

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

**FERMENTE SUCUKTAN İZOLE EDİLEN ENTEROSİN ÜRETİCİSİ
Enterococcus mundtii YB6.30 SUŞUNUN TEKNOLOJİK
ÖZELLİKLERİ VE GÜVENLİK DEĞERLENDİRMESİ**

Melike KASAP

**Danışman
Prof. Dr. Yasin TUNCER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2019**



© 2019 [Melike KASAP]

TEZ ONAYI

Melike KASAP tarafından hazırlanan "**Fermente sucuktan izole edilen enterosin üreticisi *Enterococcus mundtii* YB6.30 suşunun teknolojik özellikleri ve güvenlik değerlendirmesi**" 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

Prof. Dr. Yasin TUNCER
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Olcay BOYACIOĞLU
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Şule Sultan UĞUR

TAAHHÜTNAME

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

Melike KASAP



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ATIF.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Enterokokların Genel Özellikleri	3
2.2. Enterokokların Teknolojik Özellikleri.....	5
2.2.1. Laktik asit üretimi	5
2.2.2. Proteolitik aktivite	6
2.2.3. Lipolitik aktivite.....	7
2.2.4. Nitrat redüktaz aktivitesi	8
2.2.5. Bakteriyosin üretimi	8
2.3. Enterokoklarda Antibiyotik Direnç.....	13
2.4. Enterokokların Virülens Faktörleri	14
2.4.1. Sitolizin.....	15
2.4.2. Jelatinaz	15
2.4.3. Hücre duvarı adhezinleri.....	16
2.4.4. Ekstraselüler yüzey proteini	16
2.4.5. Seks feromonları.....	17
2.4.6. Kollajen bağlayan protein	17
2.4.7. Hiyaluronidaz.....	18
2.4.8. Agregasyon maddesi	18
2.5. Biyojen Amin Üretimi.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Mikroorganizma	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. <i>E. mundtii</i> YB6.30 suşunun teknolojik özellikleri.....	21
3.2.1.1. Laktik asit üretimi.....	21
3.2.1.2. Proteolitik aktivite	22
3.2.1.3. Lipolitik aktivite.....	22
3.2.1.4. Nitrat redüktaz aktivitesi.....	23
3.2.2. <i>E. mundtii</i> YB6.30 suşunun güvenlik değerlendirilmesi.....	23
3.2.2.1. Antibiyotik direnç	23
3.2.2.2. Hemolitik aktivite	24
3.2.2.3. Jelatinaz aktivitesi.....	24
3.2.2.4. Virülens faktörler genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tespiti.....	25
3.2.2.4.1. Genomik DNA izolasyonu.....	25
3.2.2.4.2. Genomik DNA örneğinin elektroforezi.....	26

3.2.2.4.3. Virölens genlerinin tespiti	27
3.2.2.5. Biyojen amin üretimi	29
3.2.2.5.1. Aminoasit dekarboksilaz genlerinin PZR ile araştırılması	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	32
4.1. <i>E. mundtii</i> YB6.30 Suşunun Teknolojik Özellikleri.....	32
4.1.1. Laktik asit üretimi	32
4.1.2. Proteolitik aktivite	35
4.1.3. Lipolitik aktivite	37
4.1.4. Nitrat redüktaz aktivitesi	38
4.2. <i>E. mundtii</i> YB6.30 Suşunun Güvenlik Değerlendirmesi	39
4.2.1. Antibiyotik direnç	39
4.2.2. Hemolitik aktivite.....	41
4.2.3. Jelatinaz aktivitesi.....	43
4.2.4. Virölens faktör genlerinin PZR ile araştırılması	44
4.2.5. Biyojen amin üretimi	46
4.2.5.1. Dekarboksilaz genlerinin PZR ile araştırılması	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ.....	77

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FERMENTE SUCUKTAN İZOLE EDİLEN ENTEROSİN ÜRETİCİSİ *Enterococcus mundtii* YB6.30 SUŞUNUN TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE GÜVENLİK DEĞERLENDİRMESİ

Melike KASAP

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yasin TUNCER

Bu tez çalışmasının amacı fermente sucuktan izole edilen antilisterial aktiviteye sahip mundtisın üreticisi *Enterococcus mundtii* YB6.30 suşunun teknolojik özellikleri ve güvenlik değerlendirmesinin yapılmasıdır. Bu amaçla *E. mundtii* YB6.30 suşunun teknolojik özelliklerinden laktik asit üretimi, proteolitik aktivite, lipolitik aktivite ve nitrat redüktaz aktivitesi araştırılmıştır. *E. mundtii* YB6.30 suşunun düşük asit üretim yeteneğine sahip olduğu, proteolitik aktivite gösterdiği, lipolitik aktivite göstermediği ve nitrata redükte edebildiği tespit edilmiştir. *E. mundtii* YB6.30 suşunun güvenlik değerlendirilmesinin belirlenmesi amacıyla ise antibiyotik direnç, hemolitik aktivite, jelatinaz aktivitesi ve biyogen amin üretim özellikleri incelenmiştir. Çalışma kapsamında ayrıca YB6.30 suşunda virülens faktör ve aminoasit dekarboksilaz genlerinin genetik determinantlarının varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır. Disk difüzyon testi sonucu YB6.30 suşunun denemelerde kullanılan 18 antibiyotiğin tamamına duyarlı olduğu tespit edildi. Fenotipik testler sonucu *E. mundtii* YB6.30 suşunun hemolitik aktivite ve jelatinaz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. Hücre duvarı adhezinleri (*efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*), jelatinaz (*gelE*), ekstraselüler yüzey proteini (*esp_{fm}*, *esp_{fs}*), seks feromonları (*cpd*, *cob*, *ccf*, *cad*), kollajen bağlayıcı protein (*ace*, *acm*), agregasyon proteini (*agg*), sitolizin (*cylM*, *cylB*, *cylA*) ve hiyaluronidaz (*hyl*) gibi virülens faktörleri determine eden genlerin araştırıldığı PZR denemeleri sonucu *E. mundtii* YB6.30 suşunun hiçbir virülens geni içermediği belirlenmiştir. Fenotipik ve genotipik biyogen amin analizleri sonucunda ise *E. mundtii* YB6.30 suşunun histidin, lizin ve ornitini dekarboksile etmediği ancak tirozini dekarboksile ettiği belirlenmiştir. PZR denemeleri fenotipik test sonuçlarını desteklemiştir. *E. mundtii* YB6.30 suşunda sadece tirozin dekarboksilaz (*tdc*) geni varlığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde mundtisın üreticisi *E. mundtii* YB6.30 suşunun gıda endüstrisinde starter/yardımcı starter kültür olarak kullanımının güvenli olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus mundtii*, Sucuk, Bakteriyosin, Enterosin, Teknolojik özellikler, Güvenlik değerlendirmesi.

2019, 77 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

TECHNOLOGICAL PROPERTIES AND SAFETY ASPECTS OF ENTEROCIN PRODUCER *Enterococcus mundtii* YB6.30 STRAIN ISOLATED FROM FERMENTED SUCUK

Melike KASAP

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

Supervisor: Prof. Dr. Yasin TUNCER

The aim of this thesis is to determine the technological properties and safety evaluation of *Enterococcus mundtii* YB6.30 strain which is an mundticin producer with antilisterial activity isolated from fermented sausage. For this purpose; lactic acid production, proteolytic activity, lipolytic activity, nitrate reductase activity and technological properties of *E. mundtii* YB6.30 strain were investigated. *E. mundtii* YB6.30 was found to have low acid production ability, showed proteolytic activity, did not show lipolytic activity and could decrease nitrate. In order to determine the safety evaluation of *E. mundtii* YB6.30 strain, antibiotic resistance, hemolytic activity, gelatinase activity and biogenic amine production properties were investigated. The study also investigated the presence of genetic determinants of virulence factor and amino acid decarboxylase genes in YB6.30 strain by polymerase chain reaction (PCR). As a result of disc diffusion test, YB6.30 strain was found to be sensitive to all antibiotics used in experiments. As a result of phenotypic tests, *E. mundtii* YB6.30 strain did not show hemolytic and gelatinase activities. It was determined that *E. mundtii* YB6.30 strain did not contain any virulence gene as a result of PCR experiments investigating genes determining virulence factors such as cell wall adhesives (*efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*), gelatinase (*gelE*), extracellular surface protein (*esp_{fm}*, *esp_{fs}*), sex pheromones (*cpd*, *cob*, *ccf*, *cad*), collagen binding protein (*ace*, *acm*), aggregation protein (*agg*), cytolysin (*cylM*, *cylB*, *cylA*) and hyaluronidase (*hyl*). As a result of phenotypic and genotypic biogenic amine analyzes, *E. mundtii* YB6.30 did not decarboxylate histidine, lysine or ornithine but decarboxylated tyrosine. PCR experiment results supported phenotypic test results. Only tyrosine decarboxylase (*tdc*) gene observed in *E. mundtii* YB6.30 strain. As a result of this study, it was determined that the mundticin producer *E. mundtii* YB6.30 was safe to use as starter or adjunct culture.

Keywords: *Enterococcus mundtii*, Dry fermented sausage (Sucuk), Bacteriocin, Enterocin, Technological properties, Safety evaluation.

2019, 77 pages

*Bu alışmamı Rahmetli Babam Nurettin Kasap'a atfediyorum.
Işıklar içinde uyu...*

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, bilgisi, tecrübesi ve sabrıyla deney çalışmalarında da yardımcı olan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Yasin TUNCER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimi yapmamda FYL-2018-5765 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin istatistiksel kısmında benden yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Özgür KOŞKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında maddi ve manevi olarak beni yalnız bırakmayan sevgili Annem Gürsel KASAP ve Ablam Merve KASAP 'a teşekkürü borç bilirim.

Melike KASAP
ISPARTA, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. <i>E. mundtii</i> YB6.30 ve <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (pozitif kontrol) suşlarının kalsiyum kazeinat agar ortamında 37 °C'de 3 gün inkübasyon sonrası görüntüleri.....	36
Şekil 4.2. <i>E. mundtii</i> YB6.30 suşunun eritromisin (15 µg), levofloksasin (5 µg), linezolid (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), penisilin G (10 U) ve teikoplanin (30 µg) antibiyotiklerine karşı disk difüzyon test sonuçları.....	40
Şekil 4.3. <i>E. mundtii</i> YB6.30 ve <i>E. faecalis</i> NYE7(pozitif kontrol) suşlarının jelatinaz test sonuçları.....	43
Şekil 4.4. <i>E. mundtii</i> YB6.30 ve <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşlarında virülens genlerin PZR tespiti.....	45
Şekil 4.5. <i>E. mundtii</i> YB6.30 ve <i>E. faecalis</i> NYE54 suşlarının histidin içeren dekarboksilaz besiyerinde 37 °C'de 5 gün inkübasyon sonrası görüntüleri.....	47
Şekil 4.6. <i>E. mundtii</i> YB6.30 ve <i>E. faecalis</i> NYE54 suşlarının tirozin içeren dekarboksilaz besiyerinde 37 °C'de 5 gün inkübasyon sonrası görüntüleri.....	47
Şekil 4.7. <i>E. mundtii</i> YB6.30 suşunda histidin (<i>hdc</i>), lisin (<i>ldc</i>), tirozin (<i>tdc</i>) ve ornitin (<i>odc</i>) dekarboksilaz genlerinin PZR amplifikasyonu.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin sınıflandırılması...	10
Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan PZR karışımı.....	27
Çizelge 3.2. Virülens faktörlerin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	28
Çizelge 3.3. Dekarboksilaz genlerinin tespitinde kullanılan primerler.....	31
Çizelge 4.1. <i>E. mundtii</i> YB6.30 suşunun RSM ve MRS brotortamlarında 30 ve 37 °C'de inkübasyonun 0., 6. ve 24. saatlerinde pH değerleri.....	32
Çizelge 4.2. <i>E. mundtii</i> YB6.30 suşunun antibiyotik direnç profili ve disk difüzyon zon çapları.....	39



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ace	Adhezin Kollajen
Agg	Agregasyon Proteini
AS	Agregasyon Maddesi
BA	Biyojen Amin
bç	Baz Çifti
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EfaA	Endokarditis Antijeni
Esp	Ekstraselüler Yüzey Proteini
g	Gram
Y	Gama
GRAS	Hayvan ve İnsan Tüketiminde Güvenilir
Hyl	Hyaluronidaz
kDA	Kilodalton
LAB	Laktik Asit Bakterisi
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MRS	de Man Rogosa Sharpe
PAI	Patojenite Adası
PBS	Fosfat Tampon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RSM	Rekonstitüe Skim Milk
SDS	Sodyun Dodesil Sülfat
UV	Ultra Viyole
α	Alfa
β	Beta
%	Yüzde
Δ	Delta
°C	Santigrad Derece
μ L	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB) gıda endüstrisinde kullanılan mikroorganizma grubunun temelini oluşturmaktadır. LAB'leri et, süt, hububat, meyve ve sebze gibi geniş yelpazede birçok ham maddeden üretilen gıda ürünlerinin kendine özgü tat, doku ve aromasının oluşmasında aktif rol oynamaktadırlar. Enterokoklar peynir, sosis gibi birçok fermente gıdadan izole edilebilen homofermentatif LAB'dir. Laktik asit üretimi, proteolitik aktivite, lipolitik aktivite, sitrat kullanımı ve bakteriyosin üretimi enterokokların gıda sanayi açısından önem taşıyan başlıca özellikleridir. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen genellikle üretici suşlarla yakından ilişkili türlere karşı antimikrobiyel aktivite gösteren peptit veya proteinler olarak tanımlanmaktadır. Enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler "enterosinler" olarak isimlendirilmektedir. Enterosinler yakın akraba türlere karşı etkili olmalarının yanı sıra *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* ve *Bacillus cereus* gibi önemli gıda patojenlerine karşı da antibakteriyel aktivite gösterebilmektedirler.

Son yıllarda tüketici beklentilerinin minumum işlem görmüş gıdalar yönünde eğilim göstermesi nedeniyle gıda endüstrisi kimyasal katkı maddeleri (koruyucular) yerine alternatif doğal gıda koruyucularının kullanılması yönünde yeni arayışlara yönelmiştir. Alternatif doğal gıda koruyucularının başında LAB tarafından üretilen geniş aktivite spektrumuna sahip bakteriyosinler gelmektedir. Enterokoklar tarafından üretilen enterosinler güçlü anti-listerial aktivitelerinden dolayı yoğun araştırmaların odağı haline gelmiştir. Diğer taraftan enterokoklar çoklu antibiyotik direnç gösterebilmeleri ve içerdikleri çeşitli virülens faktörler ile nozokomiyal (hastane kaynaklı) enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle starter veya probiyotik olarak kullanım potansiyeline sahip enterokok suşlarının güvenlik değerlendirilmesinin yapılması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında fermente sucuktan izole edilen anti-listerial aktiviteye sahip olduğu daha önce tespit edilmiş olan *Enterococcus mundtii* YB6.30 suşunun hem

teknolojik özellikleri (laktik asit üretimi, proteolitik aktivite, lipolitik aktivite ve nitrat redüktaz aktivitesi) incelenmiş hem de güvenlik değerlendirmesi (antibiyotik direnç, hemolitik aktivite, jelatinaz aktivitesi, virülens faktör genlerinin tespiti, biyogen amin üretimi ve amino asit dekarboksilaz genlerinin tespiti) yapılarak izolatın starter kültür veya yardımcı starter kültür olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Enterokokların Genel Özellikleri

Enterokoklar 1899 yılında Thiercelin tarafından ilk kez intestinal tabiatı sebebiyle “enterocoque” olarak tanımlanmıştır. Daha sonra 1903 yılında Thiercelin ve Jouhaud *Enterococcus* cinsi olarak tanımlanmasını önermişlerdir. Bununla birlikte 1933 yılında Lancefield streptokokların daha ileri sınıflandırılması için bir serolojik sistem geliştirmiş ve intestinal kaynaklı streptokoklar (daha önce *Enterococcus* cinsinde sınıflandırılmış olan) D grubu antijenine sahip oldukları için grup D’ye yerleştirilmiştir. Sherman 1937 yılında bu yerleştirmeye dayanarak streptokokları; viridans, piyojenik, laktik ve fekal (enterokoklar) olmak üzere dört gruba ayırmıştır. Bu ayrımla enterokoklar *Streptococcus* cinsinin bir alt bölümünü oluşturmuştur. 1984 yılında Schleifer ve Kilpper-Bälz DNA:DNA ve DNA:rRNA hibridizasyon tekniklerine dayanarak bu bakterilerin diğer streptokoklardan farklı olduğunu ve bu cinsteki dört türün fekal orijinli olduğunu kanıtlamış ve *Enterococcus* cinsi yeniden oluşturulmuştur (Khan vd., 2010).

