıktan sonra tamamen inaktive olmaktadır. Enterosin I α -kemotripsin, pronaz E, proteinaz-K, subtilopeptidaz A, termolisin ve tripsin enzimleri ile muamele edilmesi ile aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Diğer taraftan enterosin I’nın inhibitör aktivitesini α -amilaz, katalaz, fisin, lizozim ve RNaz A uygulaması ile aktivitesini kaybetmediği tespit edilmiştir. Enterosin I üretimi logaritmik artış fazında maksimum seviyeye ulaşmakta ve erken durma fazında sabit olarak kalmaktadır. Enterosin I’nın amino asit dizilimi diğer pediosin benzeri enterokok bakteriyosinleri ile karşılaştırıldığında bazı farklılıklar görülmektedir. Enterosin I, diğer pediosin benzeri bakteriyosinlerin çoğunun (enterosin B ve karnobakteriyosin A istisnaları hariç) N-uç bölgesinde yaygın olarak görülen YGNGV_xC motifini içermemektedir. Aynı zamanda enterosin I diğer pediosin benzeri bakteriyosinlerde mevcut olan sistein kalıntısını içermemektedir. Sistein kalıntısı bakteriyosinlerin antibakteriyal etkinliklerinde son derece önemlidir. İki ya da daha fazla sistein kalıntısı içeren bakteriyosinler disülfid formunda köprüler oluşturabilirler. Disülfid köprüsü içeren bakteriyosinler daha geniş inhibisyon spektrumuna sahiptirler. Sistein kalıntısı içermeyen bakteriyosinler ise genel olarak daha dar inhibitör spektrumuna sahiptirler (Floriano vd., 1998).

2.3.5. Enterokoksin EFS2

Enterokoksin EFS2 yarı katı geleneksel Fransız peyniri yüzeyinden izole edilen *E. faecalis* EFS2 suşu tarafından üretilen 67 amino asit içeren bir bakteriyosindir. Enterokoksin EFS2, *L. innocua* LIN11 suşuna karşı bakterisidal etki göstermektedir. Enterokoksin EFS2 pH 4.5-9.0 aralığında aktivite göstermektedir. Moleküler ağırlığı 7146.4 Da olan enterokoksin EFS2 durağan fazın başlangıcında maksimum düzeyde görülmektedir (Maisnier-Patin vd., 1996).

2.3.6. Enterosin F-58

Enterosin F-58, “Jben” isimli keçi peynirinden izole edilen *E. faecium* F58 suşu tarafından üretilen geniş etki spektrumlu bir bakteriyosindir. pH 4.0-8.0 değerleri arasında aktivite gösterebilen enterosin F-58 100 °C’de 5 dakika süreyle ısıtıl işlem sonrasında stabilitesini koruyabilmektedir. Antimikrobiyal aktivite F-58A ve F-58B adlı sırasıyla 5210.5 ve 5234.3 Da moleküler büyüklüğe sahip iki peptit ile gerçekleşmektedir. F-58A ve F-58B peptitlerinin yapısal genleri 22 kb büyüklüğündeki plazmit üzerinde kodlanmaktadır. Enterosin F-58’in amino asit sekansı enterosin L50 ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir (Achemchem vd., 2005).

2.3.7. Enterosin FH 99

E. faecium FH 99 suşundan izole edilen enterosin FH 99, çeşitli Gram-pozitif patojen ve saprofit bakterilere karşı inhibitör aktivite gösteren grup II üyesi bir bakteriyosindir. Enterosin FH 99 pH 2.0-10.0 aralığında ve yüksek derecelerde sıcaklık uygulamalarından (100 °C’de 60 dakika) sonra bile aktivitesini koruyabilmektedir. Enterosin FH 99 proteinaz-K, papain, tripsin, pronaz-E, fisin, kemotripsin ve proteaz I enzimleri ile muamele edildiğinde aktivitesini tamamen kaybetmekte fakat amilaz, lipaz ve katalaz enzimlerinden ise etkilenmemektedir. Enterosin FH 99, otoklavlandıktan (121 °C’de 15 dakika) sonra bile aktivitesini kaybetmemektedir. SDS-PAGE analizleri sonucu enterosin FH 99’un moleküler büyüklüğü yaklaşık olarak 5 kDa olarak hesaplanmıştır. Enterosin FH 99 *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. faecalis*’in yanı sıra birçok LAB’ne karşı aktivite göstermektedir (Gupta vd., 2010).

2.3.8. Enterosin HJ35

Enterosin HJ35, insan derisinden izole edilen *E. faecium* HJ35 suşu tarafından üretilmektedir. *E. faecium* HJ35 suşu *Propionibacterium acnes*’e karşı aktivite gösterdiği için akne tedavisinde antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır. Enterosin HJ35 *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *S. epidermitis*, *C. perfringens*, *Micrococcus flavus*, *L. monocytogenes*, *L. ivanovi*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*

ve *P. acnes*'e karşı antibakteriyel aktivite göstermektedir. Enterosin HJ35 proteaz XIV uygulaması ile aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Enterosin HJ35'in ısı işlem (100 °C'de 30 dakika), farklı pH (pH 3.0-9.0) ve organik solvent uygulamalarına karşı aktivitesi stabildir. Enterosin HJ35'in moleküler büyüklüğü SDS-PAGE analizi sonucunda yaklaşık olarak 4-4.5 kDa olduğu belirlenmiştir. Maksimum bakteriyosin üretiminin geç durma fazında (12.800 AU/mL) tespit edildiği belirlenmiştir (Yoon vd., 2005).

2.3.9. Enterosin HZ

Enterosin HZ, *E. faecium* HZ tarafından sentezlenen bir bakteriyosindir. Enterosin HZ papain ve tripsin enzimlerine karşı duyarlı ancak pepsin, lipaz, katalaz, α -amilaz, organik solventler, deterjanlar, β -merkaptenol ve ısı uygulamalarına (90 °C'de 30 dakika) karşı direçlidir. Enterosin HZ, pH 2.0-9.0 aralığında aktivite göstermektedir. Maksimum bakteriyosin üretimi orta ve geç logaritmik artış fazında gerçekleşmektedir. Moleküler ağırlığı yaklaşık 4.5 kDa olarak belirlenmiştir. Enterosin HZ *Lb. plantarum*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *L. monocytogenes*'e karşı aktivite göstermektedir (Yıldırım vd., 2014).

2.3.10. Enterosin EFS100

Enterosin EFS100, *E. faecalis* EFS100 suşu tarafından üretilen geniş etki spektrumuna sahip birçok Gram pozitif bakteriye karşı antimikrobiyal aktivite gösteren bir bakteriyosindir. Bakteriyosin üretimi pESF100 plazmiti üzerinde kodludur. Enterosin EFS100, 60 °C'de 60 dakika, 80 °C'de 40 dakika, 100 °C'de 30 dakika ve 121 °C'de 15 dakika ısı işlem uygulamasında aktivitesini korumaktadır. Ayrıca 4 °C'de 2 ay süreyle depolama sonrasında da bakteriyosin aktivitesi stabil kalmıştır. Enterosin EFS100, pH 5.0-8.5 aralığında aktifken alkali pH koşullarında hızla inaktive olmaktadır. Enterosin EFS100, α -kemotripsin ve pronaz E ile muamele edilmesi sonucu tamamen, tripsin ile muamele edilmesi sonucu ise kısmen aktivitesini kaybetmektedir. Katalaz, fisin, lizozim, pepsin A ve kloroform ile muamele edilmesi sonucu bakteriyosin aktivitesinde herhangi bir değişim meydana gelmemektedir. Bakteriyosin üretimi erken logaritmik fazda başlamakta ve erken

durma fazında maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Enterosin EFS100 *Corynebacterium diphtheriae*, *L. acidophilus*, *Micrococcus lysodiecticus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus equi*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus sanguis* gibi Gram-pozitif bakterilere ve *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* ve *Xanthomonas maltophila* gibi Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite göstermektedir (Ahmad vd., 2004).

2.3.11. Enterosin 1071

Enterosin 1071, domuz dışkılarından izole edilen *E. faecalis* BEF 1071 suşu tarafından üretilen iki bileşenli (1071A ve 1071B) bir bakteriyosindir. Enterosin 1071A ve 1071B'nin moleküler ağırlıkları sırasıyla 4.285 ve 3.899 kDa'dır. Bu peptitler 100 °C'de 60 dakika ısıtılma işlemi sonrası stabilitelerini korurken 121 °C'de 15 dakika ısıtılma işlemi sonrası aktivitesinin %50'sini kaybetmektedir. Enterosin 1071A ve 1071B genleri 50 kb büyüklüğündeki pEF1071 plazmiti üzerinde kodlanmaktadır. Enterosin 1071A ve 1071B α -kemotripsin, papain, pepsin, pronaz, proteinaz-K ve tripsin gibi proteolitik enzimlere karşı duyarlıdır. Ayrıca bu peptitler pH 3.0-12.0 aralığında aktivitelerini koruyabilmektedirler (Balla vd., 2000).

2.3.12. Enterosin LM-2

Enterosin LM-2, Moğolistan'ın geleneksel peyniri olan "Byaslag" dan izole edilen *E. faecium* LM-2 suşu tarafından üretilen bir bakteriyosindir. Trisin-SDS-PAGE analizi sonucu enterosin LM-2'nin 3.5 ve 6.4 kDa büyüklüğünde iki aktif protein bandı içerdiği belirlenmiştir. Enterosin LM-2 *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* ve *Candida* cinslerine karşı aktivite göstermektedir. Bakteriyosin üretiminin durağan fazda maksimuma ulaştığı ve geç durağan faz boyunca azaldığı tespit edilmiştir. Enterosin LM-2 pepsin, proteinaz-K, tripsin ve papain enzimleri ile muamele edildiği zaman aktivitesini kaybetmektedir. Diğer tarafta α -amilaz ve lizozim gibi enzimlere karşı dirençlidir. Isı stabil bir bakteriyosin olan enterosin LM-2, pH 2.0-12.0 arasında aktivite göstermektedir (Liu vd., 2011).

2.3.13. Enterosin L50

Enterosin L50, *E. faecium* L50 suşu tarafından üretilen iki bileşenli (L50A ve L50B) grup IIb üyesi bir bakteriyosindir (Cintas vd., 1998). Enterosin L50A ve L50B gıda zehirlenmesine neden olan *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *C. perfringens* ve *C. botulinum*'un yanı sıra ayrıca insan ve hayvanlarda enfeksiyona neden olan *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguis* ve *Streptococcus agalactiae* türlerine karşı da aktivite göstermektedir (Cintas vd., 2000). Enterosin L50 üretimi ve direncini determine eden genler 50 kb büyüklüğündeki pClZ2 plazmiti üzerinde bulunmaktadır (Basanta vd., 2008).

2.3.14. Enterosin KP

Enterosin KP, Tokat yöresine ait geleneksel beyaz peynirden izole edilen *E. faecalis* KP tarafından üretilmektedir. Enterosin KP, papain ve β -merkaptotetanole karşı duyarlı fakat tripsin, pepsin, lipaz, α -amilaz, organik çözücüler, deterjanlar ve EDTA'ya karşı dirençlidir. Enterosin KP, 90 °C'de 30 dakika süreyle ısıtılma işlemine dayanıklıdır. Ancak, 121 °C'de 15 dakika ısıtılma işlemine tabi tutulduğunda aktivitesini kaybetmektedir. Enterosin KP geniş pH (2.0-8.0) aralığında aktivitesini koruyabilmektedir. Uzun süreli depolama koşullarına dayanıklıdır. Moleküler ağırlığı yaklaşık 5.8 kDa'dır. Enterosin KP *L. monocytogenes* gibi Gram-pozitif bakterilere karşı etkilidir. Yapılan çalışmalarda enterosin KP'nin *L. monocytogenes*'e karşı bakterisidal etki gösterdiği belirlenmiştir (İşleroğlu vd., 2012).

2.3.15. Enterosin MC13

Enterosin MC13, bir tür kefal cinsi olan *Mugil cephalus*'un bağırsağından izole edilen *E. faecium* MC13 suşu tarafından üretilmektedir. Kütle spektrofotometrisi sonucu moleküler ağırlığı 2148 Da olarak bulunmuştur. Enterosin MC13, deniz ürünlerinde görülen patojenlerden *L. monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Vibrio vulnificus* türlerine karşı inhibitör aktivite göstermektedir. Enterosin MC13 tripsin, proteaz ve kemotripsin gibi proteolitik enzimlere karşı duyarlılık göstermekte iken katalaz ve lipaz gibi enzimlere karşı dirençlidir. Enterosin MC13 90 °C'de 20 dakika ısıtılma işlemine dirençlidir (Kumar vd., 2011).

2.3.16. Enterosin M

Enterosin M, *E. faecium* AL40 suşu tarafından üretilmektedir. Moleküler ağırlığı 4628 Da olarak bulunmuştur. Yapılan denemelerde enterosin M'nin *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *S. aureus*, *S. vitulinus*, *S. xylosus*, *S. chromogenes*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. gallinarum*, *S. capitis*, *Micrococcus luteus*, *L. pantarum*, *L. curvatus*, *L. sakei*, *Cornobacterium piscicola*, *B. cereus*, *L. innocua*, *L. monocytogenes* ve *E. coli*'ye karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Enterosin M, proteaz uygulaması sonucu aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Enterosin M'nin 60, 80 ve 100 °C'de 1 saat süreyle ısıtılma ve +4 ve -20 °C'de uzun süreli depolama uygulamasına dirençlidir. Enterosin M'nin N-uç bölgesinde 39 amino asit bulunmaktadır. Enterosin P ile yüksek oranda yapısal benzerlik göstermektedir. Enterosin M'nin N-uç bölgesindeki ilk 39 amino asit kalıntısı incelendiğinde 20. pozisyonda valin ve 35. pozisyonda lisin amino asiti bulunurken enterosin P'de bu pozisyonlarda triptofan amino asiti bulunmaktadır (Şekil 2.2) (Marekova vd., 2007).

Enterocin M A T R S Y G N G V Y C N N S K C W - N V G E A K E N I A G I V I S G
K A S G L
Enterocin P A T R S Y G N G V Y C N N S K C W V N W G E A K E N I A G I V I S G
W A S G L A G M G H

Şekil 2.2. Enterosin M ile enterosin P'nin amino asit sekanslarının karşılaştırılması (Marekova vd., 2007).

2.3.17. Enterosin RJ-11

Enterosin RJ-11, pirinç kepeğinden izole edilen *E. faecalis* RJ-11 suşu tarafından üretilen 5049 Da moleküler ağırlığına sahip 44 amino asitten oluşan bir bakteriyosindir. Enterosin RJ-11 üretiminin erken durma fazında maksimum seviyeye ulaştığı ve sonrasında düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Enterosin RJ-11'nin bakteriyosin aktivitesi, proteinaz-K ve proteaz tarafından tamamen elemine edilmiş ayrıca α -kemotripsin, tripsin ve pepsin enzimleri ile muamele sonucu bakteriyosin aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Papain enzimi ile muamele sonucu bakteriyosin aktivitesinde herhangi bir değişim tespit edilmemiştir. Enterosin RJ-11'in antimikrobiyal aktivitesi sıcaklık, asit ve alkali uygulamalarına karşı oldukça dirençlidir. Enterosin RJ-11, geleneksel Uzakdoğu fermente ürünü olan miso

üretiminde koji küf fermantasyonu aşamasında yaygın kontaminant olarak gözlenen *Bacillus subtilis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* türlerine karşı yüksek aktivite göstermektedir. Enterosin RJ-11, birçok LAB bakteriyosinleri gibi *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. enterica* seovar Typhimurium suşlarına karşı aktivite göstermemektedir. Enterosin RJ-11'in amino asit sekansı enterosin L50A (%75 oranında) ve L50B'nin amino asit sekansı ile yüksek oranda (Şekil 2.3) benzerlik göstermektedir (Yamamoto vd., 2003).

enterocin RJ-11	A	P	A	G	L	V	A	K	F	G	R	P	I	V	K	Y	Y	K	Q	I	M	Q	F	I	G	E	G	S	A	I	N	K	I	P	W	I	A	R	M	W	R	T	
enterocin L50A	M	G	A	I	A	K	L	V	A	K	F	G	W	P	I	V	K	Y	Y	K	Q	I	M	Q	F	I	G	E	G	W	A	I	N	K	I	E	W	I	K	K	H	I	
enterocin L50B	M	G	A	I	A	K	L	V	T	K	F	G	W	P	L	I	K	K	F	Y	K	Q	I	M	Q	F	I	G	Q	G	W	T	I	D	Q	I	E	K	W	L	K	R	H

Şekil 2.3. Enterosin RJ-11'in amino asit sekansının enterosin L50A ve L50B ile karşılaştırılması (Yamamoto vd., 2003).

2.3.18. Enterosin SE-K4

Enterosin SE-K4, çimen slajından izole edilen *E. faecalis* K-4 suşu tarafından üretilen antilisterial grup IIa üyesi bir bakteriyosindir. Yapılan denemelerde *E. faecalis* K-4 suşunun maksimum bakteriyosin üretimini eksponansiyel gelişme fazı boyunca 43-45 °C'de gerçekleştirdiği görülmüştür. Enterosin SE-K4 bakteriyosinin moleküler büyüklüğü kütle spektrometrisi ile 5356.2 Da olarak bulunmuştur. Enterosin SE-K4 *E. faecium*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *Clostridium beijerinckii* ve *L. monocytogenes*'e karşı antibakteriyel aktivite göstermektedir. Enterosin SE-K4 geniş pH aralığında stabilitesini koruyabilmektedir. Enterosin SE-K4, 60 °C'de 10 dakika, 80 °C'de 30 dakika ve 100 °C'de 60 dakika süreyle ısıtılma işlemi uygulaması sonrası stabilitesini koruyabilmektedir. Enterosin SE-K4'ün N-uç bölgesinde grup IIa bakteriyosinlerinin birçoğunda görülen YGNGV konsensus motifinin bulunmadığı belirlenmiştir. Ayrıca enterosin SE-K4'ün amino asit sekansı veri tabanındaki diğer grup IIa bakteriyosinlerinin amino asit sekansı ile karşılaştırıldığında bakteriyosin 31 ile benzer olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.4) (Eguchi vd., 2001).

	1	10	20	30	40
	.	.	.	.	.
Enterocin SE-K4	ATYYGNGVYCNKQKCWVDWSRARSEIIDRGVKAYVNGFTKVLG				
Bacteriocin 31	ATYYGNGLYCNKQKCWVDWNKASREIGKIIVNGWVQHGPWAPR				

Şekil 2.4. Enterosin SE-K4 ve bakteriyosin 31'in N-uç bölgesindeki ilk 43 amino asidin sekansının karşılaştırılması (Eguchi vd., 2001).

2.3.19. Enterosin P

Enterosin P, İspanyol kurutulmuş fermente sosisinden izole edilen *E. faecium* P13 tarafından üretilen bir bakteriyosindir. Enterosin P'nin *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. perfringens* ve *C. botulinum*'un da arasında yer aldığı çeşitli Gram-pozitif bakteriye karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Enterosin P ısıya dayanıklı (100 °C'de 60 dakika, 121 °C'de 25 dakika) bir bakteriyosindir. Enterosin P'nin aktivitesi pH 2.0-11.0 aralığında stabildir. Ayrıca liyofilizasyon, 4 ve -20 °C'de uzun süre depolama işlemleri bakteriyosin aktivitesi üzerinde olumsuz etki yapmamaktadır (Cintas vd., 1997).

2.3.20. Enterosin ON-157

Enterosin ON-157, *E. faecium* NIAI 157 suşu tarafından üretilen bir bakteriyosindir. Moleküler ağırlığı SDS-PAGE analizi sonucu yaklaşık olarak 2500 Da olarak bulunmuştur. Maksimum bakteriyosin üretimi logaritmik gelişme fazında görülmektedir. Enterosin ON-157 α -kemotripsin, pepsin ve α -amilaz enzimleri tarafından tamamen inaktive olurken pronaz, tripsin ve α -glukozidaz enzimlerine karşı direnç gösterebilmektedir. Enterosin ON-157 *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *Lb. sake* ve *L. monocytogenes* suşlarına karşı güçlü inhibitör aktivite göstermektedir. Bununla birlikte *L. mesenteroides*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* ve *Lb. plantarum* suşlarına karşı zayıf inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesi 30 °C'de pH 2.0-7.0'da 1 saat süreyle ısıtıl işlem uygulamasından sonra stabildir ancak 100 °C'de pH 6.0-7.0'da 30 dakika ısıtıl işlem uygulamasından sonra stabilitesini kaybetmektedir. Enterosin ON-157 üretimi 49.0 kb büyüklüğündeki pEN100 plazmiti tarafından kodlanmaktadır (Ohmomo vd., 2000).