Günümüze kadar *Enterococcus* cinsine ait 36 tür tanımlanmış ve enterokoklar 5 ana gruba ayrılmıştır. *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. silesiacus*, *E. termitis*, *E. caccae* “faecalis” grubunu, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. villorum*, *E. canis*, *E. ratti*, *E. asini*, *E. phoeniculicola*, *E. canintestini*, *E. thailandicus* “faecium” grubunu, *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. gilvus*, *E. pallens*, *E. hermanniensis*, *E. devriesei*, *E. viikkiensis* “avium” grubunu, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* “gallinarum” grubunu, *E. cecorum*, *E. columbae* “cecorum” grubunu oluşturmaktadır. *E. saccharolyticus*, *E. aquimarinus*, *E. sulfureus*, *E. dispar*, *E. italicus* ve *E. camelliae* ise bu gruplandırmanın dışında tutulmuştur (Byappanahalli vd., 2012). *Enterococcus* cinsi içinde *E. faecium* ve *E. faecalis* bilimsel çalışmalarda en çok karşımıza çıkan türleri oluşturmaktadır (İnoğlu ve Tuncer, 2013; Özden-Tuncer vd., 2013; Tuncer vd., 2014; Jahan vd., 2015; Rachon vd., 2016; Hwanhlem vd., 2017; Zommiti vd., 2018; Tsai vd., 2019).

Enterokoklar Gram pozitif, spor oluşturmeyan, katalaz negatif (bazı türleri pseudo-katalaz özellik gösterebilir), oksidaz negatif, sıvı besiyeri ortamında tekli, ikili veya kısa zincir şeklinde gelişme gösteren homofermantatif LAB'dir (Murray, 1990; Hardie ve Whiley, 1997; Doming vd., 2003; Klein, 2003; Hollenbeck ve Rice, 2012; Jaouania vd., 2015). Pigmentasyon türlere göre değişiklik göstermekle birlikte sarı pigment üreten türler *E. sulfureus*, *E. casseliflavus* ve *E. mundtii* olup pigmentli türler bitkilerden yaygın olarak izole edilmektedir (Collins vd., 1986; Martinez-Murcia ve Collins, 1991; Aarestrup vd., 2002).

Enterokokların optimum gelişme sıcaklıkları 35 °C olmasına rağmen pek çok türü 10 ile 45 °C aralığında gelişebilmektedir. Enterokoklar % 6.5 NaCl varlığında, pH 9.6'da ve 60 °C'de 30 dk ısıtılarda hayatta kalabilmektedirler. Enterokok türlerinin çoğu % 40 safra tuzu ortamında eskülünü hidrolize edebilme yeteneğine sahiptir (Hardie ve Whiley, 1997; Morrison vd., 1997; Franz vd., 2003; Foulquié Moreno vd., 2006; Fisher ve Phillips, 2009; Favaro vd., 2015; Penna vd., 2015; Zommiti vd., 2018).

Enterokoklar toprak, yüzey suları, okyanus suyu, kanalizasyon, bitkiler gibi farklı habitat alanlarından izole edilebilmesinin yanı sıra insanların ve hayvanların gastrointestinal kanalında baskın halde bulunmaktadır (Giraffa, 2002; Erol, 2007; Ogier ve Serror, 2008). Enterokokların gastrointestinal kanal ile ilişkisine dayanarak, bazı türleri sıklıkla et ve peynir gibi hayvansal orjinli gıdalardan izole edilebilmektedir (Franz vd., 1999; Giraffa, 2003; Akpınar-Kankaya vd., 2017). Yüksek sıcaklığa karşı tolerans göstermeleri ve olumsuz çevre koşullarında canlılıklarını korumalarından dolayı çeşitli enterokok suşları gıdalarda gelişebilmekte ve hijyen kalitesinin göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Giraffa, 2002). Diğer taraftan, enterokokların gıdalardaki varlığı sadece yetersiz hijyen indikatörü olarak değerlendirilmemeli ayrıca gıda mikrobiyotasının bir parçası olarak da göz önüne alınması gerekmektedir (Klein, 2003; İşleroğlu vd., 2008). Diğer LAB gibi enterokoklarda ısıtıl işlem görmüş et ürünlerinde yüksek sıcaklıklara karşı dirençli olma özelliğinden dolayı pastörizasyon sonrası canlı kalarak ya da dilimleme ve

paketleme gibi işlem basamaklarında çapraz kontaminasyona bağlı olarak üründe bozulmalara neden olmaktadır (Özmen-Toğay vd., 2011). Ancak bu olumsuz özelliklerin dışında enterokoklar sahip olduğu pek çok yararlı özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde starter/yardımcı starter kültür ve probiyotik olarak da kullanılabilir.

2.2. Enterokokların Teknolojik Özellikleri

Enterokoklar laktik asit üretimi, proteolitik aktivite, lipolitik aktivite, nitrat redüktaz aktivitesi ve bakteriyosin üretimi gibi çeşitli teknolojik özellikleriyle gıda sanayiinde büyük bir öneme sahiptir (Sarantinopoulos vd., 2001; Giraffa, 2003; Foulquié Moreno vd., 2006). Akdeniz ülkelerinde ham madde olarak koyun, keçi ve/veya inek sütünden imal edilen geleneksel peynirlerin mikrobiyotaları üzerine yapılan çalışmalar bu peynirlerin olgunlaşmasında enterokokların proteoliz, lipoliz ve sitrat yıkımı gibi teknolojik özellikleri ile bu ürünlere özgü tipik tat ve lezzetin oluşumunda önemli bir rol üstlendiklerini ortaya koymuştur (Coppola vd., 1990; Litopoulou-Tzanetaki ve Tzanetakis, 1992; Ledda vd., 1994; Giraffa vd., 1997; Manolopoulou vd., 2003). Ayrıca enterokoklar biyoteknolojik öneme sahip olan enterosin olarak adlandırılan özellikle *Listeria* türlerine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip küçük peptitler olan bakteriyosinleri üretme yeteneğine de sahiptirler (De Vuyst ve Vandamme, 1994; Özden-Tuncer vd., 2013; Gök-Charyyev vd., 2019).

2.2.1. Laktik asit üretimi

Enterokoklar glikoz ve laktozu homofermantatif laktik asit fermentasyonu ile pürivik asite dönüştürürler. Laktozu ve diğer karbonhidratları fosfoenolpirüvata bağlı fosfotransferaz (PEP-PTS) sistemi aracılığı ile hücre içine alırlar. Pürivattan da laktat dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla L-laktik asit oluştururlar (Giraffa, 2003; İşleroğlu vd., 2008).

Sütte enterokokların asit üretim yetenekleri genellikle düşüktür (İşleroğlu vd., 2008). Süt kaynaklı enterokokların asit oluşturma kapasitelerinin düşük olması

nedeniyle 37 °C'de 16-24 saat inkübasyon periyodundan sonra ancak sütün pH'sını 5.0-5.2'ye düşürebildikleri birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Andrighetto vd., 2001; Durlu-Ozkaya vd., 2001; Sarantinopoulos vd., 2001). Daha fazla asit oluşturma yeteneğinde olan *E. faecalis*, *E. faecium*'a göre asitliğe karşı da daha dayanıklıdır. *E. faecalis*'in yağsız sütün pH'sını 24 saatlik fermentasyon sonunda 4.5'e düşürdüğü tespit edilmiştir (Suzzi vd., 2000).

2.2.2. Proteolitik aktivite

Proteolitik enzim yardımıyla kazein hidrolizi sonucu peynir tekstüründe önemli değişiklikler gözlemlenmektedir. Bazı peptitler aroma oluşumuna katkıda bulunurken, istenmeyen acı-tatlandırıcı peptitler arzu edilmeyen lezzetlere yol açabilmektedir (Foulquié Moreno vd., 2006). Enterokokların proteolitik aktivite yeteneği çoğunlukla suştan suşa farklılık göstermektedir (Arizcun vd., 1997; Durlu-Ozkaya vd., 2001). LAB proteolizi ile ilgili yapılan çalışmalar *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cinsleri üzerine yoğunlaşmıştır (Pritchard ve Coolbear, 1993; Sousa vd., 2001). Kazein parçalanması ve peptid taşınmasına yol açan biyokimyasal olaylar *Enterococcus* cinsi de dahil olmak üzere diğer tüm LAB için de aynı olduğu düşünülmektedir. Literatürde proteolitik ve peptidolitik aktiviteleri belirlemek için yaygın olarak kabul edilen laboratuvar yöntemleri bulunmamakla birlikte, bu tür aktiviteler *E. faecalis* suşları hariç genellikle diğer *Enterococcus* türleri için düşüktür (Dovat vd., 1970; Arizcun vd., 1997; Macedo ve Malcata, 1997; Suzzi vd., 2000; Andrighetto vd., 2001).

Enterokoklarda proteolitik sistem ile ilgili ilk çalışma 1969 yılında Somkuti ve Babel tarafından yapılmış olup daha sonraki yıllarda ise birçok bilim insanı tarafından çalışmalar yürütülmüştür. Carrasco de Mendoza vd. (1989), substrat olarak sodyum kazeinat kullanılarak 61 *Enterococcus* suşunun hücre dışı proteolitik aktivitesini incelemişlerdir. Araştırmacılar proteolitik aktivitenin suşa ve zamana bağlı olduğunu bildirmişlerdir. 48 saat inkübasyon süresi sonunda *E. faecalis* türüne ait izolatların diğer türlere nazaran proteolitik aktivitelerinin daha yüksek olduğu, bu durumun 120. saatin sonunda daha

belirgin halde gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Andrighetto vd. (2001), geleneksel İtalyan peynirlerinden izole edilen 124 enterokok suşunun çoğunun sütte zayıf proteolitik aktivite gösterdiğini, ancak *E. faecalis* türüne ait olan 30 suşun daha yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer olarak Sarantinopoulos vd. (2001), tarafından yapılan çalışmada da *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans* türlerini içeren 129 izolatın düşük ekstrasellüler proteolitik ve peptidolitik aktiviteye sahip olduğu ancak diğer türler ile kıyaslandığı zaman *E. faecalis* izolatlarının genellikle daha yüksek proteolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Tuncer (2009), Tulum peynirinden izole edilen *E. faecalis* izolatlarının *E. faecium* ve *E. durans* izolatlarına nazaran proteolitik aktivitelerinin daha yüksek olduğunu rapor etmiştir.

2.2.3. Lipolitik aktivite

LAB genellikle diğer mikroorganizma gruplarına kıyasla zayıf lipolitik aktivite gösterdiği kabul edilmektedir. Bununla birlikte, LAB'nin lipolitik aktivitesinin birçok farklı peynirin özel aromasının belirlenmesinde önemli bir rol üstlendiği de düşünülmektedir. Enterokokların lipolitik aktivitesi ile ilgili literatürde sınırlı sayıda veri mevcuttur (Foulquié Moreno vd., 2006). Sarantinopoulos vd. (2001), proteolitik aktivitenin aksine enterokokların lipolitik aktivitelerinin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Enterokok türleri arasında *E. faecalis* ve kısmen de *E. faecium* ve *E. durans*'ın en lipolitik türler olduğu tespit edilmiştir (Sarantinopoulos vd., 2001; Durlu-Ozkaya vd., 2001). Diğer taraftan, süt orijinli enterokokların sütteki düşük ve çoğunlukla suşa bağlı lipolitik aktivitesi diğer bazı çalışmalarda da araştırılmıştır. Enterokokların esterolitik enzim aktiviteleri daha gelişmiş olup, lipolitik enzim sistemlerine göre daha etkilidir. Enterokoklar diğer LAB'nin birçok türünden daha yüksek esterolitik aktivite göstermektedir ve *E. faecium* enterokok türleri içersinde en esterolitik tür olarak bilinmektedir (Giraffa, 2003). El Soda (2002), *E. faecium*'un yağ asitleri 4-nitrofenil ve 2-nitrofenil türevlerine karşı esterolitik aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

2.2.4. Nitrat redüktaz aktivitesi

Organik azotun biyokimyasal oksidasyonunun son ürünü nitrattır (Mikuška ve Večeřa, 2003). Nitrat iyonları doğrudan toksik etkiye sahip değildir. Nitrat, bakteriyel nitrat redüktaz aktivitesi vasıtasıyla zararlı nitrit iyonlarına dönüşmektedir (Bories ve Bories, 1995). Nitrat pasif bir et kürlleme ajanıdır ve bu yüzden et ürünlerinde kürlleme reaksiyonlarının gerçekleşebilmesi için nitratin daha aktif formda olan nitrite indirgenmesi gerekmektedir (Terns vd., 2011). Bu indirgeme işlemi, ette var olan bakteriler tarafından veya nitrat redüktaz aktivitesi içeren bakterilerin ilavesi ile gerçekleşebilmektedir (Gray vd., 1981; Sebranek vd., 2007).

Et ürünlerinde temel bir katkı maddesi olarak kullanılan nitrit, karakteristik kürlenmiş et renginin, lezzet ve doku özelliklerinin geliştirilmesi ve özellikle *Clostridium botulinum* başta olmak üzere patojen mikroorganizmaların inaktivasyonu ve oksidatif acılaşıma oluşumunu engellediği için uzun yıllardır kullanılmaktadır (Ahn vd., 2004; Liu vd., 2010). Ancak, nitrit etteki sekonder aminlerle reaksiyona girerek kanserojen, teratojen ve mutajen özellikteki N-nitrozo bileşenlerin oluşumuna neden olabilmektedir (Pourazrang vd., 2002; Zanardi vd., 2002; Zarringhalami vd., 2009). N-nitrozo bileşenlerin oluşumu, kolorektal kanser başta olmak üzere bazı kanser türlerinin ortaya çıkma potansiyelini arttırabilmektedir (Santarelli vd., 2008). Et ürünlerinde nitrat ve nitritin etkilerini gösteren ve sağlık riski oluşturmayan alternatif doğal katkıların kullanımı araştırılmasına rağmen nitrat ve nitrit gibi geniş etki spektrum aktivitesine sahip herhangi bir katkı maddesi bulunamamıştır. Son yıllarda bu alanda mikrobiyal kaynaklardan, organik asitlerden, yüksek basınç, ışınlama ve engel teknolojisi uygulamalarından yararlanılması da dikkat çekicidir (Turp ve Sucu, 2016).