2.3.21. Enterosin T

Enterosin T, brokoliden izole edilen *Enterococcus* sp. 812 suşu tarafından üretilen bir bakteriyosindir. Başta *L. monocytogenes* olmak üzere birçok Gram-pozitif bakteriye karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Enterosin T'nin otoklavlandıktan sonra aktivitesinin kısmen kayba uğradığı tespit edilmiştir. Enterosin T proteinaz K uygulaması ile aktivitesini kaybetmektedir. Enterosin T'nin moleküler ağırlığı yaklaşık 4521.3 Da'dur. N-uç bölgesinde YGNGV konsensüs serisi içermesinden dolayı enterosin T, Ila alt grubu bakteriyosinlerine dahil edilmiştir (Chen vd., 2013).

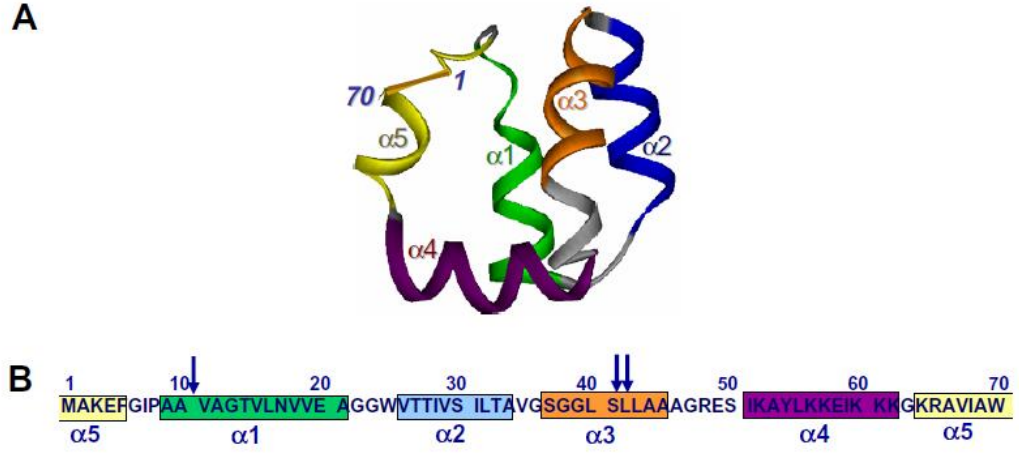
2.3.22. Enterosin TW21

Enterosin TW21, geleneksel Tayvan fermente siyah fasulyesi olan “Dochi” den izole edilen *E. faecium* D081821 suşu tarafından üretilen 48 amino asit kalıntısı içeren bir bakteriyosindir. Enterosin TW21 *L. monocytogenes*, *C. perfringens* ve *Sporolactobacillus kofuensis*'e karşı antibakteriyel aktivite göstermektedir. Moleküler büyüklüğü yaklaşık olarak 5300.6 Da'dur. N-uç bölgesinde grup Ila bakteriyosinlerinde görülen YGNGV konsensus motifi içermektedir. Yapılan analizler enterosin TW21 sentezinde 76 amino asit kalıntısı içeren öncü peptitin translasyon sonrası modifikasyona uğrayarak 48 amino asit kalıntısı içeren olgun peptide dönüştüğü belirlenmiştir. Amino asit sekans analizi sonucu enterosin TW21'in amino asit diziliminin enterosin SE-K4, hiracin JM79 ve durasin GL ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Chang vd., 2013).

2.3.23. Enterosin AS-48

Enterosin AS-48, *E. faecalis* S-48 tarafından sentezlenmektedir (Martinez vd., 1994). Geniş antibakteriyel spektrumlu, dairesel yapıda ve 70 amino asit kalıntısından oluşan bir bakteriyosindir. Enterosin AS-48 gup IV bakteriyosinleri sınıfına dahildir (Montalban-Lopez vd., 2008; Fernandez vd., 2008). Enterosin AS-48'in üç boyutlu yapısının tanımlanması için nükleer manyetik rezonans ve X-ray kırınım teknikleri ile yapılan analizler sonucu enterosin AS-48 konformasyonun beş

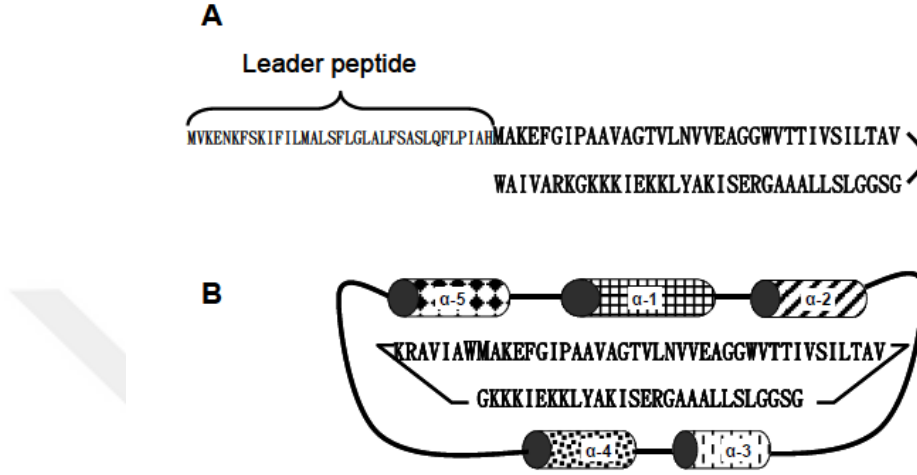
adet kompakt glabüler alfa heliks yapıdan meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. (A) Enterosin AS-48'in üç boyutlu heliks yapısı. (B) Enterosin AS-48'in amino asit sekansı (Montalban-Lopez vd., 2008).

Olgun peptidin moleküler ağırlığı 7.14 kDa'dur. (Burgos vd., 2014; Fernandez vd., 2008). Enterosin AS-48'in biyosentezi 68 kb büyüklüğündeki konjugatif pMB2 plazmiti tarafından kodlanmaktadır (Montalban-Lopez, vd., 2008; Burgos vd., 2014; Fernandez vd., 2008). Enterosin AS-48, Gram pozitif bakterilere karşı geniş bir inhibitör spektrumuna sahiptir. Ökaryotik hücreler enterosin AS-48'e karşı direnç göstermektedir. İçerdiği katyonik peptitler hücre membranından içeri geçerek ve hücre membranındaki geçirgenliği artırarak hücre ölümlerine sebep olmaktadır. Enterosin AS-48'in gıda sistemlerindeki etkinliği kimyasal koruyucular, esansiyel yağlar, fenolik bileşikler, yüksek yoğunluklu zorlamalı elektrik alan uygulaması, yüksek basınç uygulaması gibi fizikokimyasal işlemlerle büyük ölçüde artmaktadır. Enterosin AS-48 patojenik ve toksijenik bakterilerden *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica* ve bozucu etkiye sahip bakterilerden *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Geobacillusstearo thermophilus*, *Brochothrix thermosphacta*, *S. carnosus* ve *L. sakei* türlerine karşı aktivite göstermektedir. Enterosin AS-48'in kompozisyon analizleri sonucu yüksek oranda temel asidik amino asitleri, % 49 oranında hidrofobik amino asitleri (Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu ve Phe) ve yüksüz hidrofilik amino asitleri (Ser, Gly, Thr, ve Tyr) içerdiği görülmüştür. Bakteriyosinin yapısında modifiye amino asit ve disülfid köprüleri bulunmamaktadır. Bakteriyosin üretiminden sorumlu genetik

determinantların analizi sonucu enterosin AS-48'in yapısal genlerinin 35 amino asiti sinyal peptit olmak üzere 105 amino asitten oluşan öncü peptitten meydana geldiği belirlenmiştir. Enterosin AS-48'in kendine özgü yapısal özelliği N-uç bölgesindeki metiyonin (Met¹) ile C-uç bölgesindeki triptofanın (Trp⁷⁰) arasında bağlantı kurularak halkasal bir peptit oluşturmasıdır (Şekil 2.6) (Burgos vd., 2014).

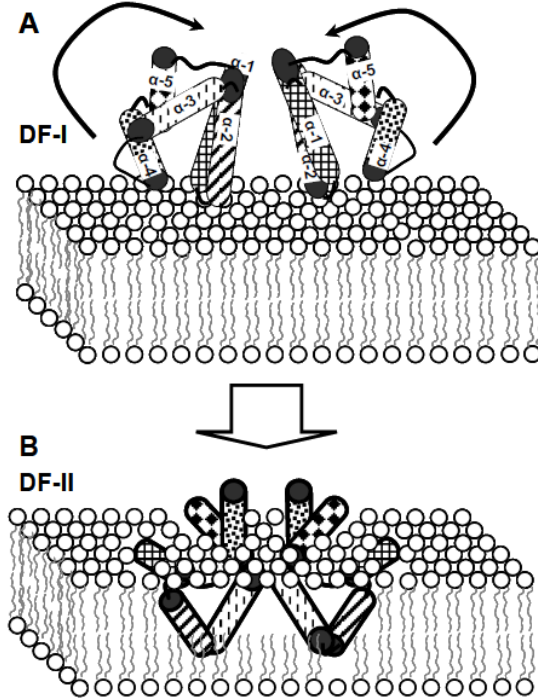


Şekil 2.6. (A) Enterosin AS-48'in yapısal gen üretiminin prosesi. (B) Peptidin baş kısmından uç kısmına doğru birleşip halkasal yapı oluşturması ve olgun halkasal enterosin AS-48 peptidinin α-heliks yapı olarak düzenlenmesi (Burgos vd., 2014).

Enterosin AS-48, halkasal olarak tanımlanan ilk bakteriyosindir. *Carnobacterium maltaromaticum* tarafından üretilen karnolisin A ve *Streptococcus uberis* tarafından üretilen uberolisin A, enterosin AS-48 ile düşük sekans benzerliği göstermesine rağmen yapısal olarak benzerlik göstermektedirler. Enterosin AS-48'in halkasal ve kompakt katlı molekül yapısı ekstrem pH, sıcaklık değerlerine ve denatüre edici ajanlara karşı büyük ölçüde stabilite kazandırarak gıda sistemlerindeki bakteriyosin uygulamaları için uygun olmasını sağlamaktadır. Enterosin AS-48 tripsin ve pepsin gibi sindirim enzimleri ile muamele edilmesi sonucu inaktifte olmaktadır. Karboksipeptidaz ve aminopeptidazlara karşı ise direnç göstermektedir (Burgos vd., 2014).

Enterosin AS-48'in değişen fizyokimyasal şartlara göre farklı oligomerik (iki veya daha fazla polipeptit zincirini bir arada bulunduran çok alt birimli protein yapı) yapılar oluşturarak adapte olduğu gözlenmiştir. Enterosin AS-48 molekülü pH 3'ün

altındaki değerlerde monomerik formda, pH 4.5-8.5 değerleri arasında ise dimerik formda bulunduğu belirlenmiştir. Kristaldeki enterosin AS-48 molekülü ya hidrofobik interaksiyonlarla (dimerik form 1) ya da hidrofilik interaksiyonlarla (dimerik form 2) bağlanarak molekül çiftleri olarak zincirde yer alırlar. Dimerik form 1’de bulunan moleküller hidrofobik α -heliks-1 ve α -heliks-2 ile etkileşime girerken diğer yandan hidrofilik α -heliks-4 ve α -heliks-5 dimerik form-2 ile etkileşime girmektedir. Enterosin AS-48, bakteriyal sitoplazmada yaklaşık 0.7 nm çapında porlar oluşturarak proton itici gücün bozulmasına ve böylece hedef hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. Aynı zamanda kristal molekülün hedef bakterilere karşı gösterdiği ikincil bakteriolitik etki mekanizması ise: iki farklı membran yüzeyinde bulunan dimerik form-1 ve dimerik form-2 molekülerinin molekül yerleşimlerinin değişimi ile sağlanmaktadır. Bu geçiş ile dimerik form-1’de bulunan her bir promotorun 90° rotasyon yaparak gizli hidrofobik α -heliks-1 ve α -heliks-2 moleküllerinin kısmi olarak ulaşılabilir hale geçmesine ve böylece AS-48 molekülünün bakteriyal membran içine nüfuz edebilmesini sağlamaktadır (Şekil 2.7) (Burgos vd., 2009; Burgos vd., 2014).



Şekil 2.7. (A) Enterosin AS-48’in suda çözünebilir dimerik form-1 bölümünden geçiş mekanizması (B) dimerik form-2 bölümünde görülen membran bağlantısı (Burgos vd., 2014).

2.3.24. Enterosin W

İki peptitli bir lantobiyotik olarak tanımlanan ve karakterize edilen enterosin W, geleneksel Thai fermente balığı olan “Pla-ra” dan izole edilen *E. faecalis* NKR-4-1 suşu tarafından üretilmektedir. Enterosin W’yi oluşturan W α ve W β olarak adlandırılan peptitler hedef hücre membranına bağlanıp sinerjik etki göstermektedir. Enterosin W, bakteriyosin ile hücre membranı arasında bağ oluşturarak membranda por oluşumunu sağlayan, lipit II gibi bağlayıcı moleküller olmadan da işlevini yerine getirebildiği gözlenmiştir. W α ve W β alt ünitelerinin moleküler büyüklükleri sırasıyla 3256.5 ve 2728.6 Da olarak belirlenmiştir. Ayrıca W α alt ünitesinin 21, W β alt ünitesinin ise 18 amino asit kalıntısı içerdiği tespit edilmiştir. Enterosin W yapısal olarak plantarisin W ile benzerlik göstermektedir. Enterosin W’nin alt üniteleri, plantarisin W α ve W β (% 63.3 ve % 44.7) ile amino asit dizilimi bakımından büyük oranda benzerlik göstermektedir (Sawa vd., 2012).

2.3.25. Enterosin X

Enterosin X, *E. faecium* KU-B5 suşu tarafından sentezlenen iki peptitden (X α ve X β) oluşan grup IIB üyesi bir bakteriyosindir. X α ve X β alt üniteleri birlikte sinerjik antimikrobiyal aktivite göstermektedir. X α ve X β ünitelerinin moleküler ağırlıkları sırasıyla 4420.1 ve 4068.5 Da’dur. X α ve X β , sırasıyla *enxA* ve *enxB* genleri tarafından kodlanmaktadır. *enxA* ve *enxB* genleri altı açık okuma kalıbı (ORF) içermektedirler. *orfX1*, *orfX2* ve *orfX3* genlerinin fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. *enxB* geninin ise enterosin X bakteriyosini için bağışıklık proteinlerini kodladığı düşünülmektedir (Hu vd., 2010).

2.3.26. Enterosin Q

Enterosin Q, *E. faecium* L50 suşu tarafından sentezlenmektedir. Kütle spektrofotometrisi analizi sonucu enterosin Q’nun moleküler büyüklüğü 3980 Da olarak bulunmuştur. Enterosin Q’nun amino asit sekansı enterosin L50A ve enterosin L50B ile benzerlik göstermektedir. Enterosin Q, N-uç bölgesinde lider sekansı ya da sinyal peptiti olmadan sentezlenebilmektedir (Cintas vd., 2000). Enterosin Q, grup

IIc (Siklik bakteriyosinler) bakteriyosinleri sınıfına dahildir. Enterosin Q, birada bozulmaya sebep olan LAB'ne karşı aktivite göstermektedir (Basanta vd., 2008).

2.3.27. Enterosin 96

Enterosin 96, yumuşak peynirden izole edilen *E. faecalis* WHE 96 suşu tarafından üretilen antilisterial özelliğe sahip grup II bakteriyosinlerindendir. Enterosin 96, Gram-pozitif bakterilere karşı Gram-negatif bakterilere karşı gösterdiği aktiviteye kıyasla daha güçlü bir etki spektrumuna sahiptir. Enterosin 96'nın özellikle *E. faecalis* olmak üzere birçok *Enterococcus* türlerine karşı güçlü aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda enterosin 96'nın *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gibi Gram-pozitif patojenlere karşı da aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *E. coli* ve *S. enterica* seovar. Typhimurium gibi Gram-negatif patojenlere karşı ise zayıf aktivite göstermektedir. Enterosin 96'nın moleküler büyüklüğü yaklaşık 5494 Da olarak hesaplanmıştır. *E. faecalis* WHE 96 suşunda enterosin 96 üretimi pTEF2 plazmiti üzerinde kodlanmaktadır (Izquierdo vd., 2009).

2.3.28. Enterosin 416K1

Enterosin 416K1, *E. casseliflavus* IM 416K1 suşu tarafından üretilen protein doğasında, ısı stabil, düşük moleküler ağırlığa sahip grup Ila bakteriyosinlerindendir. Moleküler büyüklüğü yaklaşık 5 kDa olarak bulunmuştur. Bakteriyosin 90 °C'de 120 dakika ısı işlem sonrasında ve 4 °C'de 6 ay süreyle depolama süresince aktivitesini koruyabilmektedir. Enterosin 416K1 diğer grup Ila bakteriyosinleri gibi dar bir spektrum aktivitesine sahiptir ve antisterial özelliktedir. Bakteriyosin üretimi ve bağışıklık genlerinin 34 MDa büyüklüğünde bir plazmit tarafından kodlandığı tespit edilmiştir (Sabia vd., 2002).

2.3.29. Bakteriyosin ST5Ha

Bakteriyosin ST5Ha, Norveç dumanlanmış somon etinden izole edilen *E. faecium* ST5Ha suşu tarafından üretilen pediosin benzeri bir bakteriyosindir. Bakteriyosin ST5Ha bazı LAB, *Listeria* spp., bazı insan patojenlerine ve HSV-1 virüsüne karşı antimikrobiyel aktivite göstermektedir. Bakteriyosinin moleküler ağırlığı yaklaşık

4.5 kDa olarak belirlenmiştir. Ayrıca bakteriyosinin önemli gıda kaynaklı patojenlerden birisi olan *L. monocytogenes*'e karşı biyoaktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bakteriyosin ST5Ha'nın soya fasulyesinden izole edilen *E. mundtii* ST4SA tarafından üretilen muntisin ST4SA, zeytinden izole edilen *E. faecium* ST311LD suşu tarafından üretilen bakteriyosin ST311LD gibi enterosinlerle benzer yapısal özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Lipaz ve α -amilaz bakteriyosin aktivitesi üzerine bir etki göstermezken, proteinaz K ve α -kemotripsin antimikrobiyal aktivitesinde tamamen inaktivasyona neden olmaktadır (Todorov vd., 2010).

2.3.30. Bakteriyosin ST15

Bakteriyosin ST15, soya fasulyesinden izole edilen *E. mundtii* ST15 suşu tarafından üretilen 3944 Da moleküler ağırlığa sahip bir bakteriyosindir. Bakteriyosin ST15, *L. sakei*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *Propionibacterium* spp., *Clostridium tyrobutyricum*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* ve *Streptococcus caprinus* suşlarına karşı inhibitör aktivite göstermektedir. Bakteriyosin aktivitesinde proteinaz-K, pronaz, pepsin, proteaz ve triton X-114 uygulamaları inaktivasyon meydana getirirken katalaz, α -amilaz, triton X-100, SDS, tween 20, tween 80, üre ve EDTA uygulamaları herhangi bir inaktivasyona neden olmamaktadır. Bakteriyosin ST15, pH 2.0-12.0 arasında aktivite göstermektedir. Bakteriyosin 100 °C'de 90 dakika ısıtılma dirençli iken, 121 °C'de 20 dakika ısıtılma sonrası tamamen aktivitesini kaybetmektedir. Bakteriyosin ST15, *E. mundtii* tarafından üretilen muntisin ATO6 ve muntisin KS bakteriyosinleri ile kıyaslandığında bakteriyosin ST15 hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı inhibitör aktivite gösterirken, muntisin ATO6 ve muntisin KS bakteriyosinleri sadece Gram-pozitif bakterilere karşı aktivite gösterdiği bildirilmiştir (De Kwaadsteniet vd., 2005).