2.2.5. Bakteriyosin üretimi

Gram pozitif ya da Gram negatif bakteriler tarafından salgılanan ribozomal olarak sentezlenen küçük, katyonik, ampifilik, antimikrobiyel peptid veya

proteinlere “bakteriyosin” denilmektedir (Tagg vd., 1976; Nes vd., 1996; Foulquié Moreno vd., 2006; Akkoç vd., 2009; Desriac vd., 2010; Aguilar-Galvez vd., 2011; Nishie vd., 2012; Field vd., 2018; Gök-Charyyev vd., 2019; Da Costa vd., 2019). Bakteriyosinler genellikle bakteriyosin üreten bakteri ile yakın akraba türlere karşı antimikrobiyel aktivite göstermektedirler (Klaenhammer, 1993; Green vd., 1997; Cotter vd., 2005; Zendo vd., 2005; Drider vd., 2006). Bakteriyosinler zar geçirgenliğini etkileyerek veya replikasyon ve translasyon gibi temel hücre fonksiyonlarına müdahale ederek hedef organizmaların büyümesini inhibe edebilmekte veya tamamen ortadan kaldırmaktadır (Yang ve Konisky, 1984; Jung ve Sahl, 1991). Gram pozitif GRAS statüsüne sahip LAB tarafından üretilen bakteriyosinler son yıllarda güvenlik açısından gıda ve yem endüstrisinde toksik olmayan koruyucu olarak potansiyelleri nedeniyle büyük ilgi çekmektedir (Kolter vd., 1992; Vandenberg, 1993; Cleveland vd., 2001; Chatterjee vd., 2005; Cotter vd., 2005; Akçelik ve Tuncer, 2007; Tuncer, 2009; Özden ve Tuncer, 2010; Özden-Tuncer vd., 2013; Koral ve Tuncer, 2014; Tuncer vd., 2014; Ay ve Tuncer, 2016; Gök-Charyyev vd., 2019).

Enterokoklar genellikle enterosin olarak adlandırılan antibakteriyel peptitler (bakteriyosinler) üretirler (Franz vd., 2007; Poeta vd., 2008; Ahmadova vd., 2013; Özden-Tuncer vd., 2013; Lauková vd., 2016; Gök-Charyyev vd., 2019). Bunların çoğu *E. faecium* ve *E. faecalis*'e ait suşlarda tanımlanmaktadır (Foulquié Moreno vd., 2003). Bu bakteriyosin üreten enterokokların çoğu peynir ve et ürünlerinde biyo-koruyucu olarak kullanılmak üzere değerlendirilmektedir (Franz vd., 2003). Bakteriyosin üreten enterokoklar gıda fermentasyonunda ayrı bir öneme sahiptir. Örneğin, beyaz peynir üretimi esnasında ek bir starter kültür olarak *E. faecium* ilave edilmesi peynirin organoleptik niteliklerini arttırmaktadır (Sarantinopoulos vd., 2002). Bakteriyosin üreten enterokokların süt ve et ürünleri dahil olmak üzere birçok gıda ürününde *Listeria monocytogenes*'i kontrol altında tuttuğu görülmüştür (Giraffa, 1995; Nunez vd., 1997; Hugas vd., 2003; Lundén vd., 2004; Ananou vd., 2005; Molinos vd., 2005; Achemchem vd., 2006; Cossart ve Toledo-Arana, 2008; Hudson vd., 2012; Settanni vd., 2014). Ayrıca *Bacillus cereus* gibi diğer gıda kaynaklı patojenlere karşı da aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Oscáriz vd.,

1999; Osc  r  z ve Pisabarro, 2000; Mu  oz vd., 2004; Grande vd., 2006; Du vd., 2018; Gök-Charyyev vd., 2019).

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler amino asit dizilimleri, etki mekanizmaları, biyolojik aktiviteleri, ısı toleransları, modifiye aminoasit varlıkları ve salgı mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda dört ana grup altında sınıflandırılmaktadır (  izelge 2.1) (Klaenhammer, 1993; Diep ve Nes, 2002; Jeeveratnam vd., 2005; Zendo vd., 2010).

Çizelge 2.1. LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin sınıflandırılması

Grup I. Lantibiyotikler
Ia: Nisin benzeri lantibiyotikler. Katyonik ��zellik 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

Lactobacillus, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* gibi çeşitli LAB cinslerinden sınıf IIa bakteriyosinleri   rettikleri keşfedilmiştir (Ennahar vd., 2000). *Enterococcus mundtii* tarafından üretilen bakteriyosinler sınıf IIa antilisterial etkili pediosin benzeri gruba dahil olup bunlar sırasıyla mundtisin, mundtisin CRL 35 (  nceden enterosin CRL 35 olarak tanımlanan), mundtisin KS, mundtisin L ve mundtisin QU2'dir (Cui vd., 2012).

Mundtisin taze hindiba orjinli *E. mundtii* AT06 suşunda (Bennik vd., 1998), mundtisin CRL35 Arjantin peynirinden izole edilen *E. mundtii* CRL35/AT06 suşunda (Saadevra vd., 2004), mundtisin KS   imen silajından izole edilmiş olan *E. mundtii* NFRI 7393 suşunda (Kawamoto vd., 2002), mundtisin L yonca

filizinden izole edilen *E. mundtii* CUGF08 suşunda (Feng vd., 2009) ve mundtisin QU2 fermente soya fasulyesinden izole edilen *E. mundtii* QU2 suşunda (Zendo vd., 2005) tanımlanmıştır.

E. mundtii tarafından üretilen bir bakteriyosinin özelliklerini açıklayan ilk rapor Bennik vd. (1998), tarafından oluşturulmuş olup bakteriyosin mundtisinin *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* ve birtakım LAB'ni inhibe ettiği görülmüştür. Böylece mundtisinin gıdalarda biyo-koruyucu olarak kullanılma potansiyeli gündeme gelmiştir. Daha sonra birçok raporda *E. mundtii* tarafından üretilen bakteriyosinlerin özellikleri açıklanmıştır (Kawamoto vd., 2002; Saadevra vd., 2004; Zendo vd., 2005; Feng vd., 2009).

E. faecium CRL35 suşu tarafından üretilen daha önceleri enterosin CRL35 olarak da bilinen mundtisin CRL35 Arjantin peynirinden izole edilen antilisterial aktiviteye sahip pediosin benzeri bir bakteriyosindir (De Giori vd., 1983). Bu bakteriyosin ayrıca herpes simpleks virüs tip I ve II'ye karşı önemli bir aktivite göstermektedir (Wachsman vd., 1999, Wachsman vd., 2003). Bununla birlikte peynirde *E. mundtii* CRL 35'in 8-12 °C'de inkübasyon sıcaklığında 12 gün boyunca *L. monocytogenes* gelişimini engellediği gözlemlenmiştir. Mundtisin CRL35'in etki mekanizması yakın zamanda tanımlanmış olmasına rağmen, bugüne kadar NH₂-terminal sekansının sadece bir kısmı ortaya çıkarılmıştır (Farías vd., 1996; Minahk vd., 2003). Mundtisin CRL35 gen kümesinin tam dizisini raporlamışlar ve enterosin alanlarının varsayılan işlevini analiz edilmiştir (Saavedra vd., 2004).

E. mundtii NFRI 7393 tarafından üretilen IIa sınıfına ait antilisterial bir bakteriyosin olan mundtisin KS Kawamoto vd. tarafından 2002 yılında Tayland'da çimen silajından izole edilmiştir. Araştırmacılar mundtisin KS'nin LAB'ne ve gıda patojeni olan *Listeria*'ya karşı etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada mundtisin KS'nin biyokimyasal ve genetik karakterizasyonu yapılmış ve mundtisin KS amonyum sülfat çöktürme, iyon değişim kromatografisi ve katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırılmıştır. Mundtisin KS üretimi için gen kümesi (*mun* lokusu) klonlanmış ve DNA dizilimi *mun*

lokusunun *munA*, *munB*, *munC* olarak adlandırılan 3 genden oluştuğunu göstermiştir. *munA* geni, 58 aminoasitten oluşan mundtisin KS öncüsünü kodlarken, *munB* bakteriyosinin transferi ve işlenmesinde yer alan 674 aminoasitlik bir proteini kodlar. *munC* ise 98 aminoasitlik mundtisin KS bağışıklık proteinini kodlar. Aminoasit ve nükleotit sekansı, mundtisin KS'nin tam belirgin olmayan birincil yapısını ortaya koymuştur. Mundtisin KS, *E. mundtii* AT06 tarafından üretilen mundtisin AT06'ninkine benzer bir aminoasit sekansına sahip bir 43 amino asitlik bir peptid içerir. Mundtisin KS ve mundtisin AT06, son iki amino asidin kendi C terminallerinde ters çevrilmesiyle ayırt edilmektedir. Bu iki mundtisin, *E. coli*'de rekombinant peptitler olarak ifade edilmiş ve *L. plantarum* ve *L. curvatus* gibi bazı *Lactobacillus* suşlarına karşı aktivitede farklılık gösterdiği bulunmuştur. Mundtisin KS, *E. faecium*, *L. curvatus* ve *Lactococcus lactis* gibi heterojen konaklarda *mun* lokusu içeren rekombinant plazmit ile transformasyonla başarıyla aktarılmıştır. Yapılan araştırmanın sonucuna göre, *mun* lokusu, *E. mundtii* NFRI 7393'de 50 kb büyüklüğüne sahip pML1 plazmidi üzerinde kodludur.

Mundtisin QU2, Japonya'da yetiştirilen soya fasulyesinden izole edilen *E. mundtii* QU2 suşunda tanımlanmıştır (Zendo vd., 2005). Araştırmacılar bu çalışmada bakteriyosinin karakterizasyonu ve yapısal analizini gerçekleştirmişler ve daha sonra maksimum bakteriyosin üretimi için ortam bileşenleri ve pH gibi faktörleri optimizasyonunu çalışmışlardır. Bu rapor *E. mundtii* tarafından bakteriyosin üretimi için optimum koşulların araştırılması hakkındaki ilk rapordur.

Mundtisin L yonca filizlerinden izole edilen *E. mundtii* CUGF08'i tarafından üretilen *Listeria*'ya karşı yüksek düzeyde aktiviteye sahip yeni bir sınıf IIa bakteriyosindir (Feng vd., 2009).

E. faecium ve *E. faecalis* türleri tarafından üretilen bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalarda *L. monocytogenes* gelişimini kontrol altına almak üzere yapılmış pek çok çalışma olmasına rağmen *E. mundtii* türüne ait suşlar tarafından üretilen bakteriyosinlerin gıda uygulamalarına dönük sınırlı sayıda çalışma

bulunmaktadır (Ananou vd., 2005; Achemchem vd., 2006). Mung fasulyesi filizlerinde (Bennik vd., 1999) ve taze minas peynirinde (Pingitore vd., 2012) *E. mundtii*'nin *L. monocytogenes*'in biyokontrolünde kullanıldığını rapor edilmiştir.

2.3. Enterokoklarda Antibiyotik Direnç

Antibiyotik direnç bakterilerin antimikrobiyel bir ajanın öldürücü ya da üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Akpınar-Kankaya vd., 2017). Enterokoklar hem doğal (intrinsik) hem de kazanılmış (aktarılabılır) olmak üzere antibiyotiklere karşı 2 farklı tipte direnç gösterirler (Klare vd., 2001). Enterokoklar klinik olarak önemli birçok antibiyotiğe karşı direnç göstermektedir (Söyletir ve Çerikçioğlu, 1996; Holzapfel vd., 2002; Çıtak vd., 2004; Yoğurtçu ve Tuncer, 2013; Demirgöl ve Tuncer, 2017; Akpınar-Kankaya, 2017; Adifon, 2018). Enterokoklar çoğunlukla sefalosporin, sülfonamid, linkozamid, bazı β -laktam ve düşük düzey aminoglikozidlere karşı doğal direnç gösterirken; kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin, rifampisin, özellikle *E. faecium*'da ampicilin, yüksek seviyede aminoglikozidler, trimetoprim/sulfametaksazol ve glikopeptid (vankomisin ve teikoplanin) direnci ise aktarılabılır genetik elemanlar aracılığı ile kazanabilmektedir (Folquié Moreno vd., 2006; Ogier ve Serror, 2008; Barbosa vd., 2009). Enterokoklar antibiyotik direnci nedeniyle özellikle hastane enfeksiyonları açısından önemli patojenler haline gelmiştir. Antibiyotikler genellikle klinik hastalıkların tedavisi için bakteriyel enfeksiyonlara karşı terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır (Lukášová ve Šustáčeková, 2003).

İnsan-gıda zincirinde yer alan enterokokların, konjugatif antibiyotiğe direnç transpozonlarını ya da plazmitlerini taşıdıkları ve antibiyotiğe direnç özelliğini, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* gibi gıda kaynaklı patojenlere ya da gıda ortamında yaygın bulunabilen *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* ve *Leuconostoc mesenteroides* gibi bakterilere transfer edebildikleri belirtmektedirler (Franz vd., 1999). Gıda kaynaklı suşlar ile normal bağırsak florasında yer alan mikroorganizmalar arasında da gen aktarımları meydana gelebilmektedir. Bağırsaktaki mikrobiyel flora, konjugatif plazmitler, seks

feromonları ve transpozonlar aracılığıyla gen aktarımı yapabilmektedir. Böylece gıda kaynaklı bakteriler bağırsak mikroflorası mikroorganizmalarıyla gen aktarımı yönünden ardı kesilmeyen bir ilişki içinde olabilmekte ve bu durum antibiyotiklerin dirençliliğini daha da karmaşık hale getirmektedir (Von Wright ve Bruce, 2003).

2.4. Enterokokların Virülens Faktörleri

Enterokoklar sahip olduğu teknolojik ve probiyotik özelliklerin yanı sıra hastane ortamına kolaylıkla kolonize olmaları ve yaşamlarını sürdürmelerinden dolayı endokardit, merkezi sinir sistemi, üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, karın içi ve pelvik enfeksiyonlarına sebep olan nozokomiyal (hastane kaynaklı) patojenler olarak kabul edilmektedirler (Foulquié Moreno vd., 2006). Bu sebeple starter kültür veya yardımcı starter kültür olarak kullanılacak enterokok suşlarının endüstriyel özelliklerinin yanı sıra güvenlik değerlendirmelerinin (antibiyotik direnç, virülens faktör ve biyojen amin üretimi) de yapılması gerekmektedir (İnoğlu ve Tuncer, 2013).

Mikroorganizmaların hastalık yapıcı etkisini arttıran efektör moleküller virülens faktör olarak isimlendirilmektedir. Enterokoklarda antibiyotik direncin yanı sıra mikroorganizmaların hastalık yapabilme potansiyelini arttıran sitolizin/hemolizin, jelatinaz, agregasyon maddesi (Agg), adhezin kollajen (Ace, Acm), seks feromonları, adhezin benzeri endokarditis antijenleri (EfaA) ve hiyaluronidaz (Hyl) gibi virülens faktörleri de bulundurabilmektedir (Williems ve Bonten, 2007). Enterokoklar virülens faktörleri ile hastalıkların oluşmasında ve şiddetlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Pek çok çalışmada klinik enterokok izolatlarında virülens faktörler varlığı araştırılmış olmasına rağmen gıda kaynaklı enterokokların virülens faktörlerinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle son yıllarda gıda kaynaklı enterokokların antibiyotik direnç ve virülens faktörlerinin araştırıldığı çalışmalar ilgi odağı haline gelmiştir. Virülens faktörlerin varlığının yanı sıra yüksek seviyede antibiyotik direnci enterokokların patojenitesini güçlendirmektedir. Gıda kaynaklı enterokokların enfeksiyona yol açtığı hiç bildirilmemiş olmasına

rağmen virülens özellik taşıyan enterokok içeren gıdanın tüketilmesinin insanlara muhtemel bir geçiş yolu olduğu düşünülmektedir (Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017).

2.4.1. Sitolizin

Sitolizin enterokokların en iyi karakterize edilmiş virülens faktörlerinden biridir (Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017). Sitolizin Gram negatif bakterilere ve eritrositlere karşı bakteriyosidal etki, lökositler ve makrofajlara karşı toksik etki (özellikle beta hemoliz) gösteren bakteriyosin tipi bir ekzotoksindir (De Vuyst vd., 2003). Sitolizin üretimi *cylR1*, *cylR2*, *cylLl*, *cylLs*, *cylM*, *cylB*, *cylA* ve *cylI* olmak üzere sekiz gen içeren operonun sorumluluğundadır. Operon, güçlü bir şekilde korunmuş feromona bağımlı konjugatif plazmidler üzerinde veya yüzey proteini (Esp) ve agregasyon maddesi (AS) gibi virülens genler ile yakın ilişkili olarak kromozomal DNA üzerinde yer alan patojenite adasında bulunmaktadır (Eaton ve Gasson, 2001; Shankar vd., 2004).

Sitolizin kodlayan genler hem enfeksiyonlardan izole edilen suşlarda hem de komensal mikrobiyotayı oluşturan suşlarda tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra hayvan ve bitki kökenli gıda ürünlerinden de izole edilen suşlarda sıklıkla tanımlandığını gösteren bir dizi rapor bulunmaktadır. Sitolizin kodlayan genler *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus* ve *E. raffinosus* gibi türlerde tespit edilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Semedo vd., 2003a; Ben Omar vd., 2004; Franz vd., 2001; Trivedi vd., 2011).

2.4.2. Jelatinaz

Jelatinaz yaklaşık olarak 30 kDa moleküler ağırlığa sahip olan hücre dışı çinko-bağımlı metaloendopeptidazdır. Bu enzim jelatin, elastin, kollajen ve hemoglobini hidrolize edebilir (Archimbaud vd., 2002). Jelatinaz kromozom üzerinde yer alan *gelE* geni tarafından kodlanır. *gelE* geninin varlığı, hem klinik suşlarda hem de gıdalardan izole edilen enterokoklarda test edilen virülansın

belirleyicilerinden biridir. Genellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında görülür (Eaton ve Gasson, 2001; Upadhyaya vd., 2010; Banerjee ve Anupurba, 2015; Hemalatha vd., 2017).

2.4.3. Hücre duvarı adhezinleri

EfaA (endokardis antijeni) *E. faecalis* suşlarında *efA_{fs}* ve *E. faecium* suşlarında ise *efA_{fm}* geni tarafından kodlanan yaklaşık 34 kDa molekül ağırlığına sahip proteindir (Eaton ve Gasson, 2001; Sava vd., 2010). *efaA* geni, magnezyum iyonları tarafından düzenlenen ABC transporter (permeaz) kodlayan *afaCBA* operonunun bir parçasıdır (Abrantes vd., 2013). EfaA'ya homolog genlerin *E. avium*, *E. asini*, *E. durans* ve *E. solitarius* suşlarında mevcut olduğu genetik yöntemlerle tespit edilmiştir (Semedo vd., 2003b; Jiménez vd., 2013).

2.4.4. Ekstraselüler yüzey proteini

Yaklaşık 200 kDa moleküler ağırlığına sahip olan enterokokal yüzey proteini (Esp), tanımlanmış en büyük enterokok proteindir. Bu proteini kodlayan *esp* geni, antibiyotiklerin aktif çıkışından sorumlu proteinleri de içeren patojenite adası (PAI) üzerinde bulunur (Leavis vd., 2004). Bu durum muhtemelen *E. faecalis* ve *E. faecium* arasında yatay gen transferinin bir sonucudur. Esp proteini ile ilgili çalışmalar, hücreler arasında genetik materyalin değişmesinde önemli rol oynayabilen ve onların antibiyotiklere dirençlerini arttıran biyofilm oluşumuna katıldığını doğrular niteliktedir (Donlan ve Costerton, 2002; Foulquié Moreno vd., 2006; Latasa vd., 2006). *E. faecium*'da *esp* geni bulunmasının ampicilin, siprofloksasin ve imipenem'e karşı direnç ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Billström vd., 2008). Yapılan çalışmalar, yüzey proteininin varlığı ile vankomisin direnci arasında korelasyon olduğunu doğrular niteliktedir. Vankomisine dirençli klinik *E. faecium* suşlarının % 83.3'ünün *esp* geni içerdiğini göstermiştir (Ochoa vd., 2013). Ayrıca bu genlerin çoğu Billström vd. (2008), tarafından onaylanmış birçok ilaca karşı çoklu antibiyotik direnç göstermiştir. *esp* geninin *E. faecium* suşları arasında plazmid konjugasyonu ve *E. faecalis* suşları arasında ise kromozom-kromozom

transpozisyonel mutasyonu ile aktarılabilceği gösterilmiştir (Oancea vd., 2004).

2.4.5. Seks feromonları

Seks feromonları, zgn konjugatif plazmid ile ilişkili kısa, hidrofobik peptitlerdir (Clewell vd., 2000). Enterokoklarda seks feromonları kromozomal kodlu *cpd*, *cob*, *ccf* ve *cad* genleri tarafından determine edilmektedir (Clewell vd., 2002). Seks feromonları hücreler arasında plazmidlerin konjugatif transferini kolaylaştıran 7-8 amino asitlik küçük peptitlerdir (Chandler ve Dunny, 2004). Alıcılar tarafından salgılanan feromonlar donöre özgüdür ve konjugatif plazmid operonlarının ekspresyonunu indüklerler. Bir suş genellikle birkaç farklı feromon salgılayabilir. Feromonların kendileri dışında, her bir feromon bağımlı plazmid, ilgili feromona rekabetçi olan inhibitörler gibi davranan peptidlerin salgılanmasını kodlar. Feromonlar, donörün hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere bağlandığında, bu sinyal iletilir ve agregasyon maddesinin genini indükler (Clewell, 1993; Dunny vd., 1995). *asa1* geninin ifadesi, etkili plazmid transferini sağlayan hücre agregatlarının oluşumuyla sonuçlanır (Clewell vd., 2002). Ancak, feromonların tek rolü bu değildir; aynı zamanda insan nötrofilleri için kimyasal olarak cazip olabilirler ve süperoksitlerin (mutajenik maddeler) retimini başlatıp enflamatuar koşulları başlatırlar (Bhardwaj vd., 2008).

2.4.6. Kollajen bağlayan protein

ace geni tarafından kodlanan kollajen bağlayıcı protein yaklaşık 74 kDa moleküler ağırlığa sahip, yapışkan özellikte bir yüzey proteindir (Rich vd., 1999). Bu protein hem sağlıklı taşıyıcılardan hem de enterokok enfeksiyonu olan insanlardan izole edilmiş *E. faecalis* suşlarında tanımlanmıştır. Bu özelliğin tr tanısında kullanılabileceği ne sürülmüştür (Duh vd., 2001). Ace agregasyon maddesi proteini gibi hücre dışı matriksin proteinlerine bağlanarak kolonizasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Ace ayrıca bağlayıcı tip I ve IV kollajen yapısına katılmaktadır (Nallapareddy vd., 2000).

2.4.7. Hiyaluronidaz

Hiyaluronidaz *E. faecium* genomunda *hyl* geni tarafından kodlanan yaklaşık 45 kDa moleküler büyüklüğe sahip bir proteindir. *hyl* geni *E. faecalis* suşlarının kromozomal DNA'sında bulunamamıştır (Archimbaud vd., 2002). Enterokokal hiyalurodinaz *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* gibi diğer koklar tarafından sentezlenen hiyaluronidaz ile homologdur. Hiyaluronidaz bağ doku ve kıkırdak mukopolisakkaritlerinin tahrip edilmesinde rol oynayarak bakterinin yayılmasını teşvik eder. *hyl* geni klinik suşlar arasında çoğunlukla *E. faecium* izolatlarında bulunmaktadır. *hyl* geni *E. faecalis* izolatlarında ise çok nadir görülmektedir (Vankerckhoven vd., 2004). Bunun yanı sıra *hyl* geni gıda kaynaklı *E. casseliflavus*, *E. mundtii* ve *E. durans* gibi farklı türlere ait suşlarda da bulunmuştur (Trivedi vd., 2011; Akpınar- Kankaya, 2017; Adifon, 2018).

2.4.8. Agregasyon maddesi

Agregasyon maddesi, tanımlanan ilk enterokokal yüzey proteindir. Bu protein, 137 kDa moleküler ağırlıkta ve saç tokası benzeri bir yapıya sahiptir. Agregasyon maddesi, seks feromonlarının aracılık ettiği kolaylaştırılmış konjugasyon sistemi olarak adlandırılan büyük konjugatif plazmidler üzerinde kodlanan bir dizi yüksek oranda homolog adheziyi içerir (Strzelecki vd., 2011). Seks feromonları agregasyon maddesine katılırlar ve bir spesifik konjugatif plazmid ile etkileşime girerler. Bu süreç hücreler arasındaki genlerin konjugatif transferinde özel bir öneme sahiptir. Alıcının hücreleri tarafından salgılanan feromonların varlığında, donörün hücreleri alıcı hücre yüzeyinde ilgili bir EBS ligandına bağlanan agregasyon maddesini sentezler (Dunny vd., 1995). İşlem, hücreler arasında genetik materyalin değişimini kolaylaştıran bakteriyel hücrelerden oluşan büyük konjugatif agregatların oluşumuyla sonuçlanır. Belirli bir ligandın varlığında, teikoik asidinkine benzer bir yapıya sahip olan agregasyon proteini, bir süperantijenin özelliklerine sahip olabilmektedir (Kozłowicz vd., 2006; Wardal vd., 2010). Ayrıca sitolisin ve antibiyotik direnç determinantları gibi diğer enterokok virülens faktörlerinin plazmit aracılığı ile

yayılmasında rol oynar. Enterokoklarda tanımlanmış 20 feromona bağımlı plazmit bulunmaktadır. Bu plazmidlerde antibiyotik direnç ve agregasyon maddesi kodlayan genler birlikte bulunmaktadır. pAD1 (Asa1 proteini), pPD1 (Asp1 proteini) ve pCF10 (Asc10 proteini) konjugatif plazmidleri agregasyon maddesi proteinleri üretiminden sorumlu genleri taşıyan plazmidlerdir (Clewell, 2007; Dunny, 2007). Söz konusu agregasyon maddelerinin üretiminden sorumlu genler yüksek oranda korunmuş diziler içerirler ve % 90 oranında benzerlik gösterirler. pAM373 üzerinde kodlu *asa373* geni istisnaidir. Asa373 proteinini kodlayan bu gen dizisi yukarıda belirtilenlerden önemli ölçüde farklılık göstermektedir (Hendrickx vd., 2009). Sadece Asa373'nin alıcının aktif bağlayıcı maddeden yoksun hücrelerine bağlanabildiği görülmüştür (Suk-Kyung vd., 2006).

2.5. Biyojen Amin Üretimi

Biyojen amin (BA)'ler bitki, hayvan ve mikroorganizma metabolizması tarafından sentezlenen özellikle peynir, sosis, şarap ve balık gibi proteince zengin ve fermente tip gıdalarda amino asitlerin dekarboksilaz enzimleriyle dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların amino asit transaminaz enzimi ile deaminasyonu sonucu oluşan düşük moleküler ağırlıklı, bazik karakterli, biyolojik olarak aktif, alifatik, aromatik veya heterosiklik azotlu organik bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Askar ve Treptow, 1986; Ten Brink vd., 1990; Silla-Santos, 1996; Özoğul vd., 2004; Lorenzo vd., 2007; Latorre-Moratalla vd., 2012; Özdestan ve Üren, 2012; Suzzi ve Torriani, 2015; Ordóñez vd., 2017). Biyojen aminler oluşumlarının kaynağı olan amino asidin adına bağlı olarak histidinden histamin, tirozinden tiramin, triptofandan triptamin, lizinden kadaverin oluşmaktadır (Ercan vd., 2017). Biyojen aminler kimyasal yapılarına göre alifatik (putresin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatik (tiramin, feniletilamin) ve heterosiklik (histamin, triptamin) olarak sınıflandırılabilirler gibi amin gruplarına göre monoaminler (tiramin, feniletilamin), daminler (putresin, kadaverin) ve poliaminler (spermin, spermidin) olarak da sınıflandırılabilir (Akpınar-Kankaya vd., 2017).

Gıdalarda biyojen aminler genellikle mikroorganizmaların aktiviteleri sonucu oluşurlar. Biyojen aminlerin oluşması için ortamda serbest amino asitler, dekarboksilaz enzimi üretebilecek bakteri, dekarboksilaz enzimi ve bu enzimin uygun derişimde olması gerekmektedir. Dekarboksilaz enzimi mikroorganizmalar tarafından sentezlenir. Dekarboksilaz enzimi üreten mikroorganizma cinsleri *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* ve *Photobacterium*'dur. Ayrıca *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* gibi LAB'lerinin bir veya birden fazla amino asidi dekarboksile edebilme özelliğı bulunmaktadır (Karovicova ve Kohajdova, 2005; Galgano vd., 2009). Gıdalarda biyojen amin oluşumunu etkileyen faktörler arasında serbest amino asitlerin varlığı, mikroorganizmaların sinerjistik etkisi, yüksek dekarboksilaz enzim aktivitesi gösteren mikroorganizmaların varlığı ve bu mikroorganizmaların gelişebileceğı uygun ortam koşulları sayılabilmektedir (Özdestan ve Üren, 2012; Restuccia, 2017).

Biyojen aminler çeşitli biyolojik faktörler için gerekli olsalar da gıdalarla birlikte yüksek oranda tüketilmeleri toksik etkiye sebep olmaktadır. Düşük oranlarda biyojen amin içeren gıdaların tüketilmesi durumunda biyojen aminler amin oksidazlar yoluyla sindirim sisteminde fizyolojik olarak daha az aktif formlara dönüştürölmektedir. Ancak yüksek miktarlarda biyojen amin içeren gıdaların tüketilmesi veya çeşitli nedenlerle detoksifikasyonun engellenmesi sonucunda adrenalın ve noradrenalın salınımı mide asidi salgılanması, migren, taşikardi, kalp hastalıkları kan şekeri ve kan basıncının yükselmesi gibi ciddi problemlere neden olmaktadır (Shalaby, 1996; Talon ve Leroy, 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizma

Tez çalışmasında kullanılan fermente sucuktan izole edilen antilisterial aktiviteye sahip olduğu tespit edilen *Enterococcus mundtii* YB6.30 suşu Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bakteriyel Genetik Laboratuvarı Kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bakteriyosin üreticisi *E. mundtii* YB6.30 suşu de Man Rogosa and Sharpe broth (MRS, LAB M, Lancashire, UK) ortamında % 20 (v/v) steril gliserol ilave edilerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışma materyali ise gliserol ilave edilmemiş MRS broth ortamında +4 °C'de ve haftalık pasajlama yapılarak muhafaza edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. *E. mundtii* YB6.30 suşunun teknolojik özellikleri

3.2.1.1. Laktik asit üretimi

E. mundtii YB6.30 suşunun asit üretim yeteneği, rekonstitüe skim milk (RSM, LAB M) (% 11, w/v) ve MRS broth ortamlarında test edilmiştir. Yapılandırılmış yağsız süt ve MRS broth ortamlarına aktif YB6.30 kültüründen % 1 (v/v) oranında ekim yapılmış ve örnekler 30 °C ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0., 6. ve 24. saatleri sonunda besiyeri ortamlarından örnek alınarak kültür pH'sı pH metre (WTW 3110, Almanya) yardımıyla ölçülmüştür. Kültürün asit üretim yeteneği başlangıç pH değeri ile inkübasyon sonrası oluşan pH değerleri arasındaki fark (Δ pH) dikkate alınarak hesaplanmıştır (Özkalp vd., 2007). Çalışmada pH özelliği bakımından elde edilen veriler faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analiz tekniği ile analize edilmiştir. Uygulama faktörünün RSM ve MRS olmak üzere 2 seviyesi ve zaman faktörünün de 0., 6. ve 24. saat olmak üzere 3 seviyesi mevcuttur. Tekrarlanan ölçümler zaman

faktörünün seviyelerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada faktörlerin seviye ortalamaları arasındaki farklılıklarının belirlenmesinde Tukey testi kullanılmıştır.