2.3.31. Bakteriyosin T8

Bakteriyosin T8, *E. faecium* T8 suşu tarafından sentezlenen grup IIa üyesi dar aktivite spektrumuna sahip bir bakteriyosindir. Bakteriyosin T8 üretimini kodlayan genler 7 kb büyüklüğündeki T8 plazmiti üzerinde kodludur. Bakteriyosin T8, *L. monocytogenes*, *E. hirae* ve *E. faecalis*'e karşı inhibitör aktivite göstermektedir.

Moleküler ağırlığı 5.1 kDa'dur. Isı stabil (100 °C'de 60 dakika) olan bakteriyosin pH 4.0-10.0 arasında aktivite göstermektedir. Pepsin, pronaz ve proteinaz-K enzimleriyle muamele edildiğinde inaktivasyon meydana gelirken amilaz enzimine karşı dirençlidir. Bakteriyosin T8, grup Ila bakteriyosinlerinde görülen tipik YGNGX₂CX₄CXV motifini içermektedir. Amino asit dizilimi açısından bakteriyosin T8, bakteriyosin 31 ile % 69 ve enterosin P ile % 47 oranlarında benzerlik göstermektedir (De Kwaadsteniet vd., 2006).

2.3.32. Bakteriyosin GM-1

Bakteriyosin GM-1 *E. faecium* GM-1 suşu tarafından üretilen geniş etki spektrumuna sahip bir bakteriyosindir. Bakteriyosin GM-1 *S. aureus*, *E. coli*, *Vibrio* spp., *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *L. acidophilus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarına karşı antibakteriyel aktivite göstermektedir. Proteolitik enzim uygulamaları sonucu bakteriyosin GM-1'in aktivitesinde azalma meydana gelmektedir. Yapılan PZR analizleri sonucu bakteriyosin GM-1 genleri enterosin P genleriyle benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesi 100 °C'de 20 dakika süreyle ısıtıl işlem sonrasında ve nötral pH da stabildir. Bakteriyosin üretimi için pH 6.0-6.5 ve 35-40 °C'nin optimum koşullar olduğu belirlenmiştir (Kang ve Lee, 2005).

2.3.33. Enterosin 62-6

Enterosin 62-6, *E. faecium* 62-6 suşu tarafından üretilen pH ve ısı stabil, katyonik, hidrofobik, iki peptitten oluşan ribozomal olarak sentezlenen bir bakteriyosindir. Enterosin 62-6 pepsin ve α -kemotripsin gibi proteolitik enzimlere karşı duyarlı, lizozim ve lipaz enzimlerine karşı dirençlidir. Enterosin 62-6A ve enterosin 62-6B peptitleri sırasıyla 44 ve 43 amino asitten oluşmaktadır. Kütle spektrometrisi analizleri sonucu enterosin 62-6A ve 62-6B peptitlerinin moleküler büyüklükleri sırasıyla 5206 ve 5219 $\pm$ 1 Da olarak belirlenmiştir. Enterosin 62-6 grup IIc bakteriyosinlerindendir. Enterosin 62-6'nın aktivitesi, pH 4.0-8.0 aralığında stabildir. Enterosin 62-6, bazı laktobasil, streptokok, enterokok, karnobakter ve *E. coli* ATCC 4157, *Citrobacter freundii* PI 239, *Proteus mirabilis* ATCC 7002 ve *P. auruginosa* ATCC 10145 suşlarına karşı inhibitör aktivite göstermektedir. Enterosin 62-6,

enterosin L50 ve enterosin I bakteriyosinleriyle yapısal olarak benzerlikler içermektedir (Dezwaan vd., 2007).

2.4. Bakteriyosinlerin Gıda Muhafazasında Kullanımı

İnsanların sağlıklı büyümeleri ve gelişmeleri için tükettikleri gıdaların güvenilir olması oldukça önemlidir. Her geçen gün tüketici talebine bağlı olarak tüketime hazır, işlem görmüş ve uzun raf ömrüne sahip yeni gıdalar geliştirilmektedir. Bilinen temel gıda kaynaklarından üretilen bu gıdaların birçoğunun fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve muhafaza sürelerinin uzatılması için çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Ancak bu katkı maddelerinin kullanım oranına bağlı olarak kanserojenik ve toksik etki yapabilmeleri, doğal ve güvenilir katkıların elde edilmesi ve kullanımını oldukça önemli hale getirmiştir (De Martinis vd., 2002). LAB'nin organik asit, diasetil, asetoin, hidrojen peroksit, reuterin, antifungal peptitler ve bakteriyosinler gibi çok çeşitli antimikrobiyal bileşikler üretebilme yeteneğine sahip olmalarından dolayı son 15 yıldır gıda koruyucusu olarak canlı kültür veya metabolitlerinin preparat halinde kullanılması oldukça yaygındır (Holzapfel vd., 1995; Magnusson ve Schnürer, 2001). Fermente gıdalardan izole edilen LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin birçoğunun protein yapısında olmaları, gıdanın yapısında doğal olarak bulunabilmeleri, genel olarak GRAS statüsünde bulunmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları, toksik olmamaları, genellikle farklı pH ve sıcaklık değerlerine karşı aktivitelerinin stabil kalması, gıda kökenli patojen mikroorganizmalara ve gıda fermentasyonunda istenmeyen mikroorganizmalara karşı geniş etki spektrumlarının olmaları, peptit ve protein yapısında olmalarından (pankreas tarafından sentezlenen proteolitik enzimler ve mide salgıları tarafından sindirilebilinmeleri) dolayı biyokoruyucu olarak gıdalarda kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle LAB veya metabolitleri kimyasal koruyuculara alternatif olarak kullanılabilinmektedir (de Vusyt ve Vandamme, 1994; Delves-Broughton vd., 1996; Riley, 1998; de Martinis vd., 2002; Galvez vd., 2007).

Bakteriyosinlerin gıdalardaki kullanımları, direkt olarak gıdanın formülasyonuna eklenerek, gıdayı bakteriyosin çözeltisine daldırarak ve bakteriyosin üreticisi suşlar inoküle edilerek yapılmaktadır. Bu suşların gıdada gelişmesiyle hedeflenen patojeni inhibe eden bakteriyosin üretilmektedir (Okereke ve Montville, 1991).

Sosislerdeki laktik fermentasyon boyunca predominant olarak bulunan psikrotrofik türler *L. sakei* ve *L. curvatus*'dur (Hugas vd., 1993). LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, et fermentasyonunun erken safhasında *L. monocytogenes* sayısını azalttığı bilinmektedir (Foegeding vd., 1992; Hugas vd., 1995). Yapılan çalışmalarda Güney Yunanistan'daki geleneksel fermente sucuklarda *L. plantarum* ve *L. sakei* türlerini baskın olarak bulan araştırmacılar *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktivite gösteren 3 laktik asit bakteri suşunu tespit etmişlerdir (Drosinos vd., 2007). Özellikle grup IIa bakteriyosinleri arasında yer alan pediosin PA1 ve AcH'in taze ve fermente etlerde *L. monocytogenes* kontaminasyonunu engellemek için kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca yapılan araştırmalarda bu bakteriyosinlerin veya üretici suşlarının modifiye atmosfer paketlenme yöntemi ile kombine kullanımlarının oldukça etkili olduğu gözlemlenmiştir (Deegan vd., 2006).

Yapılan çalışmalarda fermente havuçlardan nisin benzeri bileşikler üreten *L. lactis* suşları izole edilmiş ve bir başka araştırmacı tarafından da fermente havuç ve salatalarda bakteriyosin üreticisi olan *L. lactis* izolatu bulunduğu bildirilmiştir (Vescovo vd., 1996).

Laktisin 3147 kaşar peynirlerinde bulunan *L. monocytogenes* üzerine etkisi araştırılmış ve başlangıçta 10^4 kob/mL olarak belirlenen *Listeria* miktarının 4 °C' de 5 günde % 99.9 oranında azaldığı bildirilmiştir (Deegan vd., 2006). Yapılan başka bir araştırmada ise laktisin 3147'nin kaşar peynirlerinde starter kültür olarak kullanılmayan LAB sayısını yaklaşık olarak 100 kat azalttığını göstermiştir (Ross vd., 2002).

Nisin gıda endüstrisinde biyokimyasal ve genetik açıdan en fazla çalışılan bakteriyosindir (Serdaroğlu ve Sapancı-Özsümer, 2000). Nisin, 1953 yılından beri Nisaplin (Applin & Barret Ltd., UK) ticari adıyla hazır preparat olarak piyasada satılmaktadır (Delves-Broughton, 2005). Yasal olarak 45' den fazla ülkede nisinin katkı maddesi olarak kullanımına izin verilmektedir. Nisin, laktik asit bakterisi olan *Lactococcus lactis* tarafından modifiye edilmiş sütün fermentasyonu ile oluşan, polipeptit yapıda, antimikrobiyal bir maddedir. Nisin asidik özellik gösterir. pH 3.0-7.0 arasında ısıya daha dayanıklıdır. Gram (+) bakterilerin bir kısmına ve bazı spor yapan bakterilere etkili olmasına karşın, Gram (-) bakteriler, küf ve mayalara etkili

değildir. Nisin, *Stapylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* ve sporlu bakterilerden *Clostridium* ve *Bacillus* cinslerine karşı etkilidir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998). Yapılan çalışmalarda nisinin; konserve gıdalarda *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinin ve sporlarının, sığırlarda görülen mastitis etmeni patojenlerin ve hazır salatalarda 7 °C’ de saklama koşullarında *L. monocytogenes* gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir (Broadbent vd., 1989; Cai vd., 1997; Ryan vd., 2002). Salata sosları, bira şarap, elma suyu gibi ısıt işlem uygulanmayan gıdalarda nisin kullanılarak istenmeyen LAB’lerinin gelişimi engellenmektedir (Delves-Broughton, 2005). Yine yapılan bir başka çalışmada nisinin *Helicobacter pylori*’nin gelişmesini ve kolonizasyonunu engelleyerek ülser tedavi edici özelliği olduğu belirlenmiştir (Gillor vd., 2005). Yapılan bir diğer çalışmada ise bakteriyosin olan nisinin asitle pıhtılaşmış peynirlerde *S. aureus*’ u ve yarı sert peynirlerde *C. tyrobutyricum*’u inhibe ettiği görülmüştür (Seçkin ve Baladura, 2010).

Nisinin gıdaların korunmasında uygulanan kullanım şekillerinden birisi de gıda yüzeyine uygulanan filmlerde kullanımıdır. Bu tür antimikrobiyal biyofilmler, temas ettikleri gıda yüzeyinde mikrobiyal gelişimi etkileyebilmektedir. Nisin kullanıldığı biyofilmlerden gıda yüzeyine belli oranlarda geçerek, yüzeyde mikrobiyal gelişimi engelleyebilmektedir. Nisin, protein yapısındaki biyofilmlerin polimer yapısına doğrudan katılarak veya polietilen materyallerin polimer yapısının yüzeyine adsorblanarak kullanılabildiği gibi, farklı şekillerde de kullanılabilmektedir (Kumar ve Anand, 1998).

Nisinin etkisini arttırmak için koruyucu katkıların yanı sıra yüksek basınç ve yüksek voltaj elektrik alan pulslarının (PEF) uygulanması önemli katkı sağlanmıştır. Örneğin 100 IU/mL nisinle birlikte 155-400 MPa uygulamasının *E. coli*, *S. Enteridis*, *S. Typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas fluorescens* ve *S. aureus*’ u inaktive ettiği saptanmıştır (Masschalck vd., 2001).

İçerik veya katkı olarak bakteriyosinlerin uygun ve düşük maliyetli gıdada büyük çapta üretimi için yeni metotlara gerek duyulmaktadır. Örneğin laktisin 3147 ve enterosin AS-48 süt ürünleri içereği olarak peynir altı suyunun bulunduğu ortamda üretilmektedir. Gıda biyokoruması yanında bakteriyosinler peynire hücre içi

enzimlerin salınımı teşvik ederek peynir olgunlaşmasını hızlandırır (Seçkin ve Baladura, 2010).

Pediosinler, *Pediococcus* türleri tarafından üretilen bakteriyosinlerdir. Pediosin AcH ve pediosin PAC1.0 pediokoklarlar tarafından üretilenen en fazla çalışılan bakteriyosinlerdir. Bu bakteriyosinler *L. monocytogenes*'e karşı inhibe edici özellik gösterir. Pediosin PA-1 Gram pozitif LAB'ne karşı geniş bir etki alanına sahiptir. *P. acidilactici* tarafından üretilen bazı bakteriyosinler vejetatif hücreleri inhibe etmekte, sporları yok etmekte ve bozulmayı önlemektedir. Pediosinler gıda kaynaklı güvenilir bakteriyosinler olup soğukta muhafaza edilen vakum paketli sığır etinin raf ömrünü uzatmak ve patojen mikroorganizma riskini ortadan kaldırmak için kullanılabilirler. Pediosinler bu tip etlerdeki *Lactobacil* ve *Leuconostoc* cinsleri ile *Brochotrix thermosphacta* gibi psikotrofik fakültatif anaerobların gelişimini engellemektedirler (Ray vd., 1989). *P. acidilactici* tarafından üretilen bir bakteriyosin olan pediosin L50'nin birçok Gram (+) saprofit mikroorganizmaya ve *L. monocytogenes*'i inaktive ettiği belirlenmiştir. Isıya dayanıklı olması nedeniyle pastörize et ürünlerinde de aktivite göstermektedir. Çok geniş pH aralıklarında etkili olmaktadır. Bu özelliği nedeniyle nötral ve alkali pH' larda dayanıklı olmayan nisinden farklılık göstermektedir (Cintas vd., 1995).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

Tez kapsamında kullanılan bozadan izole edilen *E. faecium* YT52 izolatu Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Bakteriyel Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. YT52 izolatının antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi için Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Bakteriyel Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonu ve Prof. Dr. Ingolf F. Nes'den (Department of Genetics and Biochemistry, Agricultural University of Norway, Ås/ Norveç) temin edilen toplam 26 adet indikatör bakteri (*Bacillus cereus* ATCC 10876, *B. cereus* LMG 2732, *Enterococcus faecalis* LMG 2602, *E. faecalis* LMG 2708, *Escherichia coli* LMG 3083, *E. coli* ATCC 25828, *Lactobacillus plantarum* LMG 2003, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LMG 2132, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 2907, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 2908, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 2910, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 2911, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 2912, *L. lactis* subsp. *lactis* JC17, *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363, *Listeria innocua* LMG 2813, *L. monocytogenes* ATCC 15813, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *Pediococcus pentosaceus* LMG 2001, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium LMG 3085, *S. enterica* serotype Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* FRI100 ve *S. carnosus* LMG 2709) kullanılmıştır.

Bakteriler; de Man, Rogosa & Sharpe Broth (MRS, Lab M, Ltd., Bury, Lancashire, İngiltere), M17 Broth (Merck, Darmstadt, Almanya) besiyeri ortamına % 5 glukoz ilave edilerek hazırlanan GM17 broth ve Triptone Soy Broth (TSB, Lab M) besiyeri ortamına % 5 maya ekstraktı (Merck) ilave edilerek hazırlanan TSBYE ortamlarında kültüre edilmişlerdir. Stok kültürler % 20 oranında gliserol (Riedel-de Haën, Seelze, Almanya) ilave edilerek -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

3.2. Yöntem

3.2.1. YT52 izolatının antibakteriyel aktivite spektrumunun belirlenmesi

YT52 izolatının antibakteriyel aktivite spektrumu van Belkum vd. (1989), tarafından önerilen yönteme göre belirlenmiştir. YT52 izolatı GM17 broth ortamında 37 °C'de 18 saat geliştirilmiştir. Süre sonunda GM17 agara öze ile sürme yapılmış ve Petri kutusu koloni oluşumu için 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan koloniler steril kürdan aracılığı ile GM17 agar bulunan Petri kutularına nokta ekim yapılarak transfer edilmiş ve 37 °C'de 18 saat inkübe edilmişlerdir. MRS, GM17 veya TSBYE ortamlarında 18 saat inkübe edilerek geliştirilen indikatör bakterilerden 100 µL alınmış ve %0.5 (w/v) oranında agar içeren 5 mL yumuşak agar (MRS, GM17 veya TSBYE) ortamlarına inoküle edilmiştir. Tüp karıştırıcıda homojen hale getirilen bu ortamlar daha sonra YT52 kolonileri üzerine yayılmıştır. Petri kutuları indikatör bakterilerin gelişmesi için uygun inkübasyon sıcaklığında 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, YT52 suşunun indikatör bakterilere karşı verdiği inhibisyon zonları incelenmiştir.

3.2.2. Proteolitik enzim uygulaması

YT52 izolatı tarafından üretilen antibakteriyel maddenin protein yapısında olup olmadığı (bakteriyosin) proteolitik enzim uygulaması ile belirlenmiştir. GM17 broth ortamında 37 °C'de 18 saat süre ile inkübe edilerek aktifleştirilen YT52 izolatı 10000 devirde 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) edilmiştir. Kültür üst sıvısı 0.45 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Almanya) geçirilerek sterilize edilmiştir. Steril kültür üst sıvısından 20 µL alınarak GM17 agara damlatılmış ve bunun yaklaşık 1 cm uzağına enzim konsatrasyonu 50 mg/mL olacak şekilde hazırlanan pepsin (pH 3.0), proteinaz K (pH 7.0), α- kemotripsin (pH 7.0), tripsin (pH 7.0) ve katalaz (pH 7.0) enzim solüsyonundan 20 µL damlatılmıştır. Aktarılan sıvıların agara nüfuz etmesi için Petri kutuları oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda Petri kutuları 100 µL *L. monocytogenes* ATCC 15813 inoküle edilmiş TSBYE yumuşak agar ile kaplanmış ve 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan zon yapıları incelenmiştir (Ryan vd., 1996).

3.2.3. Bakteriyosin üreticisi YT52 izolatının fenotipik olarak tanısı

3.2.3.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi

Bakteriyosin üreticisi YT52 izolatının mikroskopik morfolojisi, GM17 broth besiyerinde 37 °C’de 18 saat süreyle geliştirilen sıvı kültürünün Gram boyama yöntemine göre hazırlanan preparatının 1000 x büyütme ile ışık mikroskopunda (Zeiss, Almanya) incelenmesi sonucu belirlenmiştir. Katalaz testi için, GM17 agar (Merck) ortamında geliştirilen YT52 izolatı kolonisi lam üzerine aktarılmış ve bir damla % 3’lük hidrojen peroksit çözeltisi ilave edilerek gaz çıkışı olup olmadığı gözlemlenmiştir. Katalaz testinde *S. aureus* ATCC 29213 suşu pozitif kontrol, *E. faecalis* LMG 2708 suşu ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.3.2. Elliker broth ortamında gelişme

YT52 izolatının Elliker broth besiyerinde 10, 37 ve 45 °C’de gelişme özelliklerinin yanı sıra % 6.5 (w/v) NaCl içeren ve pH’sı 9.6’ya ayarlanan iki farklı Elliker broth besiyerinde de 37 °C’de gelişme özellikleri araştırılmıştır.

Elliker broth

Tripton	20	g
Maya ekstraktı	5	g
Jelatin	2.5	g
Glukoz	5	g
Laktoz	5	g
Sakkaroz	5	g
Sodyum klorür	4	g
Sodyum asetat	1.5	g
Askorbik asit	0.5	g
Destile su	1000	mL

Elliker broth besiyeri ortamının sterilizasyondan önce pH’sı 6.8 ± 0.02 ’e ayarlanmış ve 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.2.3.3. YT52 izolatının API 50 CH karbonhidrat testi ile fenotipik tanısı

YT52 izolatının API test kiti ile fenotipik tanısı, API 50 CH karbonhidrat stripleri ve API 50 CHL karbonhidrat fermentasyon besiyeri (Biomerieux, Marcy-l'Etoile, Fransa) kullanılarak üretici firma tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır.