3.2.1.2. Proteolitik aktivite

E. mundtii YB6.30 suşunun proteolitik aktivitesi kalsiyum kazeinat agar (Fluka 21065, İsviçre) ortamında belirlenmiştir. MRS broth ortamında geliştirilen kültürden mikropipet yardımıyla 10 µL kalsiyum kazeinat agar ortamına pipetlenmiş ve petri kutuları 37 °C'de 3 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda koloni etrafında zon oluşumu incelenmiş ve kumpas yardımıyla zon çapı ölçülmüştür (Martín vd., 2006).

3.2.1.3. Lipolitik aktivite

E. mundtii YB6.30 suşunun lipolitik aktivitesinin belirlenmesinde Spirit Blue agar (BD Difco) (Landeta vd., 2013), % 1 Tween 80 veya Tween 20 ilave edilmiş MRS agar (Essid vd., 2007) ve Tributyrin agar olmak üzere 4 farklı besiyeri ortamı kullanılmıştır. Her bir besiyerine aktif YB6.30 kültüründen mikropipet yardımıyla 10 µL kültür inoküle edilmiş ve petri kutuları 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda koloni etrafında opak zon oluşumu incelenmiştir.

Tributyrin agar

Peptone	5	g
Maya ekstratı	3	g
Trybutrin	10	g
Agar	15	g
Distile su	1000	mL

3.2.1.4. Nitrat redüktaz aktivitesi

E. mundtii YB6.30 suşunun nitrat redüktaz aktivitesi % 0.1 (w/v) oranında KNO₃ içeren YT agar ortamında belirlenmiştir (Miralles vd., 1996). YT agar besiyeri ortamına aktif YB6.30 kültüründen mikropipet yardımıyla 10 µL kültür pipetlenmiş ve koloni oluşumu için 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda nitrat reaktifi A (Fluka 38497) ve nitrat reaktifi B (Fluka 39441) eşit hacimde karıştırılarak kolonilerin üstü kapanacak şekilde petri kutularına aktarılmıştır. Reaktif ilavesini takiben koloni renginin kırmızıya dönmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Denemelerde nitrat redüktaz pozitif *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suşları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

YT Agar

Trypton	10	g
Maya ekstratı	5	g
Agar	5	g
KNO ₃	1	g
Distile su	1000	mL

3.2.2. *E. mundtii* YB6.30 suşunun güvenlik değerlendirmesi

3.2.2.1. Antibiyotik direnç

E. mundtii YB6.30 suşunun antibiyotik direnç profili disk difüzyon yöntemi kullanılarak Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2016) kılavuzuna göre değerlendirilmiştir. MRS broth ortamında 37 °C'de 18 saat geliştirilerek aktive edilen kültürden steril eppendorf tüpü içerisine 2 mL alınarak 5000 devirde 15 dakika santrifüjlenerek elde edilmiş pelet 1 mL fosfat tampon (PBS) ile yıkanmış ve bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir. Hazırlanan süspansiyonun yoğunluğu PBS ile 0.5 McFarland bulanıklık standardına ayarlanmıştır. Standardize edilen süspansiyondan 150 µL alınarak Mueller Hinton agar besiyeri (Biomark Laboratories, Hindistan) üzerine yayılmış ve üzerine ampisilin (10 µg), penisilin G (10 U), vankomisin (30 µg), teikoplanin

(30 µg), eritromisin (15 µg), tetrasiklin (30 µg), doksisiklin (30 µg), minosiklin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), levofloksasin (5 µg), norfloksasin (10 µg), nitrofurantoin (300 µg), rifampin (5 µg), kloramfenikol (30 µg), quinopristin-dalfopristin (15 µg), linezolid (30 µg), gentamisin (120 µg) ve streptomisin (300 µg) içeren antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Petri kutuları 37 °C'de 18 saat inkübasyona tabi tutulmuş ve süre sonunda inhibisyon zonları ölçülmüştür. Sonuçlar CLSI (2016) kılavuzuna göre değerlendirilmiştir. Disk difüzyon testlerinde *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.2.2. Hemolitik aktivite

E. mundtii YB6.30 suşunun hemolitik aktivite özelliği (% 5 v/v) koyun kanı içeren Columbia agar (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, İtalya) besiyeri ortamında test edilmiştir. MRS broth ortamında 37 °C'de 18 saat süre ile geliştirilen *E. mundtii* YB6.30 kültürü öze yardımı ile kanlı agar besiyeri ortamına sürülmüş ve Petri kutusu 37 °C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda gelişen kolonilerin çevresinde berrak zon oluşumu beta (β), bulanık yeşilimsi zon oluşumu alfa (α) ve zon oluşmaması gama (γ) hemolitik reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Cariolato vd., 2008). Denemelerde β -hemolitik *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.2.3. Jelatinaz aktivitesi

E. mundtii YB6.30 suşunun jelatinaz aktivitesinin belirlenmesinde % 3 (w/v) jelatin (Merck) ilave edilmiş Todd-Hewitt agar (Liofilchem) besiyeri kullanılmıştır. MRS broth ortamında 37 °C'de 18 saat süre ile geliştirilen enterokok kültürü hazırlanan Todd-Hewitt agar ortamına öze yardımı ile sürülmüş ve Petri kutusu 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Petri kutusu +4 °C'de 5 saat buzdolabında tutulmuştur. Soğuk uygulaması sonunda koloniler etrafında bulanık zon oluşumu jelatinaz aktivitesinin pozitif olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001). Denemede jelatinaz pozitif *E. faecalis* NYE7 suşu kontrol olarak kullanılmıştır (İnoğlu ve Tuncer, 2013).

3.2.2.4. Virölens faktör genlerinin polimeraz zincir reaksiyon (PZR) ile tespiti

3.2.2.4.1. Genomik DNA izolasyonu

E. mundtii YB6.30 suşunun genomik DNA izolasyonu Cancilla vd. (1992) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. *E. mundtii* YB6.30 suşu MRS broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat geliştirilmiştir. Gelişen kültürden 0.5 mL alınarak steril Eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Tüp 13000 devirde 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) işlemine tabi tutulmuş ve üst faz dökülmüştür. Hücre çökeltisi üzerine 0.5 mL liziz çözeltisi ilave edilmiş ve hücre çökeltisi çözülmüştür. Daha sonra, tüp su banyosu (Nüve NB9, Türkiye) içerisinde 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda tüpe 30 µL % 10'luk (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS, Serva, Heidelberg, Almanya) çözeltisi ilave edilmiş ve 80 °C'ye ayarlı su banyosunda (Daihan WB-22, Kore) 5 dakika tutulmuştur. Süre sonunda lize olan hücre süspansiyonu üzerine 1:10 (v/v) oranında hazırlanan fenol-kloroform karışımından 0.7 mL ilave edilmiş ve tüp 13000 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi takiben üst faz mikropipet yardımıyla alınarak yeni steril Eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Bu tüp üzerine 0.7 mL 2-propanol (Merck, Darmstadt, Almanya) ilave edildikten sonra tüp bir kez daha 13000 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda izole edilen genomik DNA çökeltisi 50 µL Tris-EDTA tamponu (pH 8.0) içerisinde çözülmüş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Liziz Çözeltisi

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

SDS (% 10)

SDS	10	g
Distile su	100	g

Tris-EDTA

Tris	0.121	g
EDTA	0.037	g
Distile su	100	mL
pH 8.0± 0.02		

3.2.2.4.2. Genomik DNA örneğinin elektroforezi

E. mundtii YB6.30 suşunun genomik DNA varlığı agaroz jel elektroforez yöntemi ile tespit edilmiştir. DNA örneğinin elektroforezi % 0.7 (w/w) agaroz (AppliChem GmbH., Darmstadt, Almanya) oranı ile hazırlanan jelde yapılmıştır. Elektroforez işleminde Thermo OWL EASYCAST B1A (ABD) yatay jel sistemi kullanılmıştır. Agaroz jel 35 mL trisasetat elektroforez tamponu içerisinde hazırlanmış ve mikrodalga fırın (Arçelik MD 565 S, Türkiye) yardımıyla çözülmüştür. Hazırlanan ortamın 45 °C'ye kadar oda sıcaklığında soğuması beklenmiş ve elektroforez tankına dökülmüştür. Daha sonra, jelin üst kısmına tarak yerleştirilmiş ve jelin polimerizasyonu için 30 dakika beklenmiştir. Jelin polimerizasyonunu takiben elektroforez tankına jelin üzerini kapatacak biçimde tris-asetat tampon çözeltisi ilave edilmiş ve jele zarar verilmeden tarak ortamdaki uzaklaştırılmıştır. 10 µL genomik DNA örneğine 2 µL marker boya çözeltisi ilave edilerek hazırlanan örnekler mikropipet yardımı ile jel kuyucuğuna aktarılmıştır. Elektroforez işlemi 65 volta 1-1.5 saat süreyle yapılmıştır. Süre sonunda elektrik akımı kesilmiş ve ortamdaki alınan jel, kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış 0.2 µg/mL etidyum bromit (Amresco Inc., Solon, OH, ABD) içeren çözeltisinde 30 dakika boyanmıştır. Boyama işleminin sonunda jel, UV transillüminatör (Vilber Lourmat, ECX-F20.M, Fransa) üzerinde incelenmiştir. Jel fotoğrafı çekiminde Nikon D500 dijital fotoğraf makinesi (Nikon Corp., Japonya) kullanılmıştır.

Tris-Asetat Tampon (1X)

Tris	4.84	g
Sodyum asetat	4.08	g
EDTA	0.37	g
Distile su	1000	mL
pH8.0± 0.02		

Maker Boya

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

3.2.2.4.3. Virülens genlerin tespiti

E. mundtii YB6.30 suşunda jelatinaz (*gelE*), hücre duvarı adhezinleri (*efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*), ekstraselüler yüzey proteini (*esp_{fm}*, *esp_{fs}*), seks feromonları (*cpd*, *cob*, *ccf*, *cad*), kollojen bağlayan protein (*ace*, *acm*), agregasyon proteini (*agg*), sitolizin (*cylM*, *cylB*, *cylA*) ve hiyaluronidaz (*hyl*) üretim özelliklerini kodlayan virülens faktörleri kodlayan genler polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır.

Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan PZR karışımı

Madde	Hacim
PCR master mix	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

E. mundtii YB6.30 suşunda virülens genlerin varlığının PZR ile araştırılmasında Eaton ve Gasson (2001), Vankerckhoven vd. (2004), Reviriego vd. (2005), Camargo vd. (2006) ve Ben Belgacem vd. (2010) tarafından önerilen PZR

koşulları kullanılmıştır. PZR denemelerinde kullanılan primerler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Virülens faktörlerin belirlenmesinde kullanılan primerler

Gen	Primer dizisi (5'-3')	Ürün boyutu (bp)	Kaynaklar
<i>gelE</i>	ACC CCG TAT CAT TGG TTT ACG CAT TGC TTT TCC ATC	419	Reviriego vd., 2005
<i>efaA_{fm}</i>	AAC AGA TCC GCA TGA ATA CAT TTC ATC ATC TGA TAG TA	735	Reviriego vd., 2005
<i>efaA_{fs}</i>	GAC AGA CCC TCA CGA ATA AGT TCA TCA TGC TGT AGT A	705	Reviriego vd., 2005
<i>esp_{fm}</i>	TTG CTA ATG CAA GTC ACG TCC GCA TCA ACA CTT GCA TTA CCG AA	955	Reviriego vd., 2005
<i>esp_{fs}</i>	TTG CTA ATG CTA GTC CAC GAC C GCG TCA ACA CTT GCA TTG CCG AA	933	Reviriego vd., 2005
<i>cpd</i>	TGG TGG GTT ATT TTT CAA TTC TAC GGC TCT GGC TTA CTA	782	Reviriego vd., 2005
<i>cob</i>	AAC ATT CAG CAA ACA AAG C GCG TCA TAA AGA GTGGTC AT	1405	Reviriego vd., 2005
<i>ccf</i>	GGG AAT TGA GTA GTG AAG AAG AGC CGC TAA AAT CGG TAA AAT	543	Reviriego vd., 2005
<i>cad</i>	TGC TTT GTC ATT GAC AAT CCG ACT TTT TCC CAA CCC CTC AA	1299	Reviriego vd., 2005
<i>ace</i>	AAA GTA GAA TTA GAT CCA CAC TCT ATC ACA TTC GGT TGC G	350	Ben Belgacem vd., 2010
<i>acm</i>	GGC CAG AAA CGT AAC CGA TA CGC TGG GGA AAT CTT GTA AA	353	Camargo vd., 2006
<i>agg</i>	AAG AAA AAG AAG TAG ACC AAC AAA CGG CAA GAC AAG TAA ATA	1553	Eaton ve Gasson, 2001
<i>cylM</i>	CTG ATG GAA AGA AGA TAG TAT TGA GTT GGT CTG ATT ACA TTT	742	Reviriego vd., 2005
<i>cylB</i>	ATT CCT ACC TAT GTT CTG TTA AAT AAA CTC TTC TTT TCC AAC	843	Reviriego vd., 2005
<i>cylA</i>	TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT TCT ACA GTA AAT CTT TCG TCA	517	Reviriego vd., 2005
<i>hyl</i>	ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA	276	Vankerckhoven vd., 2004

Virülens genlerin PZR ile tespitinde *acm*, *agg*, *gelE*, *efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*, *cdp*, *esp_{fm}*, *esp_{fs}*, *cob*, *ccf*, *cad*, *ace*, *cylM*, *cylB* ve *cylA* genleri için protokol 1 ve *hyl* geni için protokol 2 olmak üzere iki farklı protokol uygulanmıştır. Protokol 1’de bağlanma sıcaklıkları *acm* geni için 52 °C, *agg* geni için 56 °C ve *gelE*, *efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*, *cdp*, *esp_{fm}*, *esp_{fs}*, *cob*, *ccf*, *cad*, *ace*, *cylM*, *cylB* ve *cylA* genleri için ise 54 °C

olarak uygulanmıştır. PZR denemelerinde aşağıda verilen protokoller uygulanmıştır.