3.2.4. YT52 izolatının genotipik tanısı

3. 2. 4. 1. Genomik DNA izolasyonu

YT52 izolatından genomik DNA izolasyonu Cancilla vd. (1992), tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. Bir gecelik aktif YT52 kültüründen 0.5 mL alınarak steril Eppendorf tüpüne aktarılmış ve 10000 devirde 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) edilerek hücre peletinin oluşması sağlanmıştır. Daha sonra üst faz dökülüp, pelet 0.5 mL liziz çözeltisi ile çözülmüş ve su banyosu içerisinde 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüplere 30 µL sodyum dodesil sülfat (SDS, % 10 w/v) ilave edilmiş ve 80 °C'ye ayarlı ikinci bir su banyosunda 5 dakika daha tutulmuştur. Lize olan hücre süspansiyonu üzerine 0.7 mL fenolkloroform (1:10) karışımı ilave edilerek 13000 devirde 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) işlemi uygulanmıştır. Üst faz yeni steril Eppendorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 0.7 mL 2-propanol ilave edilmiş ve birkez daha 13000 devirde 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) edilmiştir. Genomik DNA peleti 50 µL Tris-EDTA (pH 8.0) çözeltisi ilave edilerek çözülmüş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Liziz Çözeltisi

NaCl	250	mM
EDTA	10	mM
Tris HCl	10	mM
Lizozim	100	mg
Destile su	50	mL
pH 8.0 ± 0.02		

SDS (%10)

SDS	10	g
Destile su	100	mL

Tris-EDTA

Tris	0.121	g
EDTA	0.037	g
Destile su	100	mL

pH 8.0 ± 0.02

3.2.4.2. Genomik DNA örneğinin elektroforezi

Genomik DNA örneğinin elektroforezi % 0.7 (w/v) oranında agaroz içeren toplam 35 mL jelde yapılmıştır. Agaroz, tris-asetat tampon (pH 8.0) içerisinde mikrodalga fırında (Arçelik MD 565 S, Türkiye) çözülmüştür. Oda sıcaklığında soğutulan jel, yatay elektroforez plakasına (Thermo Minicell® Primo EC320, Amerika Birleşik Devletleri) dökülmüş ve polimerize olması için 30-45 dakika beklenmiştir. Jelin polimerizasyonunu takiben tarak jele zarar vermeden ortamdan uzaklaştırılmış ve jelin üzerini kapatacak miktarda tris-asetat tampon çözeltisi elektroforez tankına dökülmüştür. 12 µL genomik DNA örneğine 2 µL marker boya çözeltisi ilave edilmiş ve daha sonra hazırlanan bu örneğin tamamı jel kuyucuğuna aktarılmıştır. Elektroforez işlemi 65 voltta 1.5-2 saat süreyle yapılmıştır. Süre sonunda elektrik akımı kesilmiş ve jel ortamdan alınarak etidyum bromit (0.2 µg/mL) içeren elektroforez tamponunda 30 dakika süreyle boyanmıştır. Boyama işleminin sonunda jel ultraviyole ışık altında incelenmiştir. Jelin fotoğrafı UviTec DBT-08 (Cambridge, İngiltere) jel görüntüleme sistemiyle çekilmiştir.

Tris-Asetat Tampon (1X)

Tris	4.84	g
Sodyum asetat	4.08	g
EDTA	0.37	g
Destile su	1000	mL

pH 8.0 ± 0.02

Marker Boya

Brom fenol blue	0.25	g
Sakkaroz	40	g
Destile su	100	mL

3.2.4.3. YT52 izolatının 16S rDNA bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve sekans analizi

Bakteriyosin üreticisi olduğu tespit edilen YT52 izolatında 16S rDNA bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması toplam 50 µL PZR karışımı (Çizelge 3.1) kullanılarak Techne TC3000 (Cambridge, İngiltere) termal döngü cihazında yapılmıştır. PZR işleminde; 1 döngü 94 °C’de 120 saniye başlangıç denatürasyonu, 30 döngü 94 °C’de 30 saniye / 55 °C’de 60 saniye / 72 °C’de 90 saniye çoğaltma ve 1 döngü 72 °C’de 10 dakika son uzama aşamalarından oluşan PZR protokolü uygulanmıştır. 16S rDNA bölgesinin çoğaltılmasında pA (ileri) 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve pE' (geri) 5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3' genel bakteriyel primerler kullanılmıştır (Edwards vd., 1989). 16S rDNA PZR fragmentlerinin elektroforezi Thermo Minicell®Primo EC320 cihazında % 1 agaroz oranı ile hazırlanan jelde yapılmış ve fragmentin büyüklüğü O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Fermentas #SM1153, Litvanya) kullanılarak hesaplanmıştır. PZR ürününün DNA dizi analizi ABI PRISM 3730XL (Perkin Elmer, Amerika Birleşik Devletleri) otomatik gen sekans cihazı kullanılarak REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. (Ankara, Türkiye)’inde yaptırılmıştır. 16S rDNA dizi benzerliği National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST programı kullanılarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan PZR karışımı

Madde adı	Hacim
PCR master mix (Fermentas #K0171, Litvanya)	25 µL
İleri primer	1 µL
Geri primer	1 µL
Kalıp DNA	3 µL
Nükleaz içermeyen H ₂ O	20 µL
Toplam hacim	50 µL

3.2.5. YT52 suşunun plazmit içeriğinin belirlenmesi

3.2.5.1. Plazmit DNA izolasyonu

GM17 broth ortamında 37 °C’de 18 saat geliştirilen YT52 kültüründen, 10 mL GM17 broth ortamına 1 mL inokülasyon yapılmış ve 30 °C’de 3-3.5 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda santrifüj tüpüne aktarılan bakteri kültürü, 6000 devirde 15 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12141, Almanya) edilmiştir. Üst faz dökülmüş ve hücre peleti oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra hücre peleti 379 µL sakkaroz tamponunda çözülmüştür. Su banyosunda 37 °C’ye kadar ısıtılan ortama 96.5 µL lizozim ilave edilmiş ve su banyosunda 37 °C’de 5 dakika tutulmuştur. Süre sonunda tüpe sırasıyla 48.2 µL Tris-EDTA-1 ve 27.6 µL % 20 SDS ilave edilmiş, karıştırılmış ve 37 °C’de 10 dakika su banyosunda tutulmuştur. Süre sonunda tüp mekanik karıştırıcıda, 30 saniye yüksek devirde karıştırılmıştır. Ortama yeni hazırlanmış 3 N NaOH çözeltisinden 27.6 µL ilave edilmiş ve 10 dakika yavaşça karıştırılarak kromozomal DNA’nın alkali denatürasyonu sağlanmıştır. Denatürasyon işleminden sonra santrifüj tüpüne 49.6 µL Tris-HCl çözltisi ilave edilerek 3 dakika boyunca karıştırılmıştır. Tüpe 4 °C’de muhafaza edilen 5 M NaCl çözeltisinden 71.7 µL ve % 3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 700 µL ilave edilerek 4 °C’de 15000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) işlemi uygulanmıştır. Oluşan üst faz, mikropipet yardımıyla yeni Eppendorf tüpüne aktarılmış ve deproteinasyonun sağlanması için 700 µL kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisi ilave edilmiştir. Tüp 4 °C’de 15000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) edilmiş, oluşan üst faz yeni tüpe alınarak üzerine eşdeğer hacimde soğuk etil alkol ilave edilmiş ve -20 °C’de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra tüp 15000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) edilerek plazmit DNA çöktürülmüş ve sıvı faz dökülerek pelet kurutulmuştur. Kurutulmuş pelet 20 µL Tris-EDTA-2 içerisinde çözülmüş ve 2 µL RNaz A çözeltisinden ilave edilerek 37 °C’ye ayarlı su banyosunda 45-50 dakika tutulmuştur (Anderson ve McKay, 1983).

Sakkaroz Çözeltisi

Tris	0.655	g
EDTA	0.0372	g
Sakkaroz	6.7	g
Destile su	100	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Lizozim Çözeltisi

Tris	0.3	g
Lizozim	0.1	g
Destile su	10	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Tris-EDTA-1

Tris	0.6	g
EDTA	9.31	g
Destile su	100	mL
pH 8.0 ± 0.02		

SDS Çözeltisi

Tris	0.6	g
EDTA	0.74	g
SDS	20	g
Destile su	100	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Tris-HCl

Tris-HCl	31.52	g
Destile su	100	mL
pH 7.0 ± 0.02		

Tris-EDTA-2

Tris	0.121 g
EDTA	0.037 g
Destile su	100 mL
pH 7.5 ± 0.02	

% 3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinin hazırlanışı: 100 g fenol üzerine 20 mL destile su ve 3 g NaCl ilave edilerek 45 °C'deki su banyosunda çözülmüştür. Fenol çözeltisi alüminyum folyo sarılmış şişe içerisinde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

RNaz A çözeltisi: 5 mL destile su içerisinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat çözeltisinin pH'sı asetik asit ile 5.0'a ayarlanmış ve üzerine 5 mg RNaz A ilave edilmiştir. Kaynar su içerisinde ortam 5 dakika tutulduktan sonra -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5.2. Plazmit DNA örneklerinin elektroforezi

Plazmit DNA örneklerinin elektroforezi % 0.7 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan toplam 35 mL jelde yapılmıştır (Meyers vd., 1976). RNaz A ile muamele edilen plazmit DNA örneklerine 2 µL marker boya çözeltisi ilave edilmiş ve mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına aktarılmıştır. Elektroforez işlemi Thermo OWL EASYCAST B2 (Amerika Birleşik Devletleri) yatay elektroforez sisteminde tris-asetat elektroforez tamponu eşliğinde 85 voltta 1.5-2.0 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda jel etidyum bromit çözeltisinde boyanmış ve jel fotoğraflarının çekiminde UviTec DBT-08 (Cambridge, İngiltere) jel görüntüleme sistemi kullanılmıştır.

3.2.5.3. Plazmit büyüklüğünün hesaplanması

YT52 suşundan izole edilen plazmitin büyüklüğünün belirlenmesinde, moleküler büyüklükleri bilinen cccDNA marker fragmentlerinin elektroforetik hareketleri ile, büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkiden yararlanılmıştır (Macrina vd., 1978; Southern, 1979; Schaffer ve Sederoff, 1981). Excel programı

yardımı ile marker cccDNA moleküllerinin agaroz jel fotoğrafı üzerinde ölçülen göç aralıkları ile bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak eğri çıkarılmıştır. Jel için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek, YT52 suşundan izole edilen plazmitin moleküler büyüklüğü hesaplanmıştır (Campbell, 1974; Elder ve Southern, 1983; Elder vd., 1983).

3.2.6. pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

3.2.6.1. pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

37 °C'de 18 saat süreyle geliştirilen *E. faecium* YT52 suşu 6000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edilmiş (Sigma 2-16P, Rotor No: 12141, Almanya) ve kültür üst sıvısının pH'sı 6 N NaOH veya 6 N HCl kullanılarak 2.0-11.0 değerleri arasında ayarlanmıştır. pH ayarlaması yapılan kültür üst sıvıları 0.45 µm por çaplı membran filtrelerden (Sartorius, Almanya) geçirilerek sterilize edilmiş ve +4 °C'de 24 saat bekletilmiştir. pH değişimlerinin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi, membran filtreden geçirildikten sonra hiçbir işleme tabi tutulmayan kültür üst sıvısının inhibisyon aktivitesi ile farklı pH değerlerine ayarlanan kültür üst sıvılarının inhibisyon aktivitelerinin karşılaştırılması sonucu belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesi üzerindeki değişimler kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Denemelerde *L. monocytogenes* ATCC 15813 suşu indikatör bakteri olarak kullanılmıştır. Kültür üst sıvıları kuyucuklara 10 µL olacak şekilde damlatılmıştır. Bakteriyosin aktivitesi, aşağıdaki formül kullanılarak arbitrary ünite (AU) cinsinden hesaplanmıştır. D değeri inkübasyon süresi sonunda indikatör bakterinin gelişiminin engellendiği en yüksek dilüsyon oranını göstermektedir (Franz vd., 1997).

$$\text{Bakteriyosin aktivitesi (AU/mL)} = 1000 \times 10^{-1} \times D^{-1} \quad (3.1)$$

3.2.6.2. Enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için nötralize edilmiş kültür üst sıvılarına, son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak

şekilde proteinaz-K (pH 7.0), tripsin (pH 7.0), α -kemotripsin (pH 7.0), pepsin (pH 3.0), α -amilaz (pH 7.0), lipaz (pH 7.0), katalaz (pH 7.0) ve lizozim (pH 7.0) ilave edilmiştir. Enzim ilavesini takiben tüpler 37 °C’de 2 saat inkübasyona bırakılmış ve daha sonra enzim aktiviteleri 100 °C’de 5 dakika ısıtma işlemi ile sonlandırılmıştır. Kontrol olarak enzim ilave edilmemiş kültür üst sıvısı kullanılmıştır. Farklı enzim uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi, kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak formül 3.1’e göre hesaplanmıştır (Franz vd., 1997).

3.2.6.3. Sıcaklık uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Sıcaklık uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi nötralize edilmiş kültür üst sıvılarının 100 °C’de 5, 10, 15, 20 dakika ve 121 °C’de 15 dakika ısıtma işlemi tabi tutulması ile test edilmiştir. Kontrol olarak ısıtma işlemi uygulanmamış kültür üst sıvısı kullanılmıştır. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi, kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak formül 3.1’e göre hesaplanmıştır (Franz vd., 1997).

3.2.7. Bakteriyosin yapısal genlerinin PZR ile çoğaltılması

E. faecium YT52 suşunda enterosin A (*entA*), enterosin B (*entB*), enterosin P (*entP*), enterosin L50A/B (*entL50A-entL50B*), bakteriosin 31 (*bac31*), enterosin AS48 (*entAS48*), enterosin 1071A/B (*ent1071A/ent1071B*), enterosin Q (*entQ*) ve enterosin X (*entX*) yapısal genlerinin varlığı PZR ile araştırılmıştır. YT52 suşunda enterosin yapısal genlerinin PZR ile araştırılmasında kullanılan primerler, bağlanma sıcaklıkları ve ürün büyüklükleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. PZR işlemi çizelge 3.1’de verilen toplam 50 µL PZR karışımı kullanılarak Techne TC3000 (Cambridge, İngiltere) termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. PZR işleminde, 1 döngü 94 °C’de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 35 döngü 94 °C’de 1 dakika / uygun bağlanma sıcaklığında 1 dakika / 72 °C’de 40 saniye çoğaltma ve 1 döngü 72 °C’de 10 dakika son uzama aşamalarını içeren protokol kullanılmıştır (Yousif vd., 2005). Çoğaltılan PZR fragmentlerinin elektroforezi O’GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Fermentas #SM1153, Litvanya) kullanılarak % 2 agaroz oranı ile hazırlanan jelde yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Enterosin genlerinin tespitinde kullanılan PZR primerleri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün büyüklükleri

Gen	Primer sekansları (5'-3')	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>entA</i>	f: AATATTATGGAAATGGAGTGTAT r: GCACTTCCCTGGAATTGCTCT	56	126
<i>entB</i>	f: GAAAATGATCACAGAATGCCTA r: GTTGCATTTAGAGTATACATTTG	50	162
<i>entP</i>	f: TATGGTAATGGTGTATTATTGTAAT r: ATGTCCCATACTGCCAAAC	50	120
<i>entL50A/B</i>	f: TGGGAGCAATCGCAAATTAG r: ATTGCCATCCTTCTCCAAT	52	98
<i>bac31</i>	f: TATTACGGAAATGGTTTATATGT r: TCTAGGAGCCCAAGGGCC	50	123
<i>entAS48</i>	f: GAGGAGTTTCATGATTAAAGA r: CATATTGTTAAATTACCAAGCAA	50	340
<i>entQ</i>	f: TGAATTTTCTTCTTAAAAATGGTATCGCA r: TTAACAAGAAATTTTTTCCATGGCAA	56	105
<i>ent1071A/B</i>	f: CCTATTGGGGGAGAGTCGGT r: ATACATTCTTCCACTTATTTTT	51	343
<i>entX</i>	f: GTTTCTGTAAAAGAGATGAAAC r: CCTCTTAATCATTAACCATAC	50	500

3.2.8. Bakteriyosin üretimi

Bakteriyosin üretimi için aktif *E. faecium* YT52 kültüründen 100 mL GM17 broth ortamına % 1 oranında ekim yapılmış ve 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan kültürden birer saat arayla 10 saat boyunca aseptik koşullarda örnek alınmış ve bakteriyosin üretim miktarı ölçülmüştür. Bakteriyosin üretim miktarı kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak *L. monocytogenes* ATCC 15813’a karşı belirlenmiştir (Todorov ve Dicks, 2005)

3.2.9. Hücre lizizi

Hücre liziz çalışması için 50 mL aktif *E. faecium* YT52 kültürü 6000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12141, Almanya) edilmiştir. Kültür üst sıvısının pH’sı 6.0’a ayarlanmış ve 0.45 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Almanya) geçirilerek sterilize edilmiştir. Steril kültür üst sıvısından 20 mL alınarak erken gelişme fazına kadar geliştirilen 100 mL *L. monocytogenes* ATCC 15813 kültürüne ilave edilmiştir. Bakteriyosin ilavesi yapılan ve yapılmayan *L. monocytogenes* ATCC 15813 kültürlerinin optik yoğunluğu (OD), Shimadzu UV-1600-V (Japonya) spektrofotometre cihazında 1 cm ışık yoluna sahip küvetler kullanılarak 600 nm dalga boyunda birer saat aralıklarla 10 saat ölçülmüştür (Todorov ve Dicks, 2005).

3.2.10. Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması

E. faecium YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin kısmi saflaştırılması için YT52 suşu 100 mL GM17 broth ortamında 37 °C’de 18 saat süreyle kültüre edilmiştir. Kültür 15000 devirde 20 dakika süreyle santrifüj (Sigma 3K 30, Rotor No: 12155, Almanya) edilmiş ve kültür üst sıvısının pH’sı 1 N NaOH kullanılarak 6.5’e ayarlanmıştır. Kültür üst sıvısına son konsantrasyon oranı % 40 (w/v) olacak şekilde yavaş yavaş amonyum sülfat (Merck) ilave edilmiş ve eriyinceye kadar karıştırılmıştır. Amonyum sülfat ilavesi yapılan kültür üst sıvısı santrifüj tüplerine aktararak +4 °C’de bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler +4 °C’de 15000 devirde 30 dakika boyunca santrifüj (Sigma 3K 30, Rotor No: 12155, Almanya) edilmiştir. İşlem sonunda üst faz dökülmüş ve çökelti

oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan çökelti 5 mL sodyum fosfat tampon (pH 7.0) içerisinde çözülmüş ve üzerine 75 mL metanol/kloroform (1:2 v/v) çözeltisi ilave edilerek +4 °C’de 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra örnekler +4 °C’de 15000 devirde 45 dakika santrifüj (Sigma 3K 30, Rotor No: 12155, Almanya) edilmiş, üst faz dökülmüş ve çökelti kurutulmuştur. Son aşamada kurutulan çökelti 1 mL steril ultra saf suda çözülmüş ve -20 °C’de muhafaza edilmiştir (Moreno vd., 2003).

Sodyum Fosfat Tampon

NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0.55	g
Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	1.61	g
Destile su	100	mL
pH 7.0 ± 0.02		

3.2.11. Trisin-sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (Trisin-SDS-PAGE)

Trisin-SDS-PAGE denemeleri Schagger ve von Jagow (1987) tarafından önerilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. Dikey jel elektroforez sistemimde (Thermo OWL P81, Amerika Birleşik Devletleri), iki adet 10x10 cm ebatlarında cam plaka kullanılmıştır. Elektroforez plakaları % 70’lik etanol çözeltisi ile yıkanıp kurutulduktan sonra, plakalar arasına jel tarağının yerleştiği üst kısım hariç 0.8 mm kalınlığında ayırıcılar konulmuştur. Bu aşamadan sonra jel tarağının 0.5 cm altına gelecek şekilde % 16.5’lik ayırıcı jel dökülmüş ve üzerine 1 mL destile su ilave edilmiştir. Jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklenmiş ve destile su filtre kağıdı aracılığıyla ortamdan alınmıştır. Plakaların geri kalan kısmı % 9.8’lik toplayıcı jel dökülerek tamamlanmış ve tarak yerleştirilmiştir. Toplayıcı jelin polimerizasyonu için 45 dakika daha bekledikten sonra cam plakalar elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Süre sonunda tarak çıkarılmış ve tank haznelerine tris-trisin-SDS tampon ilave edilmiştir. Son aşamada, 10 µL bakteriyosin örneği örnek tamponu ile muamele edilmiş jel kuyucuklarına aktarılmıştır. Jel sisteminde, toplayıcı jel için 30 volt ve ayırıcı jel için ise 90 volt elektrik akımı uygulanmıştır. Bakteriyosin örneklerinin elektroforetik ayrımının tamamlanmasının ardından jel, 2 ayrı parçaya ayrılmıştır. Jellerden biri Commasie brilliant blue R250 boya çözeltisine alınarak, burada 1 saat boyanmıştır. Boyanan jel, fazla boyanın geri alındığı çözeltide protein bantları netlik kazanıncaya kadar (30-60 dakika) bekletilmiş ve fiksasyon

özeltisi (%10'luk asetik asit) içine alınmıştır. Boyanmamış jel parçası aktif protein bandının tespiti için kullanılmıştır.

Akrilamid/Bis-akrilamid özeltisi

Akrilamid	30	g
Bis-akrilamid	0.8	g
Destile su	100	mL

Whatman No. 1 ile filtre edilen çözeltinin bulunduğu erlenmayer, alüminyum folyo ile kaplanarak +4°C'de tutulmuştur.

Tris.Cl/SDS, pH 8.45

Tris	182	g
SDS	1.5	g
Destile su	500	mL

pH 8.45 $\pm$ 0.02'ye ayarlanıp +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Tris.Cl/SDS, pH 8.45

Tris	6.05	g
SDS	0.4	g
Destile su	100	mL

pH 6.8 $\pm$ 0.02' ye ayarlanıp +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Örnek Tamponu

Tris.Cl/SDS, pH 6.8	2	mL
Gliserol	2.4	mL
SDS	0.8	g
Dithiothreitol	0.31	g
Commasie brilliant blue R250	2	g
Destile su	10	mL

APS (% 10)

Amonyum persülfat	0.1	g
Destile su	1	mL

Ayırıcı Jel

Akrilamid/Bis-akrilamid	8.75	mL
Tris.Cl/SDS, pH 8.45	5	mL
Gliserol	1.58	mL
Destile su	165	μ L

Dökmeden önce, 100 μ L % 10 amonyum persülfat ve 20 μ L tetrametil etilen diamin (TEMED) ilave edilmiştir.

Toplayıcı Jel

Akrilamid/ Bis-akrilamid	1.66	mL
Tris.ClSDS, pH 8.45	1.55	mL
Destile su	2.22	mL

Dökmeden hemen önce, 25 μ L % 10 amonyum persülfat ve 5 μ L TEMED ilave edilmiştir.

Tris-Trisin-SDS Tampon (1X)

Tris	12.11	g
Trisin	17.92	g
SDS	1	g
Destile su	1000	mL

pH 8.3 ± 0.02 'ye ayarlanıp +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Commasie Brilliant Blue Boya Çözeltisi

Commasie brilliant blue R250	1	g
Metanol	400	mL
Glasiyel asetik asit	100	mL
Destile su	500	mL

Boya Geri Alma Çözeltisi

Metanol	400	mL
Glasiyel asetik asit	100	mL
Destile su	500	mL

Jel Fiksasyon Cözeltisi

Glasiyel asetik asit	100	mL
Destile su	900	mL

3.2.11.1. Bakteriyosinin moleküler büyüklüğünün hesaplanması

Beyaz ışık kaynağı üzerine yerleştirilerek alınan jel fotoğrafında *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin moleküler büyüklüğü; 42, 26, 17, 10, 4.6 ve 1.7 kDa büyüklüğünde proteinleri içeren marker karışımı (Fermentas #SM1153, Litvanya) kullanılarak hesaplanmıştır. Excel programında her bir marker proteinin moleküler büyüklüğünün logaritması y eksenini, hesaplanan R_f değeri x eksenini oluşturacak şekilde grafiğe geçirilmiş ve program aracılığı ile grafiğe ait eğrinin matematiksel ifadesi elde edilmiştir. Büyüklüğü hesaplanmak istenen proteinin R_f değeri, jel fotoğrafı üzerinde ölçülmüş ve formülde yerine konularak, Excel programında moleküler büyüklüğü hesaplanmıştır (Laemmli 1970).

$$R_f = \text{proteinin kat ettiği mesafe} / \text{boyanın kat ettiği mesafe} \quad (3.2)$$

3.2.11.2. Aktif protein bandının tespiti

Aktif protein bandının belirlenmesinde kullanılan boyanmamış jel parçası indikatör mikroorganizmanın gelişimini inhibe edebilecek kimyasallardan arındırılmak için aseptik koşullarda steril ultra saf su ile 3 saat süreyle yıkanmıştır. Birer saat aralıklarla jelin yıkandığı steril ultra saf su değiştirilmiştir. Yıkanan jel, besiyeri ile jel arasında hiç boşluk kalmayacak şekilde TSBYE içeren Petri kutusuna (Ø 14 cm) yerleştirilmiştir. Daha sonra jel yüzeyi *L. monocytogenes* ATCC 15813 inoküle edilmiş 20 mL TSBYE yumuşak agar ile kaplanmış ve 37 °C'de 18 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda jel üzerinde oluşan inhibisyon zonu incelenmiştir (Tuncer ve Özden, 2010).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. YT52 İzolatının Antibakteriyel Aktivite Spektrumunun Belirlenmesi

van Belkum vd. (1989), tarafından önerilen yöntem kullanılarak yapılan *E. faecium* YT52 izolatının antibakteriyel aktivite test sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. YT52 izolatının indikatör bakterilere karşı oluşturduğu zon çapları.

İndikatör Suşlar	Sıcaklık (°C)	Besiyeri*	YT52** (Ø mm)
<i>L. plantarum</i> LMG 2003	37	MRS	20
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	30	GM17	14
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2907	30	GM17	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2908	30	GM17	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2910	30	GM17	10
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2911	30	GM17	11
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2912	30	GM17	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JC17	30	GM17	18
<i>L. cremoris</i> LMG 2132	30	GM17	2
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 2088	30	GM17	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 1363	30	GM17	20
<i>E. faecalis</i> LMG 2708	37	GM17	19
<i>E. faecalis</i> LMG 2602	37	GM17	19
<i>L. innocua</i> LMG 2813	30	TSBYE	16
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15813	37	TSBYE	23
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	37	TSBYE	23
<i>E. coli</i> LMG 3083 CFAI (ETEC)	37	TSBYE	-
<i>E. coli</i> ATCC 25828	37	TSBYE	-
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	37	TSBYE	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	37	TSBYE	-
<i>S. aureus</i> FRI100	37	TSBYE	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	37	TSBYE	-
<i>S. carnosus</i> LMG 2709	37	TSBYE	-
<i>P. pentosaceus</i> LMG 2001	37	TSBYE	21
<i>B. cereus</i> LMG 2732	37	TSBYE	18
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	37	TSBYE	-

*MRS: de Man, Rogosa & Sharpe Broth; GM17: Glukoz M17 Broth (% 5 glukoz); TSBYE: Tryptik Soy Broth (% 5 maya ekstraktı)

**YT52: *Enterococcus faecium* YT52

Antibakteriyel aktivite belirleme testi sonucu, YT52 izolatının çeşitli LAB’nin yanı sıra önemli gıda patojenlerinden olan *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus*’a karşı da antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. YT52 izolatı tarafından

Üretilen antibakteriyel maddeden en çok etkilenen indikatör bakterilerin 23 mm zon çapı ile *L. monocytogenes* ATCC 15813 (ekil 4.1) ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suları olduğu belirlenmiştir. YT52 izolatının denemelerde indikatör olarak kullanılan Gram-negatif bakterilere karşı aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Geçmiş yıllarda yapılan alımalar, LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin genellikle Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite göstermediğini rapor etmişlerdir (De Vuyst and Vandamme, 1994; Koral ve Tuncer, 2013; zden Tuncer vd., 2013). Tez alıması kapsamında antibakteriyel aktivite testlerinden elde edilen sonuçlar bu literatür verilerini destekler niteliktedir.



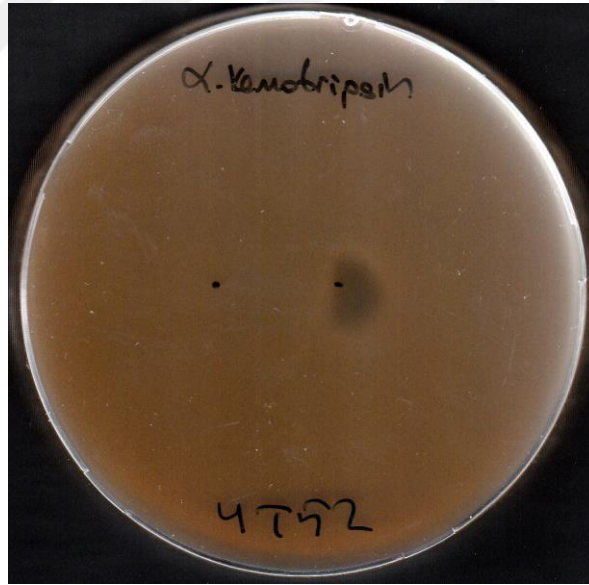
Şekil 4.1. YT52 izolatının *L. monocytogenes* ATCC 15813 suuna karşı verdiği inhibisyon zonu.

Bakteriyosin reticisi suların belirlenmesinde ilk aşama, indikatör bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşturan suların seçilmesidir. Üretici suların seçiminde farklı araştırmacılar tarafından önerilmiş doğrudan ve dolaylı pekçok yöntem bulunmaktadır (Gratia, 1946; Kkessy ve Piguet, 1970; Tagg ve McGiven, 1971; Tagg vd., 1976; Geis vd., 1983; van Belkum vd., 1989). Bu yöntemlerin ortak amacı, bakteriyosin üretim özellikleri araştırılan suların indikatör bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşturulup oluturmadığının tespit edilmesidir. Doğrudan yöntemler ile antimikrobiyel aktivite testlerinde bakterinin kendi kullanılırken, dolaylı yöntemlerde ise bakterinin süpernatantı kullanılmaktadır. Uygulanan yönteme göre kuyucuk veya koloni etrafında berrak ve keskin hatlı inhibisyon zonunun gözlenmesi test edilen

bakterinin bakteriyosin üreticisi olduğuna dair güçlü bir kanıt olarak değerlendirilmektedir (De Vuyst ve Vandamme, 1994; Degaan vd., 2006; Koral, 2011). Tez kapsamında antibakteriyel aktivitesi test edilen YT52 izolatının çeşitli indikatör bakterilere karşı berrak ve keskin hatlı inhibisyon zonu oluşturması üretilen antibakteriyel maddenin kuvvetle muhtemel bakteriyosin olduğunun kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

4.2. Proteolitik Enzim Uygulaması

Çeşitli indikatör bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilen YT52 izolatı tarafından üretilen antibakteriyel maddenin protein doğası (bakteriyosin olup olmadığı) yapılan proteolitik enzim denemeleri ile belirlenmiştir. İndikatör bakteri olarak *L. monocytogenes* ATCC 15813 suşunun kullanıldığı proteolitik enzim denemeleri sonucu, YT52 izolatı tarafından üretilen antibakteriyel maddenin katalaz uygulamasından etkilenmediği ancak proteinaz K, pepsin, α -kemotripsin (Şekil 4.2) ve tripsin uygulamalarından etkilendiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. YT52 izolatı tarafından üretilen antibakteriyel maddenin α -kemotripsin uygulaması sonucu kalan aktivitesi.

YT52 izolatı tarafından üretilen antibakteriyel maddenin katalaz enziminden etkilenmemesi antibakteriyel aktivitenin H_2O_2 kaynaklı olmadığını göstermektedir. Bakteriyosinlerin tümünde antibakteriyel etkinlik ana protein yapıdan

kaynaklanmaktadır. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin tripsin, α -kemotripsin, pepsin ve proteinaz-K gibi proteolitik enzimler ile muamele edilmeleri sonucu aktivitelerini ya tamamen ya da kısmen kaybettiklerini ortaya koymuştur (van Belkum vd., 1989; Piard vd., 1990; Dieye vd., 2001; Tuncer ve Akçelik, 2007; Özden ve Akçelik, 2008; Tuncer, 2009; Tuncer ve Özden, 2010; Koral ve Tuncer, 2013; Favaro vd., 2014; Iranmanesh vd., 2015; Gupta vd., 2016). Proteolitik enzim uygulaması sonucu inhibitör maddenin etkisinin tamamen veya kısmen ortadan kalkması üretilen antibakteriyel maddenin bakteriyosin olduğunu işaret etmektedir. YT52 izolatu tarafından üretilen antibakteriyel maddenin proteinaz K, pepsin, α -kemotripsin ve tripsin uygulamalarından etkilenmesi YT52 izolatu tarafından üretilen antibakteriyel maddenin bakteriyosin olduğunun güçlü kanıtı olarak kabul edilmiştir.

4.3. YT52 İzolatının Fenotipik ve Genotipik Tanısı

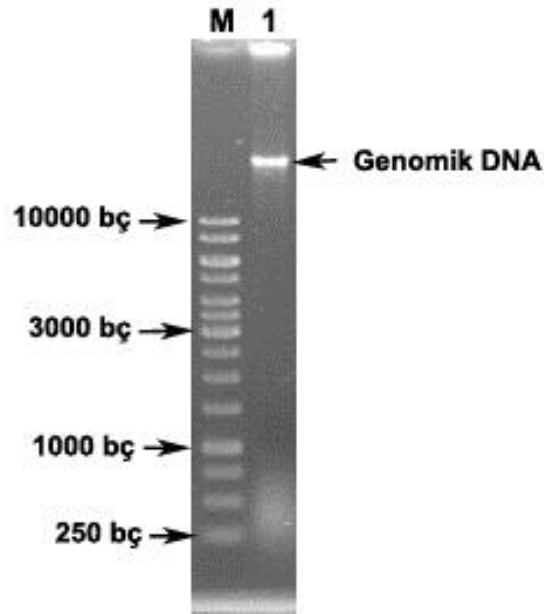
Proteolitik enzim uygulaması ile bakteriyosin üreticisi olduğu tespit edilen YT52 izolatının tür düzeyinde tanısı fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Morfolojik tanı ve katalaz testi sonucu YT52 izolatının Gram pozitif kok morfolojisinde (tekli, ikili ve kısa zincir) ve katalaz negatif özellikte olduğu tespit edilmiştir. Elliker broth besiyeri kullanılarak yapılan kültürel testlerde YT52 izolatının 10, 37 ve 45 °C'de gelişme göstermesinin yanı sıra % 6.5 (w/v) NaCl içeren ve pH'sı 9.6'ya ayarlanan iki farklı Elliker broth besiyerinde de geliştiği belirlenmiştir. YT52 izolatının karbonhidrat fermentasyon testi API 50 CH (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Fransa) kiti kullanılarak üretici firma tarafından önerilen yöntemle göre yapılmıştır. YT52 izolatının karbonhidrat fermentasyon test sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. YT52 izolatının fermentasyon kitinde test edilen 49 karbonhidratdan 21 adedini (gliserol, L-arabinoz, riboz, galaktoz, fruktoz, glukoz, mannoz, mannitol, N-asetil-glukozamin, amigdalin, arbutin, eskulin, salisin, sellobioz, maltoz, laktoz, sukroz, trihaloz, gentiobioz, tagatoz ve glukonat) fermente ettiği ancak 28 karbonhidratı ise fermente edemediği tespit edilmiştir. Bakteriyosin üreticisi YT52 izolatının API 50 CH karbonhidrat fermentasyon profilinin üretici firma veri bankası ile kıyaslanması sonucu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 ile % 98.9 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. YT52 izolatının API 50 CH karbonhidrat fermentasyon test sonuçları.

Karbonhidrat	YT52	Karbonhidrat	YT52
0 Kontrol*	-	25 Eskulin	+
1 Gliserol	+	26 Salisin	+
2 Eritritol	-	27 Sellobioz	+
3 D-Arabinoz	-	28 Maltoz	+
4 L-Arabinoz	+	29 Laktoz	+
5 Riboz	+	30 Melibioz	-
6 D-Ksiloz		31 Sukroz	+
7 L-Ksiloz	-	32 Trihaloz	+
8 Adonitol	-	33 Inulin	-
9 β -Metil-D-Ksilozid	-	34 Melezitoz	-
10 Galaktoz	+	35 Rafinoz	-
11 Glukoz	+	36 Nişasta	-
12 Fruktoz	+	37 Glikogen	-
13 Mannoz	+	38 Ksilitol	-
14 Sorboz	-	39 Gentiobioz	+
15 Ramnoz	-	40 D-Turanoz	-
16 Dulsitol	-	41 D-Lyxoz	-
17 Inositol	-	42 D-Tagatoz	+
18 Mannitol	+	43 D-Fukoz	-
19 Sorbitol	-	44 L-Fukoz	-
20 α -Metil-D-Mannozid	-	45 D-Arabitol	-
21 α -Metil-D-Glukozid	-	46 L-Arabitol	-
22 N-Asetil-Glukozamin	+	47 Glukonat	+
23 Amigdalın	+	48 2-Keto-Glukonat	-
24 Arbutin	+	49 5-Keto-Glukonat	-

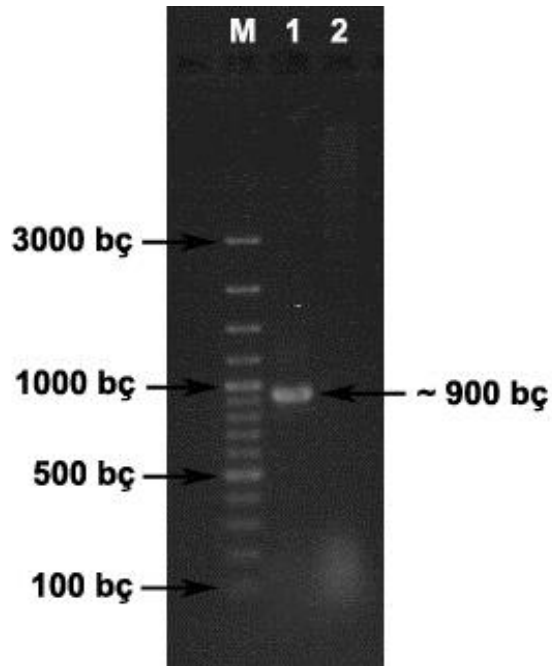
* Karbonhidrat içermeyen test kuyucuğu

API 50 CH karbonhidrat fermentasyon testi sonucu *L. lactis* subsp. *lactis* olduğu belirlenen YT52 izolatının genetik tanısı 16S rDNA dizi analizi yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Cancilla vd. (1992), tarafından önerilen yönteme göre YT52 izolatından izole edilen genomik DNA örneğinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.3. YT52 izolatının genomik DNA örneği

Bakteriyosin üreticisi YT52 suşunda 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılmış fragmentinin agaroz jel elektroforez işlemi sonrası moleküler büyüklüğünün yaklaşık 900 bç olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4). PZR ile çoğaltılan 16S rDNA gen bölgesinin DNA dizisi BLAST programında analiz edilmiş ve *Enterococcus faecium* genomundaki bölge ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.4. *Enterococcus faecium* YT52 suşunun PZR ile çoğaltılan 16S rDNA fragmenti.