Protokol 1 (*acm, agg, gelE, efaA_{fm}, efaA_{fs}, cdp, esp_{fm}, esp_{fs}, cob, ccf, cad, ace, cylM, cylB* ve *cylA* genleri)

95 °C	5 dk	1 döngü
95 °C	30 sn	} 35 döngü
Uygun bağlanma sıcaklığı	30 sn	
72 °C	60 sn	
72 °C	10 dk	1 döngü

Protokol 2 (*hyl* geni)

95 °C	2dk	1 döngü
95 °C	30 sn	} 35 döngü
56 °C	90 sn	
72 °C	90 sn	
72 °C	10 dk	1 döngü

Çoğaltılan virülens genlerin PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi Thermo OWL EASYCAST B2 yatay elektroforez tankında % 1 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jelde yapılmış ve fragment büyüklükleri Genesta™ 100 bp DNA marker (GeneAll Bldg, GA-010, Seul, Kore) kullanılarak hesaplanmıştır. Jel kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış etidyum bromit içeren çözeltisinde 30 dakika boyanmıştır. Jel boyama işleminin sonunda UV transillüminatör (Vilber Lourmat) üzerinde incelenmiştir. Jel fotoğraflarının çekiminde Nikon D500 dijital fotoğraf makinesi kullanılmıştır.

3.2.2.5 Biyojen amin üretimi

E. mundtii YB6.30 suşunun biyojen amin üretim özelliklerinin belirlenmesinde Bover-Cid ve Holzapfel (1999), tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.

Hazırlanan bazal besiyerinin içerisine lizin, tirozin, ornitin veya histidin öncül amino asitleri ilave edilmiştir.

Dekarboksilaz Besiyeri (Bover-Cid ve Holzapfel1999)

Tripton	5	g
Maya ekstraktı	5	g
Et ekstraktı	5	g
NaCl	2.5	g
Glukoz	0.5	g
Tween 80	1	g
MgSO ₄	0.2	g
MnSO ₄	0.05	g
FeSO ₄	0.04	g
Amonyum sitrat	2	g
Tiamin	0.1	g
K ₂ HPO ₄	2	g
CaCO ₃	0.1	g
Pridoksal-5-fosfat	0.05	g
Amino asit	10	g
Brom krezol-purple	0.06	g
Agar	20	g
Destile su	1000	mL

pH 5.3 ±0.02 (sterilizasyondan önce)

Amino asit öncüleri ilave edilmeden temel besiyeri hazırlanmış ve ardından dört ayrı temel besiyeri bileşimine amino asit öncüleri (histidin, lizin, ornitin ve tirozin) ayrı ayrı ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerleri 121 °C'de 10 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Denemelerde tiraminojenik *E. faecalis* NYE54 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (İnoğlu ve Tuncer, 2013).

3.2.2.5.1. Aminoasit dekarboksilaz genlerinin PZR ile araştırılması

E. mundtii YB6.30 izolatında histidin (*hdc*), lizin (*ldc*), ornitin (*odc*) ve tirozin (*tdc*) dekarboksilaz genlerinin varlığı Çizelge 3.3.'de verilen primerler kullanılarak araştırılmıştır (De Las Rivas vd., 2006). PZR denemelerinde; 95 °C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu (1 döngü), 95 °C'de 30 saniye / 53 °C'de 30 saniye / 72 °C'de 2 dakika çoğaltma (30 döngü) ve 72 °C'de 20 dakika son uzama (1 döngü) aşamalarından oluşan protokol uygulanmıştır. Çoğaltılan amino asit dekarboksilaz genlerinin PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi % 1.5 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Biyojen amin üretiminin araştırılacağı denemelerde tiraminojenik *E. faecalis* NYE54 (*tdc*⁺) suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Dekarboksilaz genlerinin tespitinde kullanılan primerler

Gen	Primer dizisi (5' - 3')	Kaynak
<i>hdc</i>	GGNATNGTNWSNTAYGAYMGNGCNGA ATNGCDATNGCNSWCCANACNCCRTA	de las Rivas vd., 2006
<i>tdc</i>	TGGYTNGTNCCNCARACNAARCAYTA ACRTARTCNACCATRTTTRAARTCNGG	de las Rivas vd., 2006
<i>odc</i>	TWYMAYGCNGAYAARACNTAYTTYGT ACRCANAGNACNCCNGGNGGRTANGG	de las Rivas vd., 2006
	ATHWGN TWYGGNAAYACNATHAARAA GCNARNCCNCCRAAYTTNCCDATRTC	de las Rivas vd., 2006
<i>ldc</i>	CAYRTNCCNGGNCAYAA GGDATNCCNGGNGGRTA	de las Rivas vd., 2006

Y: C veya T; R: A veya G; W: A veya T; S: C veya G; M: A veya C; D: A, G veya T; H: A, C veya T; B: C, G veya T; N: A, C, G veya T.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. *E. mundtii* YB6.30 Suşunun Teknolojik Özellikleri

4.1.1. Laktik asit üretimi

Laktik asit üretim yeteneğinin belirlenmesi için *E. mundtii* YB6.30 suşu RSM (rekonstitüe skim milk) ve MRS broth ortamlarında 30 ve 37 °C'de kültüre edilmiş ve inkübasyonun 0., 6. ve 24. saatlerinde kültür pH'sı ölçülmüştür. *E. mundtii* YB6.30 suşunun RSM ve MRS broth ortamlarında 30 ve 37 °C'de inkübasyonun 0., 6. ve 24. saatlerinde ölçülen pH değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *E. mundtii* YB6.30 suşunun RSM ve MRS broth ortamlarında 30 ve 37 °C'de inkübasyonun 0., 6. ve 24. saatlerinde pH değerleri

Kültür ortamı*	Zaman (saat)	pH değeri	
		30 °C'de	37 °C'de
RSM	0	a**6.55±0.014Aa***	a6.51±0.014Ab
	6	a6.45±0.066Aa	a6.22±0.066Bb
	24	a5.99±0.018Ba	a5.65±0.018Cb
MRS	0	b6.50±0.014Aa	b6.46±0.014Ab
	6	a6.43±0.066Aa	b5.85±0.066Bb
	24	b5.09±0.018Ba	b4.75±0.018Cb

*RSM: rekonstitüe skim milk; MRS: de Man Rogosa and Sharpe broth

**Ortalamanın solundaki küçük harfler zaman x sıcaklık kombinasyonunda kültür ortamları arasındaki farklılığı göstermektedir.

***Büyük harfler kültür ortamı x sıcaklık kombinasyonunda zamanlar arası farklılığı, küçük harfler kültür ortamı x zaman kombinasyonunda sıcaklıklar arası farklılığı göstermektedir.

Cogan vd. (1997), iyi bir mezofilik starter kültürün süt ortamında 30 °C'de 6 saat inkübasyon sonunda pH'yı 6.6'dan 5.3'e düşürmesi gerektiğini belirtmiştir. *E. mundtii* YB6.30 suşu yalnız MRS broth ortamında inkübasyonun 24. saati sonunda pH'yı 5.3'ün altına düşürdüğü tespit edilmiştir. 30 °C'de inkübe edilen örneklerde pH 5.09±0.018'e ve 37 °C'de kültüre edilen örneklerde pH 4.75±0.018'e düşmüştür. Bu veriler ışığında *E. mundtii* YB6.30 suşunun RSM

ortamında 30 ve 37 °C'de inkübasyon sıcaklığında düşük asit üretim özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan, *E. mundtii* YB6.30 suşu MRS broth ortamında 37 °C'de 24. saat inkübasyon sonunda hızlı asit üretim özelliği göstermiştir. Bradley vd. (1992)'ne göre kültürlerin asit üretim özelliği besiyerlerinin başlangıç pH değeri ile inkübasyondan sonra oluşan pH değerleri arasındaki fark (Δ pH) dikkate alınarak, hızlı (Δ pH >1.5), orta (Δ pH 1.0 ile 1.5 arasında) ve yavaş (Δ pH <1.0) olarak tanımlanmaktadır. Bu kriterler dikkate alınarak *E. mundtii* YB6.30 suşunun RSM ortamında 30 ve 37 °C'de inkübasyonun 6. ve 24. saatleri sonunda Δ pH değeri birin altında olduğu için yavaş asit üretim yeteneği gösterdiği belirlenmiştir. MRS broth ortamında ise 30 ve 37 °C'de inkübasyonun 6. saatinde yavaş, 24. saati sonunda 30 °C'de orta ve 37 °C'de ise hızlı asit üretim özelliği göstermiştir.

Enterokok türlerinin sütte asit üretim yeteneği üzerine yapılan çalışmalar, asit üretiminin türe, suşa ve inkübasyon süresine göre farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Enterokoklar genel olarak yavaş veya orta düzeyde asit üretim yeteneğine sahiptirler. Morea vd. (1999), Mozeralla peynirinden izole edilen enterokok suşlarının 24 saat inkübasyonun sonunda sütün pH'sını 5.5'in altına düşmediğini tespit etmişlerdir. Durlu-Ozkaya vd. (2001), beyaz peynirden izole ettikleri enterokok izolatlarının genelde düşük asit üretim yeteneğine sahip olduklarını, süt ortamında 30 °C'de inkübe edilen izolatların sadece 8'inin 24. saatin sonunda pH'yı 5.0'ın altına düşürdüğünü bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada El Soda (2002), Mısır'daki farklı süt ürünlerinden izole ettiği 500 enterokok suşunun asidifikasyon özelliklerinin zayıf olduğunu bildirmiştir. Ambadoyiannis vd. (2004), 8'i bebek dışkısından izole edilen ve 8'i de çiğ keçi sütünden üretilen feta peynirinden izole edilen toplam 16 enterokok suşunun 37 °C'de sütte asidifikasyon yeteneklerini inceledikleri çalışmalarında izolatların 6, 16 ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda zayıf asit üretim yeteneğine sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar sadece bebek dışkısından izole edilen *E. faecalis* B20 ve B4 suşlarının inkübasyonun 16. saati sonunda ve peynirden izole edilen *E. faecalis* V1.1 suşunun ise inkübasyonun 24. saati sonunda pH'yı 5.2'nin altına düşüğünü gözlemlemişlerdir. Buna ek olarak araştırmacılar 16 suştan 13'ünün inkübasyonun 16. saati sonunda sütün pH'sını

5.8'in altına düşüremediğini, hatta çoğu suş için 24. saatin sonunda bile süt pH'sının 5.6'nın üzerinde olduğunu bildirmişlerdir.

Diğer taraftan enterokok izolatlarının 37 °C'de 16-24 saat inkübasyon sonunda süt pH'sını 5.0-5.2'nin altına düşürdüğünü bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (Suzzi vd., 2000; Sarantinopoulos vd., 2001, Tuncer, 2009; Banwo vd., 2013; Oladipo vd., 2015; Aspri vd., 2016). Esmer İtalyan peynirinden izole edilen *E. faecalis* suşlarında, 24 saatlik fermentasyondan sonra yağsız sütte pH 4.5'e kadar düşmüş ve yüksek bir asit üretim potansiyeli gözlemlenmiştir (Suzzi vd., 2000). Sarantinopoulos vd. (2001), yaptıkları çalışmada çeşitli kaynaklardan izole edilen 129 *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans* suşunun biyokimyasal ve teknolojik özelliklerini incelemişler ve *E. faecalis*'in genelde *E. faecium*'dan daha güçlü bir asitlendirici etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Tuncer (2009), Tulum peynirinden izole edilen 17 *E. faecium* izolatından 10'unun, 11 *E. durans* izolatından 5'inin ve 11 *E. faecalis* izolatından 3'ünün asidifikasyon yeteneklerinin iyi düzeyde olduğunu bildirmiştir. Banwo vd. (2013), inek sütünden izole edilen *E. faecium* suşlarının asit üretim yeteneğini incelemişler ortamın ilk pH'sı 6.54 olmasına karşın *E. faecium* CM4 suşu pH'yı 4.05'e kadar düşürürken 48 saatlik inkübasyon sonunda *E. faecium* 2CM1 suşu pH'yı 3.85'e kadar düşürmüştür. Suşlar MRS ortamında pH'yı 5'in altına düşürerek güçlü bir asitlendirme özelliği göstermiştir. Oladipo vd. (2015), RSM ortamı kullandıkları çalışmalarında inkübasyonun 6. ve 24. saati sonunda asit üretim yeteneğini inceledikleri *E. gallinarum* W211 suşunun besiyerinin pH'sını 24 saatte 5.8'den 4.8'e, *E. gallinarum* T71 suşunun ise pH'yı 24. saat sonunda 5.8'den 4.7'ye düşürerek iyi bir asitlendirme özelliği gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar *E. gallinarum* U82, *E. gallinarum* W184 ve *E. gallinarum* C103 suşlarının ise orta seviyede asit üretim yeteneği gösterdiğini rapor etmişlerdir. Aspri vd. (2016), yaptıkları çalışmada 189 enterokok suşundan 16'sının başlangıç pH değeri 6.90 olan süt ortamının pH'sını 6 saat sonra 5.99-5.51 aralığına düşürdüğünü, 24 saat sonra izolatların % 38'inin pH'yı 4.55-5.00 seviyelerine, % 56'sının ise 5.10-6.00'a düşürdüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar izolatların yalnız % 5'inin pH'yı 6'nın altına düşüremediğini bildirmişlerdir. Anagnostopoulos vd. (2018), yeşil zeytinden izole ettikleri

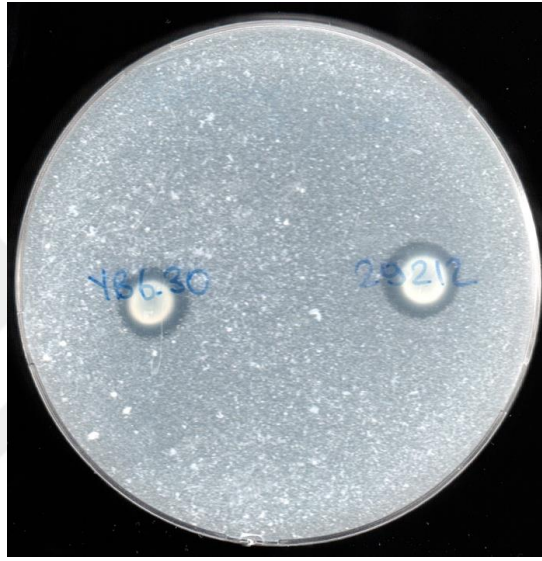
enterokok suşlarının hiçbirinin 6 saat inkübasyon sonunda sütün pH'sını 6.0'ın altına düşüremediğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar 24 saat inkübasyon sonunda 64 izolatın 9'unun sütün pH'sını 4.60'ın altında, izolatların 34'ünün 4.60 ile 5.10 arasında ve 21'inin 5.10'dan büyük olduğunu belirlemişlerdir.

Asit üretim yeteneği starter kültür seçiminde önemli bir kriterdir (Özkalp vd., 2007). Starter kültürler tarafından üretilen organik asitler bozulma yapan veya patojenik bakteriler gibi istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesini önlemekte hem de son ürünün organoleptik özelliklerinin oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Anagnostopoulos vd., 2018). Hızlı asit üretim yeteneğine sahip suşlar çoğunlukla starter kültür olarak kullanılırken, orta veya zayıf asit üretim yeteneğine sahip suşlar ise diğer teknolojik özelliklerine bağlı olarak yardımcı starter kültür olarak kullanılabilir (Ayad vd., 2004; Lee, 2005). Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar, fermente sucuktan izole edilen bakteriyosin üreticisi *E. mundtii* YB6.30 suşunun asit üretim yeteneği bakımından değerlendirildiğinde et ürünlerinin yanı sıra fermente süt ürünlerinin üretiminde de yardımcı starter kültür olarak starter kombinasyonlarında yer alabileceğini göstermektedir.