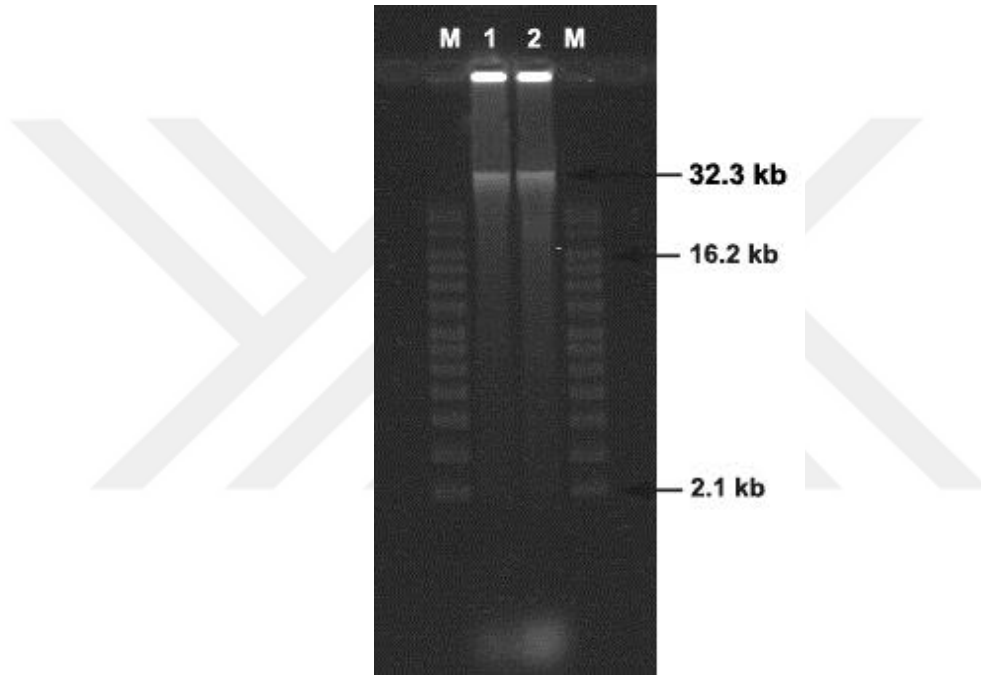
Bakterilerin koloni morfolojileri ve kültürel ve biyokimyasal özellikleri gibi fenotopik karakterleri incelenerek geleneksel tanı yöntemleri ile tür ve alt tür düzeyinde tanısı yapılabilir. Ancak, geleneksel tanı yöntemleri kullanılarak yapılan tanımlama çalışmalarında izolatların tür ve alt tür düzeyinde kesin bir ayrımının yapılması oldukça güçtür. Bu nedenle günümüzde bakterilerin tür ve alt tür düzeyinde tanısı konvensiyonel tanı yöntemlerinin yanı sıra nükleik asit homolojisi, genomik DNA restriksiyon analizi, restriksiyon parçacık uzunluk polimorfizmi (RFLP), değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE), 16S rDNA genlerini tanımlayıcı PZR uygulamaları ve DNA dizi analizleri gibi çeşitli moleküler genetik yöntemler ile desteklenmektedir (Brown, 2001; Samaržija vd., 2001; Pu vd., 2002; Ben Amor vd., 2007; Koral, 2011). Tanı testleri neticesinde bakteriyosin üreticisi YT52 izolatı, API 50 CH karbonhidrat fermentasyon testi sonucuna göre *L. lactis* subsp. *lactis*, 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre ise *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen bu sonuç ışığında fenotipik olarak *L. lactis* subsp. *lactis* olarak tanımlanan YT52 izolatının *Enterococcus faecium* olduğu kesinlik kazanmıştır. Çalışmanın bundan sonra yapılan aşamalarında bakteriyosin üreticisi YT52 izolatı *Enterococcus faecium* YT52 olarak adlandırılmıştır.

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlerin güçlü antilisterial etkiye sahip olduklarını ortaya koymuştur (Ghrai vd., 2008; Tuncer, 2009; Favaro vd., 2014; Tuncer vd., 2014; H-Kittikun vd., 2015). Tez çalışması kapsamında da *Listeria* türlerine karşı güçlü antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilen YT52 izolatının nihai olarak *E. faecium* olarak tanımlanması bu bulguları destekler niteliktedir.

4.4. Plazmit DNA İzolasyonu

Bakteriyosin üreticisi *E. faecium* YT52 suşunun, Anderson ve McKay (1983) tarafından önerilen alkali denatürasyon yöntemi kullanılarak yapılan plazmit DNA izolasyonu sonucu moleküler büyüklüğü 32.3 kb olan 1 adet plazmit DNA içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Geçmiş yıllarda gıda kaynaklı enterokokların plazmit DNA içeriklerinin araştırıldığı çalışmalar, enterokokların genellikle yüksek sayıda plazmit DNA içerdiklerini göstermiştir (Özmen Toğay vd., 2016; Yogurtcu ve Tuncer, 2013; Yüksel vd., 2015). Özmen Toğay vd. (2016), doğal fermente peynir,

zeytin ve sucuk örneklerinden izole ettikleri *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının 1-6 arasında değişen sayıda plazmit DNA içerdiğini bildirmişlerdir. Yogurtcu ve Tuncer (2013), Tulum peynirinden izole ettikleri *Enterococcus* suşlarının moleküler büyüklükleri 2.0 ile 47.6 kb arasında değişen ve sayıları 1 ile 9 arasında olan plazmit DNA içerdiğini rapor etmişlerdir. Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada ise Yüksel vd. (2015), geleneksel peynirlerden izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının moleküler büyüklükleri 2.4 ile 35.8 kb arasında değişen ve sayıları 3 ile 15 arasında olan plazmit DNA içerdiğini bildirmişlerdir.



Şekil 4.5. Bakteriyosin üreticisi *E. faecium* YT52 suşunun plazmit içeriği.

M	ccc Plazmit DNA Marker (kb)	: 16.2, 14.1, 12.2, 10.2, 8.0, 7.2, 6.0, 5.0, 4.0, 2.9, 2.1
1-2	YT52 (kb)	: 32.3

4.5. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine pH, Sıcaklık ve Enzim Uygulamalarının Etkisi

E. faecium YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve enzim uygulamalarının etkisi Çizelge 4.3’de verilmiştir. *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivitesinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalar, YT52 kültür üst sıvısının *L. monocytogenes* ATCC 15813 suşuna karşı

6400 AU/mL seviyesinde aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Farklı pH uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği denemeler sonucu, bakteriyosin aktivitesinin pH 2.0-4.0 değerleri arasında % 100 artış gösterdiği, pH 5.0-10.0 değerleri arasında stabil kaldığı ve pH 11.0 değerinde ise % 50 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Elde edilen bu sonuçlara benzer olarak *Lactococcus lactis* suşları tarafından üretilen nisin de asidik pH'larda bakteriyosinin çözünürlüğündeki artışa bağlı olarak aktivitesinin arttığı ve bazik pH'larda ise aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Olasupo vd., 1999; Noonpakdee vd., 2003; Tuncer, 2009; Koral ve Tuncer, 2013). Enterosinlerin farklı pH aralıklarında davranışlarının incelendiği araştırmalarda ise genel olarak pH 2.0-10.0 değerleri arasında aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir (Cintas vd., 1997; Ghrairi vd., 2008; Gupta vd., 2010; Liu vd., 2011; Favaro vd., 2014; Saelim vd., 2015). Farklı enzim muamelesinin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, bakteriyosin aktivitesinin proteinaz-K ve tripsin uygulamaları ile tamamen, pepsin, α -kemotripsin ve α -amilaz uygulamaları ile ise kısmen inaktive olduğu belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesinin katalaz, lizozim ve lipaz uygulamalarından ise etkilenmediği saptanmıştır (Çizelge 4.3). Elde edilen sonuçlara benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da enterosinlerin çeşitli proteolitik enzimlere karşı duyarlı oldukları, katalaz, lizozim veya lipaz uygulamalarından ise etkilenmediği tespit edilmiştir (Cintas vd., 1997; Ghrairi vd., 2008; Gupta vd., 2010; Liu vd., 2011; Bal vd., 2012; Favaro vd., 2014; Saelim vd., 2015). Tez çalışması kapsamında YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin α -amilaz uygulaması sonucu aktivitesinde azalma tespit edilmesi, bakteriyosin aktivitesi için protein yapısına ek olarak karbonhidrat grubunun da önemli olduğunu ortaya koymuştur. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da LAB tarafından üretilen çeşitli bakteriyosinlerin α -amilaz uygulamasından etkilendiği bildirilmiştir (Lewus vd., 1992; Gulahmadov vd., 2006; Lee vd., 2010; Tuncer ve Özden, 2010; Bal vd., 2012). *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin, 100 °C'de 5, 10, 15, 20 dakika ve 121 °C'de 15 dakika sıcaklık uygulamalarında aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda da farklı *Enterococcus* suşları tarafından üretilen enterosinlerin ısı stabil bakteriyosinler oldukları tespit edilmiştir (Yoon vd., 2005; Ghrairi vd., 2008; Gupta vd., 2010; İşleroğlu vd., 2012; Favaro vd., 2014; Yıldırım vd., 2014; Liu vd., 2016; Gupta vd., 2016).

Çizelge 4.3. *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivitesi üzerine farklı pH, enzim ve sıcaklık uygulamalarının etkisi.

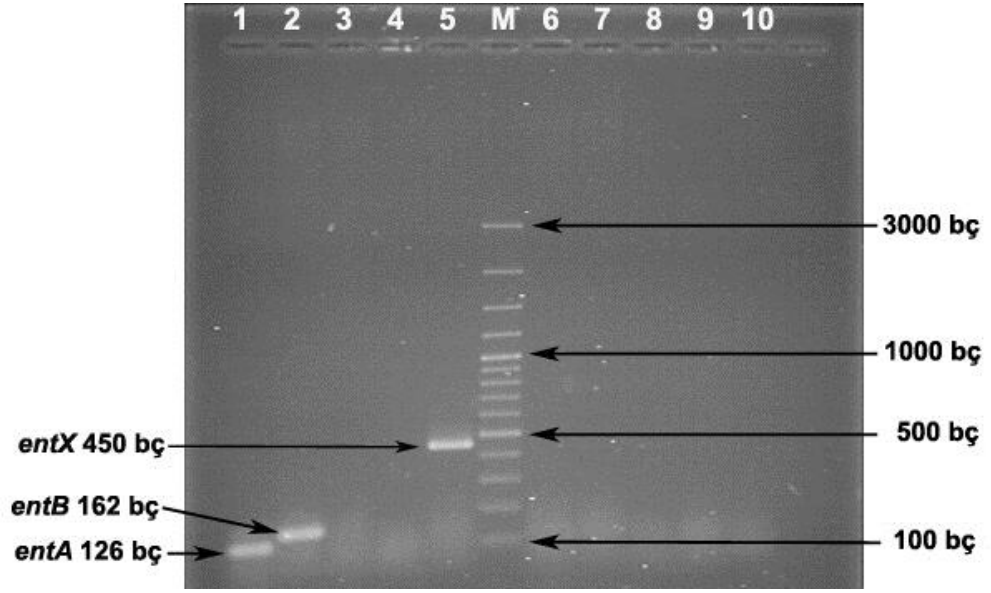
Muamele	Bakteriyosin Aktivitesi (AU/mL)
	YT52*
Kontrol	6400
pH 2	12800
pH 3	12800
pH 4	12800
pH 5	6400
pH 6	6400
pH 7	6400
pH 8	6400
pH 9	6400
pH 10	6400
pH 11	3200
Proteinaz-K	0
Tripsin	0
α -Kemotripsin	100
Pepsin	400
α -Amilaz	800
Lipaz	6400
Katalaz	6400
Lizozim	6400
100 °C'de 5 dakika	6400
100 °C'de 10 dakika	6400
100 °C'de 15 dakika	6400
100 °C'de 20 dakika	6400
121 °C'de 15 dakika	6400

*YT52: *E. faecium* YT52

4.6. Bakteriyosin Yapısal Genlerinin Tespiti

Bilinen enterosin primerleri kullanılarak yapılan PZR denemeleri sonucu, *E. faecium* YT52 genomunda enterosin A, B ve X primerleri ile sırasıyla 126, 162 ve 450 bp büyüklüğünde PZR ürünlerinin çoğaltıldığı tespit edilmiştir. Enterosin X primerleri kullanılarak çoğaltılan PZR ürününün beklenilenin (500 bp) aksine daha küçük boyutta olduğu tespit edilmiştir. YT52 suşunun enterosin P, Q, AS-48, L50A/B,

1071A/B ve bakteriyosin 31'e özgül primerler ile herhangi bir amplifikasyon vermediği belirlenmiştir (Şekil 4.6). PZR sonuçları *E. faecium* YT52 suşunun çoklu enterosin üreticisi olabileceğini işaret etmektedir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da gıda kökenli enterokok izolatları arasında özellikle *E. faecium* suşlarında çoklu enterosin yapısal genlerinin varlığı gösterilmiştir (Ben Belgacem vd., 2010; Özden Tuncer vd., 2013; Favaro vd., 2014; Mojsova vd., 2015; Özmen Toğay vd., 2016). Ben Belgacem vd. (2010), Tunus fermente et ürünü olan "Gueddin" den izole ettikleri 24 *E. faecium* izolatının en az 2 enterosin geni içerdiğini bildirmişlerdir. Yapılan PZR çalışmaları izolatların tamamının enterosin A, 22 adedinin enterosin B ve 21 adedinin ise enterosin P geni içerdiğini ortaya koymuştur. Pozitif PZR sonucu veren suşlardan 19 adedinin her 3 enterosin genini (*entA*, *entB* ve *entP*), 22 adedinin *entA* ve *entB* ve 21 adedinin ise *entA* ve *entP* genlerini içerdiği belirlenmiştir. İzolardan hiçbirinde *entQ*, *ent1071A-ent1071B*, *entL50* (*entL50A-entL50B*) ve *ent31* genlerinin varlığı tespit edilmemiştir. Benzer olarak Özden Tuncer vd. (2013), Tulum peynirinden izole edilen bakteriyosin üreticisi 3 *E. faecium* izolatında enterotoksin genlerinin varlığını araştırdıkları çalışmalarında, *E. faecium* EYT17 ve EYT31 suşlarının *entA*, *entB* ve *entP*, *E. faecium* EYT39 suşunun ise *entA* ve *entB* genlerini içerdiğini rapor etmişlerdir. İzolatlardan hiçbirinde *entQ*, *ent1071A/B*, *entL50A/B*, *bac31* ve *entAS48* genlerine özgül primerlerle bir amplifikasyon elde edilmediği bildirilmiştir. Favaro vd. (2014), salamura beyaz peynirden izole ettikleri bakteriyosin üreticisi 4 *E. faecium* izolatından ST209GB ve ST315GB suşlarının *entA*, *entB* ve *entP*, ST278GB suşunun *entA* ve *entB* ve ST711GB suşunun ise *entA*, *entP* ve *entL50B* genlerini içerdiğini tespit etmişlerdir. Mojsova vd. (2015), salamura beyaz peynirden izole ettikleri bakteriyosin üreticisi 2 *E. faecium* izolatında da *entA*, *entB* ve *entP* genlerinin varlığını göstermişlerdir. Özmen Toğay vd. (2016), geleneksel Türk peynirlerinden izole ettikleri *Enterococcus* spp. izolatlarının antibakteriyel aktivite özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında antibakteriyel aktivite gösteren 25 izolattan 18 adedinde hem *entA* hem de *entB* genlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.



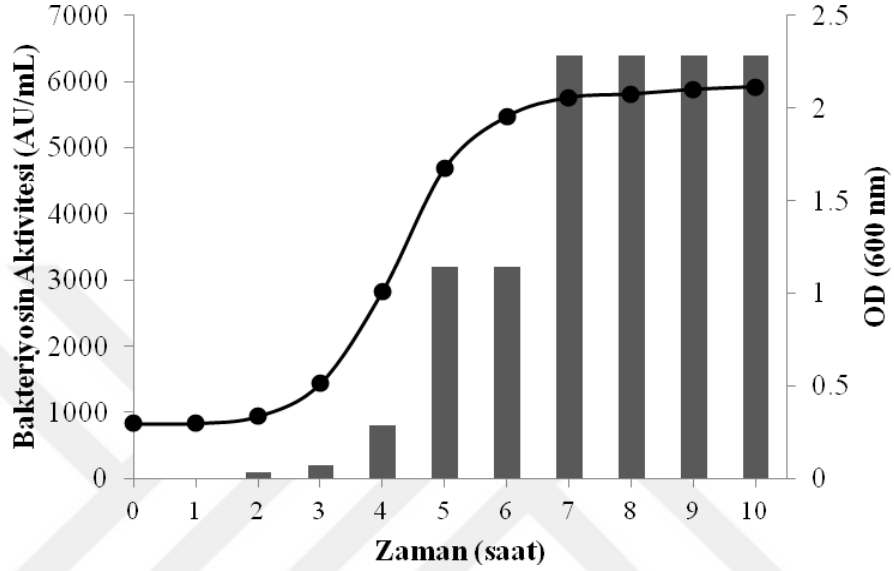
Şekil 4.6. *E. faecium* YT52 suşunun genomik DNA'sında enterosin genlerinin PZR amplifikasyonu.

1	<i>entA</i>	: 126 bç
2	<i>entB</i>	: 162 bç
3	<i>entP</i>	: -
4	<i>entQ</i>	: -
5	<i>entX</i>	: 450 bç
M	O'GeneRuler DNA Marker	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100
6	<i>entAS48</i>	: -
7	<i>entL50A/B</i>	: -
8	<i>ent1071A/B</i>	: -
9	<i>bac31</i>	: -
10	Negatif kontrol (su)	: -

4.7. Bakteriyosin Üretimi

Bakteriyosin üretiminin belirlenmesi üzerine yapılan ölçümler sonucu, *E. faecium* YT52 suşunun inkübasyonun 2. saati sonunda 100 AU/mL düzeyinde bakteriyosin ürettiği tespit edilmiştir. İnkübasyonun ilerleyen saatlerinde, bakteriyosin aktivitesinin hücre yoğunluğunun artışına paralel olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek bakteriyosin aktivitesi (6400 AU/mL) kültür yoğunluğunun 2.0566 değerine ulaştığı 7. saatin sonunda ölçülmüştür (Şekil 4.7). Bakteriyosin üretiminin gelişme fazında başlamış ve gelişme fazının sonunda maksimum seviyeye ulaşmış olması, *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin primer metabolit kinetiğine sahip olduğunun göstergesidir. Elde edilen bu sonucu destekler

nitelikte farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da çeşitli LAB suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin de primer metabolit kinetiğine sahip oldukları tespit edilmiştir (Todorov ve Dicks, 2005; Todorov ve Dicks, 2006; Ghrairi vd., 2008; Şahingil vd., 2010; Koral ve Tuncer, 2013; Iranmanesh vd., 2015; Ndlovu vd., 2015).

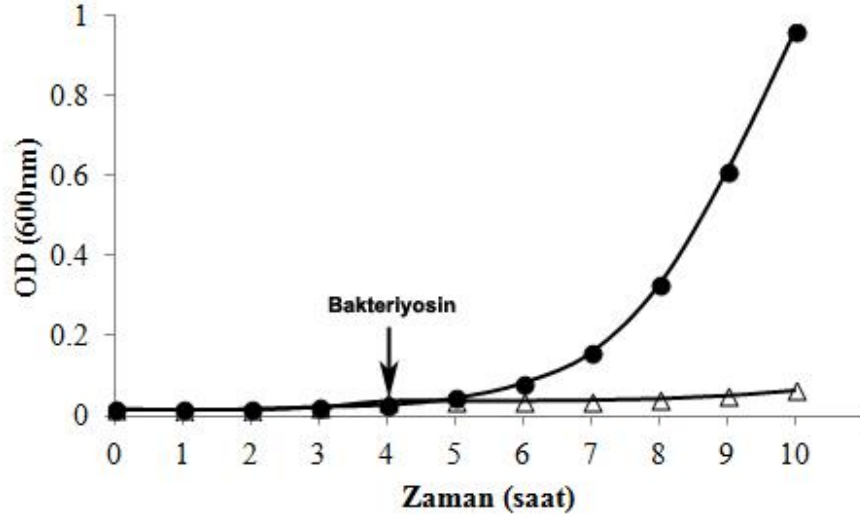


Şekil 4.7. *E. faecium* YT52 suşu tarafından bakteriyosin üretimi ve kültür yoğunluğundaki değişim (●).

4.8. Hücre Lizizi

Hücre liziz analizinde, erken gelişme fazına kadar geliştirilen *L. monocytogenes* ATCC 15813 kültürü (100 mL) üzerine 20 mL nötrale edilmiş *E. faecium* YT52 kültür üst sıvısının ilave edilmiştir. Bakteriyosin ilavesini takip eden süre zarfında *L. monocytogenes* ATCC 15813 kültürünün gelişiminin durduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Hücre liziz analizinden elde edilen sonuçlar *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin *L. monocytogenes* ATCC 15813 suşuna karşı bakterisidal aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Tez çalışmasında elde edilen bulguya benzer olarak, Favaro vd. (2014) salamura beyaz peynirden izole ettikleri enterosin üreticisi *E. faecium* ST209GB, ST278GB, ST315GB ve ST711GB suşlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* ATCC 33090 ve *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC 19119 test mikroorganizmalarına karşı bakterisidal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Benzer olarak yapılan bir başka çalışmada, şaraptan izole edilen *E.*

faecium #6 ve 112.4 suşlarının *Lactobacillus pentosus* DSM 20314 suşuna karşı bakterisidal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ndlovu vd., 2015).

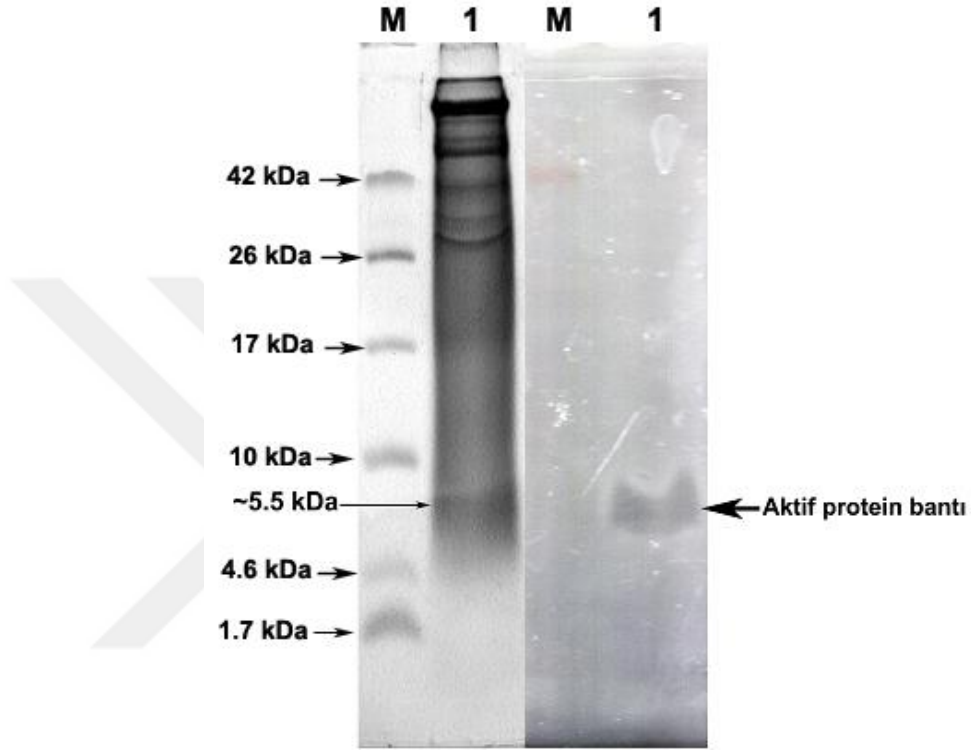


Şekil 4.8. *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin *L. monocytogenes* ATCC 15813 suşunun gelişimi üzerine etkisi. Bakteriyosin ilave edilmemiş (●) ve bakteriyosin ilave edilmiş (Δ).

4.9. Trisin-Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Trisin-SDS-PAGE)

E. faecium YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin moleküler büyüklüğü, trisin-SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen jelde farklı moleküler büyüklüğe sahip bantlar görülmesine rağmen aktif protein bandının (antibakteriyel aktivite gösteren) belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucu yaklaşık 5.5 kDa moleküler büyüklüğe sahip bandın *L. monocytogenes* ATCC 15813 suşuna karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda enterosin A'nın 4.8 kDa (Aymerich vd., 1996), enterosin B'nin 5.5 kDa (Casaus vd., 1997) ve enterosin X'in $X\alpha$ ve $X\beta$ alt ünitelerinin sırasıyla 4.4201 ve 4.0685 kDa (Hu vd., 2010) moleküler büyüklükte olduğu belirlenmiştir. *E. faecium* YT52 suşunun kısmi saflaştırması yapılan kültür üst sıvısının Trisin-SDS-PAGE analizi sonucu vermiş olduğu aktif protein bandının büyüklüğü enterosin B'nin moleküler büyüklüğü ile uyum göstermektedir. PZR denemesi sonucu *E. faecium* YT52 suşunda *entA*, *entB* ve *entX* genleri tespit edilmiş olmasına rağmen Trisin-SDS-PAGE analizi sonucu tek aktif protein bandının tespit edilmiş olması, *E. faecium* YT52 suşunda *entB* geninin

fenotipik olarak ifade edildiğinin ancak *entA* ve *entX* genlerinin ise fenotipik olarak ya ifade edilmediğinin (sessiz “silent” gen) ya da çok düşük düzeyde ifade edildiğinin güçlü delili olarak değerlendirilmiştir. Benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da sessiz enterosin genlerinin varlığı *Enterococcus* suşlarında rapor edilmiştir (De Vuyst vd., 2003; Mojsova vd., 2015).



Şekil 4.9. *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin Tris-Glycine SDS-PAGE jel elektroforez profili.

M	Protein marker (kDa)	: 42.0, 26.0, 17.0, 10.0, 4.6, 1.7
1	YT52* (kDa)	: 5.5
M	Protein marker ** (kDa)	: 42.0, 26.0, 17.0, 10.0, 4.6, 1.7
1	YT52** (kDa)	: 5.5

*YT52: *E. faecium* YT52

**Jelin üstüne üst tabaka olarak *L. monocytogenes* ATCC 15813 suşu dökülmüştür

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bozadan izole edilen YT52 izolatının antibakteriyel aktivite spektrumunu belirlemek üzere yapılan denemeler sonucu çeşitli LAB'nin yanı sıra önemli gıda patojenlerinden *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus*'a karşı da antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edildi. Proteolitik enzim uygulaması sonucu üretilen antibakteriyel maddenin bakteriyosin olduğu belirlendi. 16S rDNA dizi analizi sonucu bakteriyosin üreticisi YT52 izolatının *Enterococcus faecium* olduğu tespit edildi. Plazmit analizi sonucu *E. faecium* YT52 suşunun 32.3 kb büyüklüğünde 1 adet plazmit DNA içerdiği belirlendi. Bilinen enterosin primerleri kullanılarak yapılan PZR denemeleri sonucu YT52 izolatının *entA*, *entB* ve *entX* yapısal genlerini içerdiği tespit edildi. Çoğaltılan PZR ürünlerinin DNA dizi analizinin yapılarak enterosin sekansları ile karşılaştırılması gerekmektedir. *E. faecium* YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin primer metabolit kinetiğine sahip olduğu belirlendi. Hücre liziz denemesi sonucu YT52 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin *Listeria monocytogenes* ATCC 15813'e karşı bakterisidal aktivite gösterdiği tespit edildi. Trisin-SDS-PAGE analizi sonucu aktif protein bandının moleküler büyüklüğü 5.5 kDa olarak belirlendi. Aktif protein bandının büyüklüğünün enterosin B'nin moleküler büyüklüğü ile uyum gösterdiği tespit edildi. PZR denemeleri sonucu YT52 suşun da *entA*, *entB* ve *entX* genlerinin tespit edilmiş olmasına rağmen Trisin-SDS-PAGE analizi sonucu tek aktif protein bandının tespit edilmiş olması, *E. faecium* YT52 suşunda *entB* geninin fenotipik olarak ifade edildiğini ancak *entA* ve *entX* genlerinin ise fenotipik olarak ya ifade edilmediğini (sessiz "silent" gen) yada çok düşük düzeyde ifade edildiğini göstermektedir.

Tez çalışması kapsamında enterosin B üreticisi olduğu tespit edilen *E. faecium* YT52 suşunun *L. monocytogenes* ve *B. cereus*'a karşı antibakteriyel aktivite göstermesi bu suşun gıda muhafazasında kullanım potansiyeli olduğunu ortaya koymuştur. Ancak söz konusu suşun gıda muhafazasında kullanılabilmesi için antibiyotik direnç, biyogen amin üretimi ve virülens faktörlerinin de araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Achemchem, F., Martinez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E., Maqueda, M., 2005. *Enterococcus faecium* F58, a Bacteriocinogenic Strain naturally Occurring in Jben, a Soft, Farmhouse Goat's Cheese Made in Morocco. *Journal Applied Microbiology*, 99, 141-150.
- Ahmad, S., Iqbal, A., Rasool, S.A., 2004. Isolation and Biochemical Characterization of enterocin EFS100 produced by *Enterococcus faecalis* EFS100 isolated from a Patient Suffering from Urinary Tract Infection. *Pakistan. Journal of Botany*, 36(1), 145-158.
- Anderson, D.G., McKay, L.L., 1983. A Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from Lactic Streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 549-552.
- Andrighetto, C., Knijf, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancannety, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F., 2001. Phenotypic and Genetic Diversity of Enterococci Isolated from Italian Cheeses. *Journal Dairy Research*, 68, 303-316.
- Aymerich, T., Holo, H., Havastein L.S, Hugas, M., Garriga, M., Nes, I.F., 1996. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin A from *Enterococcus faecium* A new antil Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1676-1682.
- Bal, E.B.B., Isevi, T., Bal, M.A., 2012. Characterization of an Anti-listerial Enterocin from Wheat Silage Based *Enterococcus faecium*. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 496-503.
- Balla, E., Dicks, M.T., Du Toit, M., Van Der Merwe, M.J., Holzapfel, W.H., 2000. Characterization and Cloning of the Genes Encoding Enterocin 1071A and Enterocin 1071B, Two Antimicrobial Peptides Produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1298-1304.
- Basanta, A., Sanchez, J., Gomez-Sala, B., Herranz, C., Hernandez, P.E., Cintas, L.M., 2008. Antimicrobial Activity of *Enterococcus faecium* L50, a Strain Producing Enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, Against Beer-spoilage Lactic Acid Bacteria in Broth, Wort (Hopped and Unhopped), and Alcoholic and Non-alcoholic Lager Beers. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 293-307.
- Ben Amor, K., Vaughan, E.E., de Vos, W.M., 2007. Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Nutrition*, 741-747.
- Ben Belgacem, Z., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., Manai, M., 2010. Antimicrobial Activity, Safety Aspects, and Some Technological Properties of Bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* From Artisanal Tunisian Fermented Meat. *Food Control*, 21, 462-470.

- Borrero, J., Jimenez, J.J., Gutiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernandez, P.E., 2011. Protein Expression Vector and Secretion Signal Peptide Optimization to Drive the Production, Secretion, and Functional Expression of the Bacteriocin Enterocin a in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Biotechnology*, 156, 76-86.
- Broadbent, J.R., Chou, C., Gillies, K., and Kondo, J.K., 1989. Nisin Inhibits Several Gram-positive, Mastitis-causing Pathogens. *Journal Dairy Science.*, 72, 3342-3345.
- Brown, E.W., 2001. Molecular differentiation of bacterial strains. In: *Molecular Epidomilogy.* (Carrington, M. and Rus Hoelzel, A. -eds.) Oxford University Pres, pp. 29-66, Oxford UK.
- Burgos, M.J.G., Kovacs, A.T., Mironczuk, A.M., Abriouel, H., Galvez, A., Kuipers, O.P., 2009. Response of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to Challenges with Sublethal Concentrations of Enterocin AS-48. *MBC Microbiology*, 9, 227.
- Burgos, M.J.G., Pulido, R.P., Aguayo, M., del C.L., Galvez, A., Lucas, R., 2014. The Cyclic antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 22706-22727.
- Cai, Y., Ng, L-K. and Farber, J.M. 1997. Isolation and Characterization of Nisin Producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Bean Sprouts. *Journal Applied Microbiology*, 83, 499-507.
- Campbell, R.C., 1974. *Statistics for Biologist.* Cambridge University Press, Second Edition, 385p.
- Cancilla, M.R., Powel, I.B., Hillier, A.J, Davidson, B.E., 1992. Rapid Genomic Fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction with ³²P Fluorescent Labels. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1772-1775.
- 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 Sinergistically with Enterocin A. *Microbiology*, 143, 2287-2294.
- Chang, S.-Y., Chen, Y.-S., Pan, S.-F., Lee, Y.-S., Chang, C.-H., Chang, C.-H., Yu, B., Wu, H.-C., 2013. Enterocin TW21, a Novel Bacteriocin from Dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 673-678.
- Chen, H., Hoover, D.G., 2003. Bacteriosins and their Food Applications. *Comphrehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 2, 82-100.
- Chen, Y.-S., Yu, C.-R., Ji, S.-H, Liou, M.-S., Leong, K.-H., Pan, S.-F., Wu, H.-C, Lin, Y.-H., Yu, B., Yanagida, F., 2013. Enterocin T, a Novel class IIa

Bacteriocin Produced by *Enterococcus* sp. 812. Archives of Microbiology, 195, 655-660.

- Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernandez, P.E., Nes, I.F., 1997. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel Sec-dependent Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Applied and Environmental Microbiology, 63(11), 4321-4330.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Havarstein, L.S., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., 2000. Biochemical and Genetic Evidence that *E. 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. Journal of Bacteriology, 182(23), 6806-6814.
- 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. Journal of Bacteriology, 180, 1988-1994.
- Cintas, L.M., Rodriguez, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes, I.F., Hernandez, P.E., Holo, H., 1995. Isolation and Characterization of Pediocin L50, a New Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a Broad Inhibitory Spectrum. Applied and Environmental Microbiology, 61 (7), 2643- 2648.
- De Kwaadsteniet, M., Fraser, T., Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., 2006. Bacteriocin T8, a Novel Class IIa Sec-dependent Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* T8 Isolated from Vaginal Secretions of Children Infected with Human Immunodeficiency Virus. Applied and Environmental Microbiology, 72(7), 4761-4766.
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H., Dicks, L.M.T., 2005. Characterization of a 3944 Da Bacteriocin, Produced by *Enterococcus mundtii*, with Activity against Gram-positive and Gram-negative Bacteria. International Journal of Food Microbiology, 105, 433-444.
- De Martinis, E.C.P., Alves, V.F., Franco, B.D.G.M., 2002. Fundamentals and Perspectives for the use of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria in Meat Products. Food Reviews International, 18(2-3), 191-208.
- 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. International Journal of Food Microbiology, 84, 299-318.
- De Vuyst, L., Leroy, F., 2007. Bacteriocins from Lactic Acid bacteria: Production, Purification and Food Applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 13, 194-199.

- De Vuyst, L., Vandamme, E.J., 1994. Bacteriocins of Lactic acid Bacteria, Microbiology, Genetics and Applications. Chapman and Hall, New York, 539p.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological Tools for Bio-preservation and Shelf-life Extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.
- Delves-Broughton, J., 2005. Nisin as a Food Preservative. *Food Australia*, 57, 525-527.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J., 1996. Applications of the Bacteriocin, Nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 193-202.
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, 75, 399-408.
- Dezwaan, D.C., Mequio, M.J., Littell, J.S., Allen, J.P., Rossbach, S., Pybus, V., 2007. Purification and Characterization of Enterocin 62-6, a Two Peptide Bacteriocin Produced by a Vaginal Strain of *Enterococcus faecium*: Potential Significance in Bacterial Vaginosis. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 19, 241-250.
- Dieye, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A., Piard, J.C., 2001. Design of a Protein Targeting System for Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 183, 4157-4166.
- Drosinos, E.F., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras I., Metaxopoulos, I., 2007. Phenotypic and Technological Diversity of Lactic Acid Bacteria and Staphylococci Isolated from Traditionally Fermented Sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*, 24, 260-270.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Botter, E.C., 1989. Isolation and Direct Complete Nucleotide Determination of Entire Genes. Characterization of a Gene Coding for 16S Ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17, 7843-7853.
- Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi, S.-H., Doi, K., Ohmomo, S., Ogata, S., 2001. Isolation and Characterization of Enterocin SE-K4 Produced by Thermophilic Enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(2), 247-253.
- Elder, J.K., Amos, A., Southern, E.M., Shippey, G.A., 1983. Measurement of DNA Length by Gel Electrophoresis (I), *Analytical Biochemistry*, 128, 223-226.
- Elder, J.K., Southern, E.M., 1983. Measurement of DNA Length by Gel Electrophoresis (II): Comparison of Methods for Plating Mobility of Fragment Length, *Analytical Biochemistry*, 170, 38-44.

- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A., 2000. Class IIa Bacteriocins: Biosynthesis, Structure and Activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 85-106.
- Facklam, R.R., Sahm, D.S., Teixeira, L.M., 2002. Standard Laboratory Methods For Identifying and Growing Enterococci. *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology Press.
- Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X., Franco, B.D.G.de M., 2014. Bacteriocinogenic Potential and Safety Evaluation of Non-starter *Enterococcus faecium* strains Isolated from Home Made White Brine Cheese. *Food Microbiology*, 38, 228-239.
- Fernandez, M., Sanchez-Hidalgo, M., Garcia-Quintas, N., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., Lopez, P., Maqueda, M., 2008. Processing of *as-48ABC* RNA in AS-48 Enterocin Production by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 190(1), 240-250.
- Floriano, B., Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R., 1998. Purification and Genetic Characterization of Enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a Novel Antilisterial Plasmid-encoded Bacteriocin which does not Belong to the Pediocin Family of Bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4883-4890.
- Foegeding, P.M., Thomas, A.B., Pilkington, D.H., Klaenhammer, T.R., 1992. Enhanced Control of *Listeria monocytogenes* by in-situ Produced During Dry Fermented Sausage Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 884-887.
- Foulquie-Moreno, M.R., Saraninopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, 2006. The Role and Application of Enterococci in Food and Health. *International Journal Food Microbiology*, 106, 1-24.
- Franz C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the Crossroads of Food Safety? Review. *International Journal Food Microbiology*, 47, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Du Toit, M., von Holy, A., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., 1997. Production of Nisin-like Bacteriocins by *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Vegetables. *Journal of Basic Microbiology*, 37, 187-196.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods a conundrum for safety. *International Journal Food Microbiology*, 88, 105-122.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L, Omar N.B., 2007. Bacteriocin-based Strategies for Food Biopreservation. *International Journal Food Microbiology*, 120, 51-70.
- Gardin, F., Martuscelli, M., Caruso, M.C., Galgano, F., Crudele, M.A., Favati, F., 2001. Effects of pH, Temperature and NaCl Concentration on the Growth