4.1.2. Proteolitik aktivite

E. mundtii YB6.30 suşunun proteolitik aktivitesi kalsiyum kaseinat agar kullanılarak belirlenmiştir. Deneme sonucu *E. mundtii* YB6.30 suşunun oluşturduğu koloni etrafında opak zon oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.1) ve YB6.30'un proteolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak Serio vd. (2010), 70 enterokok suşunun (34 *E. faecium*, 28 *E. faecalis* ve 8 *E. durans*) rekonstitüe skim milk agar ortamında proteolitik aktivite özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında 9 *E. faecalis*, 2 *E. faecium* ve 1 *E. durans* izolatının proteolitik aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ribeiro vd. (2014), plate count agar ortamına skim milk (%10 w/v) ilave edilerek hazırladıkları skim milk agar ortamında Pico peynirinden izole edilen bakteriyosin üreticisi 7 *E. faecalis* suşundan sadece *E. faecalis* L3A1M6 suşunun proteolitik aktivite

gösterdiğini bildirmişlerdir. Jaouani vd. (2015), 9 *E. faecium*, 8 *E. faecalis*, 3 *E. hirae* ve 2 *E. mundtii* olmak üzere 22 bakteriyosin üreticisi enterokok izolatından 3 *E. faecium* (L5, 59 ve 97) ve 2 *E. faecalis* (K4 ve 98) suşunun skim milk agar ortamında kazeini hidrolize ederek proteolitik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Aspri vd. (2016), eşek sütünden izole edilen enterokok izolatlarının skim milk agar ortamında proteolitik aktivite özelliklerinin test etmişler ve izolatların % 78'inin (56/72) besiyeri ortamında opak zon oluşturarak proteolitik aktivite pozitif özellik gösterdiğini rapor etmişlerdir.



Şekil 4.1. *E. mundtii* YB6.30 ve *E. faecalis* ATCC 29212 (pozitif kontrol) suşlarının kalsiyum kazeinat agar ortamında 37 °C'de 3 gün inkübasyon sonrası görüntüleri

Diğer taraftan Ben Belgacem vd. (2010), Tunus fermente et ürünü Gueddid'ten izole ettikleri antibakteriyel aktiviteye sahip 24 enterokok suşunun proteolitik aktivite özelliğini % 1.5 skim milk içeren triptik soy agar ortamında test etmişler ve suşların hiçbirinin kazeini hidrolize edemediğini belirlemişlerdir. Benzer olarak Landeta vd. (2013), İspanyol sosislerinden izole edilen 19 *E. faecium* izolatının hiçbirinin jelatin ve kalsiyum kazeinat agar ortamlarında proteolitik aktivite göstermediğini tespit etmişlerdir.

Proteoliz, fermente bir ürünün organoleptik özelliklerinin gelişimine katkıda bulunan temel endüstriyel özelliklerden biridir (Anagnostopoulos vd., 2018), bu

nedenle bakteriyosin üreticisi *E. mundtii* YB6.30 suşunun kalsiyum kazeinat agar ortamında proteolitik aktivite göstermesi starter/yardımcı starter kültür olarak kullanımı için bir avantajdır.

4.1.3. Lipolitik aktivite

E. mundtii YB6.30 suşunun lipolitik aktivite özelliği spirit blue agar, MRS agar (tween 80 veya tween 20 içeren) ve tributyrin agar olmak üzere farklı ortamlarda test edilmiş ve YB6.30 suşunun lipolitik aktivite göstermediği belirlenmiştir. Tezde elde edilen sonuca benzer olarak Jaouani vd. (2015), bakteriyosin üreticisi 9 *E. faecium*, 8 *E. faecalis*, 3 *E. hirae* ve 2 *E. mundtii* suşunun hiçbirinin tributyrin agarda lipolitik aktivite göstermediğini tespit etmişlerdir. Aspri vd. (2016), enterokok izolatlarının hiçbirinin tributyrin agar ortamında zon vermediğini bildirmişlerdir.

Diğer taraftan farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda enterokok izolatlarının lipolitik aktivite gösterdiğini bildiren çalışmalarda bulunmaktadır. Bu çalışmalarda genel olarak enterokokların düşük düzeyde lipolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Sarantinopoulos vd., 2001; Tuncer, 2009; Ribeiro vd., 2014; Oladipo vd., 2015; Čanigová vd., 2016; Anagnostopoulos vd., 2018). Sarantinopoulos vd., (2001), farklı kaynaklardan izole edilen 129 enterokok izolatının teknolojik özelliklerinin araştırıldığı çalışmalarında izolatların % 90'ının tributyrin substratlarını hidrolize ettiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar en lipolitik türün *E. faecalis* olduğunu ve bu türü *E. faecium* ve *E. durans*'ın izlediğini bildirmişlerdir. Benzer olarak Tuncer (2009), tulum peynirinden izole edilen 39 enterokok izolatının tamamının lipolitik aktivite gösterdiğini, *E. faecalis* türünün en lipolitik tür olduğunu ve bunu *E. faecium* ve *E. durans* türlerinin takip ettiğini rapor etmiştir. Ribeiro vd. (2014), bakteriyosin üreticisi 7 *Enterococcus* izolatından ikisinin tributyrin agar ortamında lipolitik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Oladipo vd. (2015), Nijerya geleneksel fermente gıda örneklerinden izole edilen 5 *E. gallinarum* izolatının tributyrin agar ortamında lipolitik aktivitelerini test etmişler ve izolatların 10 ile 12 mm arasında değişen çaplarda zon verdiğini belirlemişlerdir. Čanigová vd. (2016),

çiğ süttten izole ettikleri enterokok izolatlarının düşük lipolitik aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar izolatların tributyrin agar ortamında 7 ile 15 mm arasında değişen çapta zon verdiğini tespit etmişlerdir. Anagnostopoulos vd. (2018), tributyrin agar kullanarak sofralık zeytinlerden izole edilen enterokokların lipolitik aktivitesini incelemişler ve izolatların sadece % 20.31'inin (13/64) lipolitik aktivite testinde pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Lipolitik aktivite starter kültür olarak kullanılacak suşlarda arzu edilen bir özellik olmakla beraber yüksek lipolitik aktivite son ürünün organoleptik özelliklerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Morandi vd., 2006). Bu nedenle bakteriyosin üreticisi *E. mundtii* YB6.30 suşunun lipolitik aktivite göstermemesi starter kültür olarak kullanımı için bir dezavantaj değildir.

4.1.4. Nitrat redüktaz aktivitesi

E. mundtii YB6.30 suşunun nitrat redüktaz aktivitesi YT agar ortamında test edilmiş ve nitrat pozitif özellik gösterdiği belirlenmiştir. Benzer olarak Landeta vd. (2013), kurutulmuş İspanyol sosislerinden izole ettikleri enterokokların da nitrat redüktaz aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Et ürünlerinde temel bir katkı maddesi olarak kullanılan nitrit karakteristik kürlenmiş et renginin, lezzet ve doku özelliklerinin geliştirilmesi ve özellikle *Clostridium botulinum* başta olmak üzere patojen mikroorganizmaların inaktivasyonu ve oksidatif acılaşma oluşumunu engellediği için uzun yıllardır kullanılmaktadır (Ahn vd., 2004; Liu vd., 2010). Kurutularak olgunlaştırılan fermente sosislerde temel renk oluşumundan koagulaz-negatif stafilokoklar sorumlu olsada, tipik renk oluşum sürecinde nitratın nitrite indirgenmesinde LAB de rol oynamaktadır. Koagulaz-negatif stafilokoklara nazaran LAB düşük düzeyde nitrat redüktaz aktivitesi gösterse de, nitrat redüktaz aktivitesinin nitrozomiyoglobin oluşum mekanizmasına doğrudan dahil olması nedeniyle bu bakterilerde de nitrat redüktaz aktivitesinin araştırılması istenilmektedir (Ammor ve Mayo, 2007). Bu nedenle *E. mundtii* YB6.30 suşunun nitratı redükte etmesi teknolojik açıdan

önemlidir. Bu özellik *E. mundtii* YB6.30 suşunun fermente et ürünlerinde starter kültür kombinasyonlarında yer alması için bir avantajdır.

4.2. *E. mundtii* YB6.30 Suşunun Güvenlik Değerlendirmesi

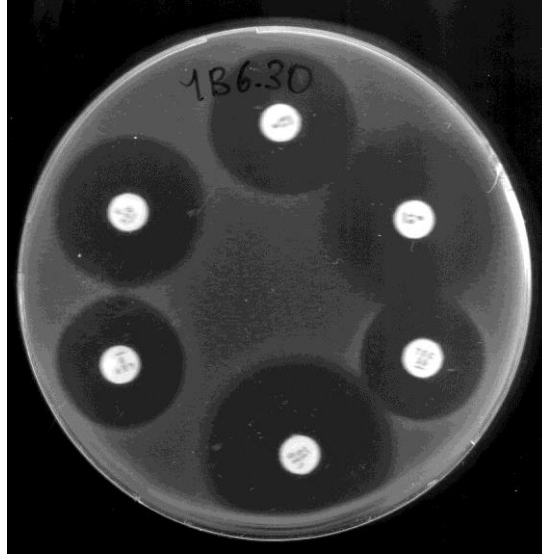
4.2.1. Antibiyotik direnç

Bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğine direnç denir (Tenover ve Hugles, 1996). Enterokokların antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç, patojenitelerine katkıda bulunan faktörlerden biridir (Shankar vd., 2004; Yoğurtcu ve Tuncer, 2013). Tez çalışması kapsamında bakteriyosinogenik *E. mundtii* YB6.30 suşunun antibiyotik direnç profili 18 ticari antibiyotik diski kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile test edilmiş ve YB6.30 suşunun denemelerde kullanılan antibiyotiklerin tamamına duyarlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. *E. mundtii* YB6.30 suşunun antibiyotik direnç profili ve disk difüzyon zon çapları

Antibiyotik	Disk Konsatrasyonu	<i>E. mundtii</i> YB6.30	
		Direnç profili*	Zon çapı (mm)
Ampisilin	10 µg	S	30
Penisilin G	10 U	S	28
Vankomisin	30 µg	S	21
Teikoplanin	30 µg	S	21
Eritromisin	15 µg	S	23
Tetrasiklin	30 µg	S	28
Doksisiklin	30 µg	S	29
Minosiklin	30 µg	S	29
Siprofloksasin	5 µg	S	22
Levoflaksasin	5 µg	S	22
Norfloksasin	10 µg	S	17
Nitrofurontoin	300 µg	S	24
Rifampin	5 µg	S	33
Kloramfenikol	30 µg	S	27
Quinopristin-dalfopristin	15 µg	S	21
Linezolid	30 µg	S	32
Gentamisin	120 µg	S	22
Streptomisin	300 µg	S	21

*S: Duyarlı



Şekil 4.2. *E. mundtii* YB6.30 suşunun eritromisin (15 µg), levofloksasin (5 µg), linezolid (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), penisilin G (10 U) ve teikoplanin (30 µg) antibiyotiklerine karşı disk difüzyon test sonuçları

Yousif vd. (2005), *Hussuwa*'dan izole ettikleri enterokok suşlarının tamamının ampicilin, gentamisin, kloramfenikol, tetrasiklin ve streptomisin'e karşı duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Diğer taraftan araştırmacılar izolatların penisilin, vankomisin, eritromisin ve siprofloksasin'e karşı ise dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Trivedi vd. (2011), çeşitli gıda kaynaklarından izole ettikleri enterokokların sefalotin (% 46), ofloksasin (% 38) ve eritromisine (% 10) karşı yüksek direnç gösterdiğini bildirmiştir. Klinik olarak önemli ampicilin, gentamisin ve teikoplanin gibi antibiyotiklere ise daha düşük direnç gösterdiklerini saptamışlardır. Ayrıca bu çalışmada test edilen suşlardan hiçbirinin vankomisine dirençli olmadığı tespit edilmiştir. Banwo vd. (2013), çiğ inek sütünden izole ettikleri bakteriyosin üreticisi *E. faecium* CM4 ve 2CM1 suşlarının antibiyotik direnç profillerini inceledikleri çalışmalarında, *E. faecium* CM4 suşunun vankomisine yüksek duyarlılık gösterdiğini ancak streptomisin, kloramfenikol, gentamisin, pefloksasin, siprofloksasin ve tetrasikline karşı orta derecede duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar *E. faecium* 2CM1 suşunun ise pefloksasine karşı dirençli, streptomisin, gentamisin, tetrasiklin ve vankomisinin de dahil olduğu 7 antibiyotiğe karşı ise orta seviyede duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Özden-Tuncer vd. (2013), bakteriyosin üreticisi *E. faecium* EYT17, EYT31 ve EYT39 suşlarının antibiyotik direnç profillerinin

belirlenmesinde disk difüzyon testi kullanmışlar ve suşların tamamının ampicilin, kloramfenikol, gentamisin, norfloksasin, penisilin, streptomisin, tetrasiklin, sülfametoksazol/trimetoprim ve vankomisine duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. *E. faecium* suşları yalnızca eritromisine orta seviyede dirençli bulunmuştur. Tuncer vd. (2014) yılında disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan antibiyotik direnç testi sonucu bakteriyosin üreticisi *E. faecalis* MYE58 suşunun denemelerde kullanılan 10 antibiyotikten streptomisin (300 µg) ve tetrasikline (30 µg) hariç denemelerde kullanılan diğer antibiyotiklere karşı duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Avcı ve Özden Tuncer (2017), geleneksel peynir örneklerinden izole ettikleri 11 bakteriyosin üreticisi enterokok suşunun tamamının gentamisin, teikoplanin, doksisisiklin, ampicilin, nitrofurantoin, linezolid ve levofloksasine karşı duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. *E. faecalis* MBE29-1 suşu hariç diğer tüm suşlar vankomisine karşı duyarlı bulunmuştur. Ancak diğer taraftan araştırmacılar sözkonusu suşlardan 6'sının çoklu antibiyotik direnç özelliği taşıdığını tespit etmişlerdir.

4.2.2. Hemolitik aktivite

E. mundtii YB6.30 suşunun hemolitik aktivite özelliği (% 5 v/v) koyun kanı içeren Columbia agar ortamında test edilmiştir. Hemolitik aktivite testi sonucu YB6.30 kolonileri etrafında opak zon oluşumu gözlemlenmemiş sonuç gama (γ) hemoliz olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bu bulguya benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da gıda kaynaklı enterokok izolatlarının hemolitik aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Özmen-Toğay vd., 2010; Malek vd., 2012; Banwo vd., 2013; Tuncer vd., 2014). Özmen-Toğay vd. (2010), fermente gıda maddelerinden izole edilen 68 *E. faecalis* ve 16 *E. faecium* suşlarının hiçbirinin β -hemolitik aktivite göstermediğini tespit etmişlerdir. Mısır peynirlerinden izole edilen 35 enterokok suşunun hiçbirinde hemolitik aktiviteye rastlanmamıştır (Malek vd., 2012). Banwo vd. (2013), çiğ süttten izole edilen bakteriyosin üreticisi *E. faecium* CM4 ve 2CM1 suşlarının hemolitik aktivite göstermediğini bildirmiştir. Tuncer vd. (2014), çiğ süttten izole ettikleri enterosin üreticisi *E. faecalis* MYE58 suşunun kanlı agarlı besiyerinde hemolitik aktivite özelliğini incelemişler ve hemolitik aktivite göstermediğini

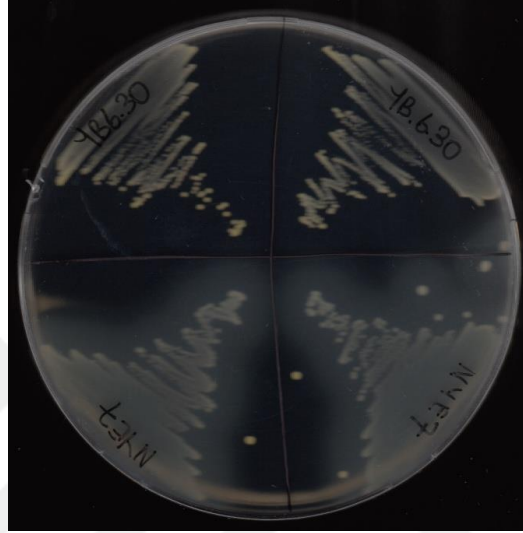
belirlemişlerdir. Anagnostopoulos vd. (2018), yeşil zeytinden izole edilen enterokok suşlarının hiçbirinin hemolitik aktivite göstermediğini rapor etmişlerdir.