- Kinetics, Proteolytic Activity and Biogenic Amine Production of *Enterococcus faecalis*. International Journal of Food Microbiology, 64(1-2), 105-117.
- Geis, A., Singh, J., Teuber, M., 1983. Potential of Lactic Streptococci to Produce Bacteriocin. Applied and Environmental Microbiology, 45, 205-211.
- Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J.M., Manai, M., 2008. Purification and Characterisation of Bacteriocins Produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian Rigouta Cheese. Food Control, 19, 162-169.
- Gillor, O., Nigro, L.M., Riley, M.A., 2005. Genetically Engineered Bacteriocins and Their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. Current Pharmaceutical Design, 11,1-9.
- Giraffa, G., 2003. Functionally of Enterococci in Dairy Products. International Journal of Food Microbiology, 88, 215-222.
- Gomes, B., Esteves, C., Palazzo, I., Darini, A., Felis, G., Sechi, L., Franco, B., Martinis, E., 2008. Prevalence and Characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian Foods. Food Microbiology, 25, 668-675.
- Gratia, A., 1946. Techniques Selectives Pour la Recherche Systematique des Germes Antibiotiques. C.R. Seances Society of Biology. 140, 1053-1055.
- Gulahmedov, S.G.O., Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Chobert, J-M., Kuliev, A.A.O., Heartlé, T., 2006. Characterization of Bacteriocin-like Inhibitory Substances (BLIS) from Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Azerbaijani Cheeses. European Food Research Technology., 224, 229-235.
- Gupta, A., Tiwari, S.K., Natrebov, V., Chikindas, M.L., 2016. Biochemical Properties and Mechanism of Action of Enterocin LD3 Purified from *Enterococcus hirae* LD3. Probiotic and Antimicrobial Proteins, 1-9.
- Gupta, H., Malik, R., K., Bhardwaj, A., Kaur, G., Kaushik, J., K., 2010. Purification and Characterization of Enterocin FH 99 Produced by a Faecal Isolate *Enterococcus faecium* FH 99. Indian Journal of Microbiology, 50, 145-155.
- Hécharde, Y., Sahl, H.-G., 2002. Mode of Action of Modified and Unmodified Bacteriocins from Gram-positive Bacteria. Biochimie, 84, 545-557.
- Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadhyay, S., Martinez, J.M., Rodriguez, J.M., Nes, I.N., Hernandez, P.E., Cintas, L.M., 2001. *Enterococcus faecium* P21: a Strain Occurring Naturally in Dry-fermented Sausages Producing the Class II Bacteriocins Enterocin A and Enterocin B. Food Microbiology, 18, 115-131.
- H-Kittikun, A., Biscola, V., El-Ghaish, S., Jaffrés, E., Dousset, X., Pillot, G., Haertlé, T., Chobert, J.-M., Hwanhlem, N., 2015. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G Isolated from Mangrove Forests in Southern Thailand:

- Purification, Characterization and Safety Evaluation. Food Control, 54, 126-134.)
- Holzappel W.H., Geisen R., Schillinger U., 1995. Biological Preservation of Foods with Reference to Protective Cultures, Bacteriocins and Food-grade Enzymes. International Journal Food Microbiology, 24, 343-362.
- Hu, C-B., 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. Applied and Environmental Microbiology, 76(13), 4542-4545.
- Hugas M, Garriga M, Aymerich M.T, Monfort J.M., 1993. Biochemical Characterization of Lactobacilli from Dry Fermented Sausages. International Journal Food Microbiology, 18, 107-113.
- Hugas M., Garriga M., Aymerich M.T., Monfort J.M., 1995. Inhibition of *Listeria* in Dry Fermented Sausages by the Bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. Applied Bacteriology, 79, 322-330.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., 2003. Functionality of Enterococci in Meat Products. International Journal of Food Microbiology, 88, 223-233.
- Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojgani, N., Mak, T., 2015. Characterization and Kinetics of Growth of Bacteriocin Like Substance Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Ewe Milk and Traditional Sour Buttermilk in Iran. Food processing & Technology, 6(12), 1-5.
- Izquierdo, E., Wagner, C., Marchioni, E., Aoude-Werner, D., Ennaha, S., 2009. Enterocin 96, a Novel Class II Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, Isolated from Munster Cheese. Applied and Environmental Microbiology, 75(13), 4273-4276.
- İşleroglu, H., Yıldırım, Z., Demirpençe, Y., Yıldırım, M., 2008. Enterokoklar: Biyokimyasal, Fizyolojik ve Fonksiyonel Özellikleri ile Patojenitesi (Derleme makale), Akademik Gıda, 6(3), 16-26.
- İşleroglu, H., Yıldırım, Z., Tokatlı, M., Öncül, N., Yıldırım, M., 2012. Partial Characterisation of Enterocin KP Produced by *Enterococcus faecalis* KP, a Cheese Isolate. International Journal of Dairy Technology, 65(1), 90-97.
- Jeeveratnam, K., Jamuna, M., Bawa, A.S., 2005. Biological Preservation of Foods-Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. Indian Journal of Biotechnology, 4, 446-454.
- Kang, J.H., Lee, M.S., 2005. Characterization of Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* GM-1 Isolated an Infant. Journal of Applied Microbiology, 98, 1169-1176.

- Kékessy D.A., Piguet, J.D., 1970. New Method for Detecting Bacteriocin Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 20, 282-283.
- Klein, G., 2003. Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of Enterococci from Food and the Gastro-Intestinal Tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 123-131.
- Koral, G., 2011. Bozadan İzole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Suşu Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 106, Isparta.
- Koral, G., Tuncer, Y., 2013. Nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GYL32 Isolated from Boza. *Journal of Food Processing and Preservation*. 38 (3), 1044-1053.
- Kumar, C.G, Anand, S.K., 1998. Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42, 9–2.
- Kumar, R.S., Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., Arul, V., 2011. Purification and Characterization of Enterocin MC13 Produced by a Potential Aquaculture Probiotic *Enterococcus faecium* MC13 Isolated from the Gut of *Mugil cephalus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(12), 993-1001.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-685.
- Larson, Z., Subramanyam, B., Zurek, L., Herrman, T., 2008. Diversity and Antibiotic Resistance of Enterococci Associated with Stored-product Insects Collected from Feed Mills. *Journal of Products Research*, 44, 198-203.
- 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 Science Biotechnology*, 19(3), 373-381.
- Lewus, C.B., Sun, S., Montville, T.J., 1992. Production of an Amylase-Sensitive Bacteriocin by an Atypical *Leuconostoc paramesenteroides* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 143–149.
- Liu, G., Griffiths, M.W., Wu, P., Wang, H., Zhang, X., Li, P., 2011. *Enterococcus faecium* LM-2, a Multi-bacteriocinogenic Strain Naturally Occurring in “Byaslag”, a Traditional Cheese of Inner Mongolia in China. *Food Control*, 22, 283-289.
- Liu, H., Zhang, L., Yi, H., Han, X., Gao, W., Chi, C., Song, W., Li, H., Liu, C., 2016. A Novel enterocin T1 with Anti-*Pseudomonas* Activity Produced by *Enterococcus faecium*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 32(21), 1-9.

- Lukasova, J., Sustackova, A., 2003. Enterococci and Antibiotic Resistance. *Acta Veterinaria Brno.*, 72, 315-323.
- Macrina, F.L., Kopecko, D.J. Jones, K.R., Ayers, D.S., McCoven, S.M, 1978. A Multiple Plasmid Containing *Escherichia coli* Strain: Convenient Source of Size Reference Plasmid Molecules, *Plasmid*, 1, 417-420.
- Magnusson J, Schnürer J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Applied Environmental Microbiology*, 67, 1-5.
- Maisnier-Patin, S., Forni, E., Richard, F.J., 1996. Purification, Partial Characterisation and Mode of Action Enterococcin EFS2, an Antilisterial Bacteriocin Produced by a Strain of *Enterococcus faecalis* Isolated from a Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 255-270.
- Maldonado-Barragan, A., Caballero-Guerrero, B., Jimenez, E., Jimena-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Rodriguez, J.M., 2009. Enterocin C, a class IIb Bacteriocin Produced by *E. faecalis* C901, a Strain Isolated from Human Colostrum. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 105-112.
- Marekova, M., Laukova, A., Skaugen, M., Nes, I.F., 2007. Isolation and Characterization of a New Bacteriocin, Termed Enterocin M, Produced by Environmental Isolate *Enterococcus faecium* AL40. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(8), 533-537.
- Martinez-Bueno, M., Maqueda, A., Galvez, B., Samyn, J., Van Beeumen., Coyette, J., Valdivia, E., 1994. Determination of the Gene Sequence and the Molecular Structure of the Enterococcal Peptide Antibiotic AS-48. *Journal of Bacteriology*, 176, 6334-6339.
- Masschalck B., Houdt R.V, Michiels C.W., 2001. High Pressure Increases Bactericidal Activity and Spectrum of Lactoferrin, Lactoferricin and Nisin. *International Journal Food Microbiology*, 64, 325-332.
- Meyers, J.A., Sanches, D., Elwell, L.P., Falkow, S., 1976. Simple Agarose Gel Electrophoretic Method for the Identification and Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1529-1537.
- Mojsova, S., Krstevski, K., Dzadzovski, I., Popova, Z., Sekulovski, P., 2015. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Enterocin Producing Enterococci against Pathogenic Bacteria. *Macedonian Veterinary Review*, 38(2), 209-216.
- Montalban-Lopez, M., Spolaore, B., Pinato, O., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., Fontana, A., 2008. Characterization of Linear Forms of the Circular Enterocin AS-48 Obtained by Limited Proteolysis. *FEBS Letters*, 582, 3237-3242.

- Moreno, M.R., Foulquie., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Vuyst, L., 2003. Isolation and Biochemical Characterisation of Enterocins Produced by Enterococci from Different Sources. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 214-229.
- Ndlovu, B., Schoeman, H., Franz, C.M.A.P., du Toit, M., 2015. Screening, Identification and Characterization of Bacteriocins Produced by Wine-Isolated LAB strains. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 1007-1022.
- Nes, I.F., Holo, H., 2000. Class Ila Antimicrobial Peptides from Lactic Acid Bacteria. *Biopolymers*, 55, 50-61.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., Panyim, S., 2003. Isolation of Nisin-Producing *Lactococcus lactis* WNC 20 Strain from Nham, Traditional Thai Fermented Sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 137-145.
- O'Keeffe, T., Hill, C., Ross, P., 1999. Characterization and Heterologous Expression of the Genes Encoding Pnterocin A production, Immunity, and Regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1506-1515.
- Ogier, J.C., Serror, P., 2008. The Enterococcus Genus. *International Journal Food Microbiology*, 126(3), 291-301.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, Nakajimas, T., 2000. Purification and Some Characteristics of Enterocin ON-157, a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 81-89.
- Okereke, A., Montville, T.J., 1991. Bacteriocin Inhibition of *Clostridium botulinum* Spores by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection* 54(5), 349-353.
- Olasupo, N.A., Schillinger, U., Narbad, A., Dodd, H., Holzapfel, W.H., 1999. Occurrence of Nisin Z Production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 Isolated from Wara, a Traditional Nigerian Cheese Product. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 141-152.
- Özden, B., Akçelik, M., 2008. Genetic Analysis of Bacteriocin Production Ability and Phage Adsorption Type Resistance System in Six *Lactococcus lactis* Strains. *Acta Alimentaria*, 37, 169-179.
- Özden-Tuncer, B., Ay, Z., Tuncer, Y., 2013. Occurrence of Enterocin Genes, Virulence Factors and Antibiotic Resistance in Three Bacteriocin Producer *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. *Turkish Journal of Biology*, 443-449.
- Özmen-Toğay, S., Ay, M., Sandıkçı-Altunatmaz, S., Yılmaz-Aksu, F., Erol-Tıknaztepe, Ö., İssa, G., Büyükcinal, S.K., 2016. Antimicrobial Activity

Potential of *Enterococcus* spp. Isolated from Some Traditional Turkish Cheeses. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, In press.

- Özmen-Toğay, S., Temiz, A., 2011. Gıda Kaynaklı Enterokokların Gıda ve İnsan Sağlığı Yönünden Önemi. GIDA, 36(5), 303-310.
- Piard, J.C., Delorme, F., Giraffa, G., Commissaire, J., Desmazeaud, M., 1990. Evidence for a Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. Netherlands Milk and Dairy Journal, 44, 143-158.
- Pu, Z.Y., Dobos, M., Limsowtin, G.K.Y., Powell, I.B., 2002. Integrated Polymerase Chain Reaction-based Procedures for the Detection and Identification of Species and Subspecies of the Gram-positive Bacterial Genus *Lactococcus*. Journal of Applied Microbiology, 93, 353-361.
- Ray, B., Kalchayanand, N., Field, R.A., 1989. Isolation of *Clostridium* spp. from Spoiled Vacuum-Packed Refrigerated Beef and its Susceptibility to Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici*. 35th International Congress of Meat Science and Technology, Havana, Cuba (2), 285-290.
- Rehaiem, A., Belgacem, Z.B., Edalatian, M.R., Martinez, B., Rodriguez, A., Manai, M., Guerra, N.P., 2014. Assessment of Potential Probiotic Properties and Multiple Bacteriocin Encoding-genes of the Technological Performing Strain *Enterococcus faecium* MMRA. Food Control, 37, 343-350.
- Riley, M. 1998. Molecular Mechanism of Bacteriocin Evolution. Annual review of Genetics, Volume 32; 253-278.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and Fermentation: Past, Present and Future. International Journal Food Microbiology, 79, 3-16.
- Ryan, M.P., Hill, C., Ross, R.P., 2002. Exploitation of Lantibiotic Peptides for Food and Medical Use. In: Peptide Antibiotics, Discovery, Modes of Action and Applications. (Dutton, C.J., Haxell, M.A., McArthur, H.A.I. and Wax, R.G. – eds) Marcel Dekker Inc., pp 193-242, New York.
- Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C., Ross, R.P., 1996. An Application in Cheddar Cheese Manufacture for a Strain of *Lactococcus lactis* Producing a Novel Broad Spectrum Bacteriocin Lacticin 3147. Applied and Environmental Microbiology, 62, 612-619.
- Sabia, C., Manicardi, G., Messi, P., de Niederhausern, S., Bondi, M., 2002. Enterocin 416K1, an Antilisterial Bacteriocin Produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 Isolated from Italian sausages. International Journal of Food Microbiology, 75, 163-170.
- Saelim, K., Kaewsuwan, S., Tani, A., Maneerat, S., 2015. Physical, Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin CE5-1 Produced by *Enterococcus faecium* CE5-1 Isolated from Thai Indigenous Chicken Intestinal Tract. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 37 (3), 299-307.

- Samaržija, D., Antunac, N., Havranek, J.L., 2001. Taxonomy, Physiology and Growth of *Lactococcus lactis*: a Review. *Mljekarstvo*, 51, 35-48.
- Saraninopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., 2001. Biochemical Properties of Enterococci Relevant to Their Technological Performance. *International Dairy Journal*, 11, 621-647.
- Sawa, N., Wilaipun, P., Kinoshita, S., Zendo, T., Leelawatcharamas, V., Nakaayama, J., Sonomoto, K., 2012. Isolation and Characterization of Enterocin W, a Novel Two-Peptide Lantibiotic Produced by *Enterococcus faecalis* NKR-4-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3), 900-903.
- Schaffer, H.E., Sederoff, R.R., 1981. Improvement Estimation of DNA Fragment Lengths from Agarose Gels. *Analytical Biochemistry*, 115, 122-133.
- Schägger, H., von Jagov, G., 1987. Tricine-SDS-PAGE for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166, 368-379.
- Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R., 1987. Molecular and Chemotaxonomic Approaches to the Classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: A Review. *Systematic and Applied Microbiology*, 10, 1-19.
- Seçkin, A.K., Baladura, E., 2010. Gıdaların Muhafazasında Bakteriyosin ve Bakteriyofaj Uygulamaları. *GIDA*, 35(6), 461-467.
- Serdaroğlu, M., Sapancı-Özsümer, M., 2000. Et ve et Ürünlerinde Bakteriyosinlerin Önemi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 6(2-3), 211-217.
- Southern, E.M., 1979. Measurement of DNA Lengths by Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 100, 319-323.
- Şahingil, D., İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Akçelik, M., Yıldırım, M., 2010. Characterization of Lactocin BZ Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BZ Isolated from Boza. *Turkish Journal of Biology*, 34, 1-13.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., 1976. "Bacteriocins of Gram Positive Bacteria," *Bacteriological Reviews*, 40, 722-756.
- Tagg, J.R., McGiven, A.R., 1971. Assay System for Bacteriocins. *Applied Microbiology*, 21, 943.
- Todorov, S.D., 2009. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* Production, Genetic Organization and Mode of Action. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 209-221.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2005. Pediocin ST18, An Anti-listerial Bacteriocin Produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 Isolated from Boza, a

Traditional Cereal Beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry*, 40, 365-370.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2006. Screening for Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria from Boza, a Traditional Cereal Beverage from Bulgaria. Comparison of the Bacteriocins. *Process Biochemistry*, 41, 11-19.

Todorov, S.D., Wachsman, M., Tomé, E., Dousset, X., Destro, M.T., Dicks, L.M.T., Franco, B., D., G., de M., Vaz-Velho, M., Drider D., 2010. Characterisation of an Antiviral Pediocin-like Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology*, 27, 869-879.

Tuncer, M., Özden-Tuncer, B., Tuncer, Y., 2014. Çiğ Sütten İzole Edilen *Enterococcus faecalis* MYE58 Suşunun Güvenlik Değerlendirmesi. *Gıda*, 39(5), 275-282.

Tuncer, Y., 2009. Phenotypic and Genotypic Characterization of Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YB23 Isolated from Raw Milk in Turkey. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23, 1504-1508

Tuncer, Y., Akcelik M., 2007. Technological Characterization of Wild-type *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Raw Milk and Traditional Fermented Milk Products in Turkey. *Australian Journal of Dairy Technology*, 62, 19-25.

Tuncer, Y., Özden, B., 2010. Partial Biochemical Characterization of Nisin-like Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YBD11 Isolated from Boza, a Traditional Fermented Turkish beverage. *Romanian Biotechnological Letters*, 15, 4940-4948.

Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meany B., Hill, C., 2002. Lantibiotics Produced by Lactic Acid Bacteria: Structure, Function and Application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 165-185.

Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. 1998. *Gıda Mikrobiyolojisi*. 605 s. Mengi Tan Basımevi. İzmir.

van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J., Venema, G., 1989. Cloning of Two Bacteriocin Genes from a Lactococcal Bacteriocin Plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1187-1191.

Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Bjorkroth, K.J., Franz, C.M.A.P., Moreno, M.R.F., Revets, H., De Vuyst, L., Swings, J., Kersters, K., Dellaglio, F., Holzapfel, W.H., 2002. Intraspecies Genomic Groups in *Enterococcus faecium* and Their Correlation with Origin and Pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1381-1391.

Vescovo, M., Torriani S., Oris, C., Macchiarolo, F., Scolari, G., 1996. Application of Antimicrobial Producing Lactic Acid Bacteria to Control Pathogens in Ready-to-use vegetables. *Journal Applied Bacteriology*, 81, 113-119.

- Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, Okazaki, M., 2003. Purification and Characterization of a Novel Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* Strain RJ-11. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5746-5753.
- Yıldırım, Z., Bilgin, H., İşleroğlu, H., Tokatlı, K., Şahingil, D., Yıldırım, M., 2014. Enterocin HZ Produced by a Wild *Enterococcus faecium* Strain Isolated from a Traditional, Starter-free Picled Cheese. *Journal of Dairy Research*, 81, 164-172.
- Yoğurtçu, N.N., Tuncer, Y., 2013. Antibiotic Susceptibility Patterns of *Enterococcus* Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 66(2), 236-242.
- Yoon, Y.C., Park, H.J., Lee, N.-K., Paik, H.-D., 2005. Characterization and Enhanced Production of Enterocin HJ35 by *Enterococcus faecium* HJ35 Isolated from Human Skin. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10, 296-303.
- Yousif, N.M.K., Dawyndt, P., Abriouel, H., Wijaya, A., Schillinger, U., Vancanneyt, M., Swings, J., Dirar, H.A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2005. Molecular Characterization, Technological Properties and Safety Aspects of Enterococci From “Hussuwa”, an African Fermented Sorghum Product. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 216-228.
- Yüksel, F.N., Akçelik, N., Akçelik, M., 2015. Incidence of Antibiotic Resistance and Virulence Determinants in *Enterococcus faecalis* Strains, Isolated from Traditional Cheeses in Turkey. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 30(4), 206-215.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Müge GÖK CHARYYEV

Doğum Yeri ve Yılı : Kütahya, 1990

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : mugegok90@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Emet Çok Programlı Lisesi, 2007

Lisans : SDÜ, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, 2012

Mesleki Deneyim

Yayınları

Gök Charyyev, M., Tuncer, Y. 2016. Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* YT52 strain isolated from boza, a traditional cereal-based fermented beverage. The Food Factor I Barcelona Conference. 2-4 November 2016. (Accepted).

Özden Tuncer, B., Akpınar Kankaya, D., **Gök Charyyev, M.,** Tuncer, Y. 2016. Evaluation of virulence factors and antibiotic susceptibility of enterocinogenic *Enterococcus faecium* YT52 strain isolated from boza. The Food Factor I Barcelona Conference. 2-4 November 2016. (Accepted).