Gıdalardan α ve β -hemolitik enterokok suşlarının izole edildiğini bildiren çalışmalarda bulunmaktadır. Eaton ve Gasson (2001), gıda kaynaklı enterokok isolatlarında β -hemolitik aktivite tespit etmişlerdir. Ambadoyiannis vd. (2004), feta peynirinden ve bebek dışkılarından izole ettikleri 7 *E. faecium* izolatından 6'sının β -hemolitik aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Trivedi vd. (2011), *E. faecalis* ve *E. faecium* isolatları arasında β -hemolitik aktiviteye sahip suşlar olduğunu bildirmişlerdir. Avcı ve Özden Tuncer (2017), geleneksel Türk peynirlerinden izole ettikleri bakteriyosin üreticisi 11 enterokok izolatından *E. faecium* MBE27-2, *E. faecium* MBE27-3 ve *E. faecalis* MBE29-3 suşlarının α -hemolitik, *E. faecalis* MBE1-9, *E. faecalis* MBE29-1, *E. faecalis* MBE31-4 ve *E. faecium* MBE12-3 suşlarının zayıf α -hemolitik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar *E. faecium* MBE15-2, MBE16-5, MBE22-2 ve *E. faecalis* MBE20-5 suşlarının ise hemolitik aktivite göstermediğini bildirmişlerdir. Gökmen vd. (2017), tüketime hazır gıdalardan izole edilen 114 enterokok izolatının 36'sının (22 *E. faecium*, 14 *E. faecalis*) hemolitik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Enterokoklarda hemolizin/sitolizin varlığı son derece dikkatlice kontrol edilmesi gereken bir özellik olup hemolitik aktivitenin olmaması süt endüstrisinde kullanılacak starter kültürlerin seçilmesinde önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir (Giraffa, 1995). Hemolizin üretimi enterokokal enfeksiyonların şiddetini artırabilmekte ve hemolizin üretimine katılan genlerin varlığı da bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Valenzuela vd., 2009). Gıda fermentasyonlarında starter kültür olarak kullanılacak olan suşların β -hemolitik aktivite göstermesi istenmeyen bir durumdur (Gomes vd., 2008). Bu nedenle *E. mundtii* YB6.30 suşunun hemolitik aktivite göstermemesi gıda üretim proseslerinde kullanılması için bir avantajdır.

4.2.3. Jelatinaz aktivitesi

E. mundtii YB6.30 suşunun jelatinaz aktivitesi % 3 jelatin içeren Todd-Hewitt agar besiyerinde test edilmiştir. İnkübasyonu takiben buzdolabında bekletilen Petri kutusu incelendiğinde koloni etrafında opak zon oluşumu gözlenmemiş ve sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *E. mundtii* YB6.30 ve *E. faecalis* NYE7 (pozitif kontrol) suşlarının jelatinaz test sonuçları

Gomes vd. (2008), Brezilya'da üretilen peynir, et, sebze ve süt ürünlerinden izole edilen suşların jelatinaz aktivitesini incelemişler ve sadece *E. faecalis* izolatlarının % 60'ının jelatinaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar *E. faecium*, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* izolatlarının ise jelatinaz aktivitesi göstermediğini bildirmişlerdir. Trivedi vd. (2011), et, süt ve meyve/sebze ürünlerinden izole ettikleri 250 enterokok izolatının jelatinaz aktivitesini incelemişler ve sadece etten izole edilen 1 *E. faecalis* izolatının jelatinaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Banwo vd. (2013), çiğ inek sütünden izole ettikleri bakteriyosin üreticisi *E. faecium* CM4 ve 2CM1 suşlarının her ikisinin de jelatinaz aktivitesi göstermediğini belirlemişlerdir. Tuncer vd. (2014), çiğ süttten izole edilen bakteriyosin üreticisi *E. faecalis* MYE58 suşunun jelatinaz negatif özellik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Avcı ve Özden-Tuncer (2017) yılında yaptıkları çalışmada ise izole ettikleri bakteriyosin

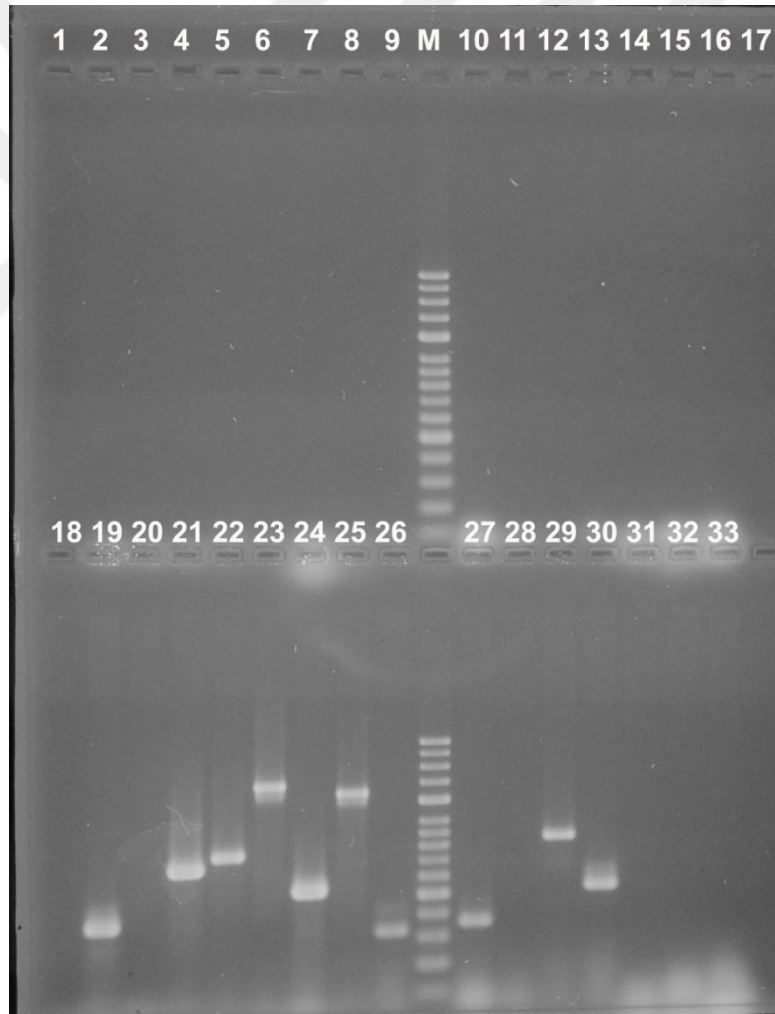
üreticisi 11 enterokok suşlardan sadece *E. faecalis* MBE29-3 suşunun Todd-Hewitt agarda jelatinaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Gökmen vd. (2017), tüketime hazır gıda maddelerinden izole ettikleri 114 enterokok izolatının hiçbirinin jelatinaz aktivitesi göstermediğini belirlemişlerdir. Diğer taraftan farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda gıda ve klinik kaynaklı enterokok izolatlarında jelatinaz aktivitesinin tespit edildiğini bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (Eaton ve Gasson, 2001; Cariolato vd., 2008; Manavalan vd., 2015).

Jelatinaz çinko içeren hücre dışı bir metalloproteinaz olup jelatin, kollojen, fibrinojen, kazein, hemoglobin, insülin ve bazı biyoaktif peptidlerin hidrolizine neden olmaktadır. Düzensiz metalloproteinaz aktivitesi kanser hücrelerinin invazyonu, artrit ve periodontit gibi patolojik durumlarla ilişkilendirilmektedir (Singh vd., 1998; Kanematsu vd., 1998; Dworniczek vd., 2003). *E. mundtii* YB6.30 suşunun jelatinaz aktivitesi göstermemesi starter kültür olarak kullanımı için bir avantajdır.

4.2.4. Virülens faktör genlerinin PZR ile araştırılması

Mikroorganizmaların hastalık yapıcı etkisini arttıran efektör moleküller virülens faktörler olarak isimlendirilmektedir (Mundy vd., 2000). Enterokoklar düşük virülens özellikli bakteriler olarak bilinmelerine rağmen son yıllarda artan nozokomiyal enfeksiyonların sorumluları arasında yer almaktadırlar. Gıda kaynaklı enterokokların virülens özellikleri klinik örneklerle göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Giraffa, 2002; Foulquié Moreno vd., 2006; İnoğlu ve Tuncer, 2013; Özden-Tuncer vd., 2013). Jelatinaz (*gelE*), hücre duvarı adhezinleri (*efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*), ekstraselüler yüzey proteini (*esp_{fm}*, *esp_{fs}*), seks feromonları (*cpd*, *cob*, *ccf*, *cad*), kollojen bağlayan protein (*ace*, *acm*), agregasyon proteini (*agg*), sitolizin (*cylM*, *cylB*, *cylA*) ve hiyaluronidaz (*hyl*) üretim özelliklerini kodlayan virülens faktörlerin genetik determinantlarının spesifik primerler kullanılarak araştırıldığı PZR çalışması sonucu *E. mundtii* YB6.30 suşunda virülens faktör genlerinin hiçbirinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4). *E. mundtii* YB6.30 suşunda *gelE* geni bulunmaması

jelatinaz aktivitesinin fenotipik olarak test edildiği deneme sonucunu desteklemektedir. Geçmiş yıllarda farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda fenotipik olarak jelatinaz aktivitesi göstermeyen ancak *gelE* geni (sessiz) varlığı tespit edilen enterokok izolatlarında bildirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Franz vd., 2001; Cariolato vd., 2008; Trivedi vd., 2011; Tuncer vd., 2014; Avcı ve Özden-Tuncer, 2017). Kanlı agar ortamında hemolitik aktivite göstermediği tespit edilen YB6.30 suşunda *cylM*, *cylB*, *cylA* genlerinin tespit edilmemesi fenotipik test sonucunu desteklemektedir. PZR denemeleri sonucu *E. mundtii* YB6.30 suşunda virülens faktör geni varlığı tespit edilmemiş olması gıda endüstrisinde kullanım için güvenli olduğunu göstermektedir.

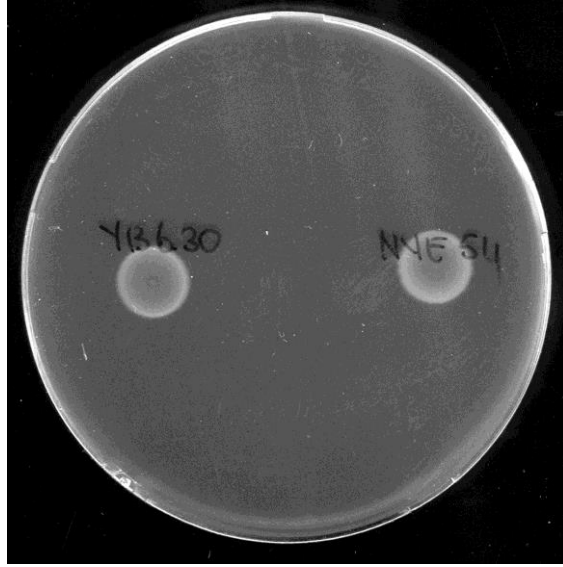


Şekil 4.4. *E. mundtii* YB6.30 ve *E. faecalis* ATCC 29212 suşlarında virülens genlerin PZR tespiti

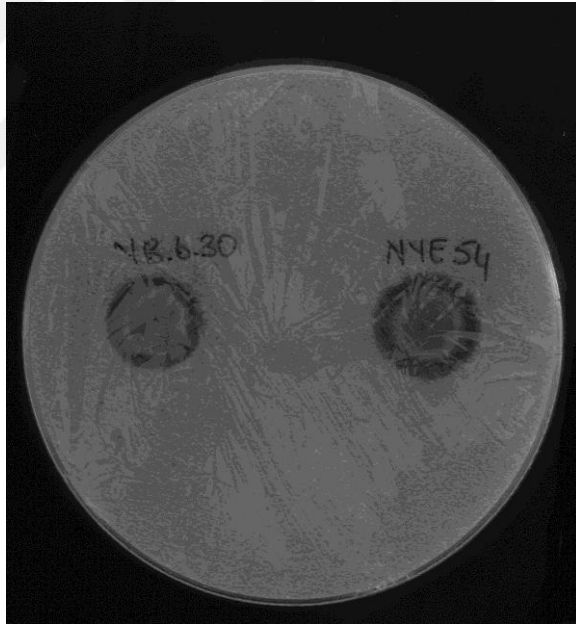
1	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>agg</i>)	: -
2	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>gelE</i>)	: -
3	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>efaA_{fm}</i>)	: -
4	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>efaA_{fs}</i>)	: -
5	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>cpd</i>)	: -
6	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>cob</i>)	: -
7	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>ccf</i>)	: -
8	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>cad</i>)	: -
9	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>ace</i>)	: -
M	Genesta™ 100 bp DNA Marker	: 2000, 1800, 1600, 1400, 1200 , 1000, 900, 800, 700, 600, 500 , 400, 300, 200, 100 bç
10	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>acm</i>)	: -
11	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>cylM</i>)	: -
12	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>cylB</i>)	: -
13	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>cylA</i>)	: -
14	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>hyl</i>)	: -
15	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>esp_{fm}</i>)	: -
16	<i>E. mundtii</i> YB6.30 (<i>esp_{fs}</i>)	: -
17	Negatif kontrol (su)	: -
18	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>agg</i>)	: -
19	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>gelE</i>)	: 419 bç
20	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>efaA_{fm}</i>)	: -
21	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>efaA_{fs}</i>)	: 705 bç
22	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>cpd</i>)	: 782 bç
23	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>cob</i>)	: 1405 bç
24	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>ccf</i>)	: 543 bç
25	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>cad</i>)	: 1299 bç
26	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>ace</i>)	: 350 bç
27	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>acm</i>)	: 353 bç
28	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>cylM</i>)	: -
29	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>cylB</i>)	: 843 bç
30	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>cylA</i>)	: 517 bç
31	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>hyl</i>)	: -
32	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>esp_{fm}</i>)	: -
33	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (<i>esp_{fs}</i>)	: -

4.2.5. Biyojen amin üretimi

Bakteriyosin üreticisi *E. mundtii* YB6.30 suşunun amino asit dekarboksilaz besiyerinde 4 farklı amino asit öncüsü kullanılarak yapılan biyojen amin üretim özelliğinin fenotipik olarak test edildiği denemeler sonucu, YB6.30 suşunun histidin (Şekil 4.5), lisin ve ornitin amino asitlerini dekarboksile etmediği ancak tirozini dekarboksile ederek tiramin ürettiği (Şekil 4.6) belirlenmiştir.



Şekil 4.5. *E. mundtii* YB6.30 ve *E. faecalis* NYE54 suşlarının histidin içeren dekarboksilaz besiyerinde 37 °C'de 5 gün inkübasyon sonrası görüntüleri



Şekil 4.6. *E. mundtii* YB6.30 ve *E. faecalis* NYE54 suşlarının tirozin içeren dekarboksilaz besiyerinde 37 °C'de 5 gün inkübasyon sonrası görüntüleri

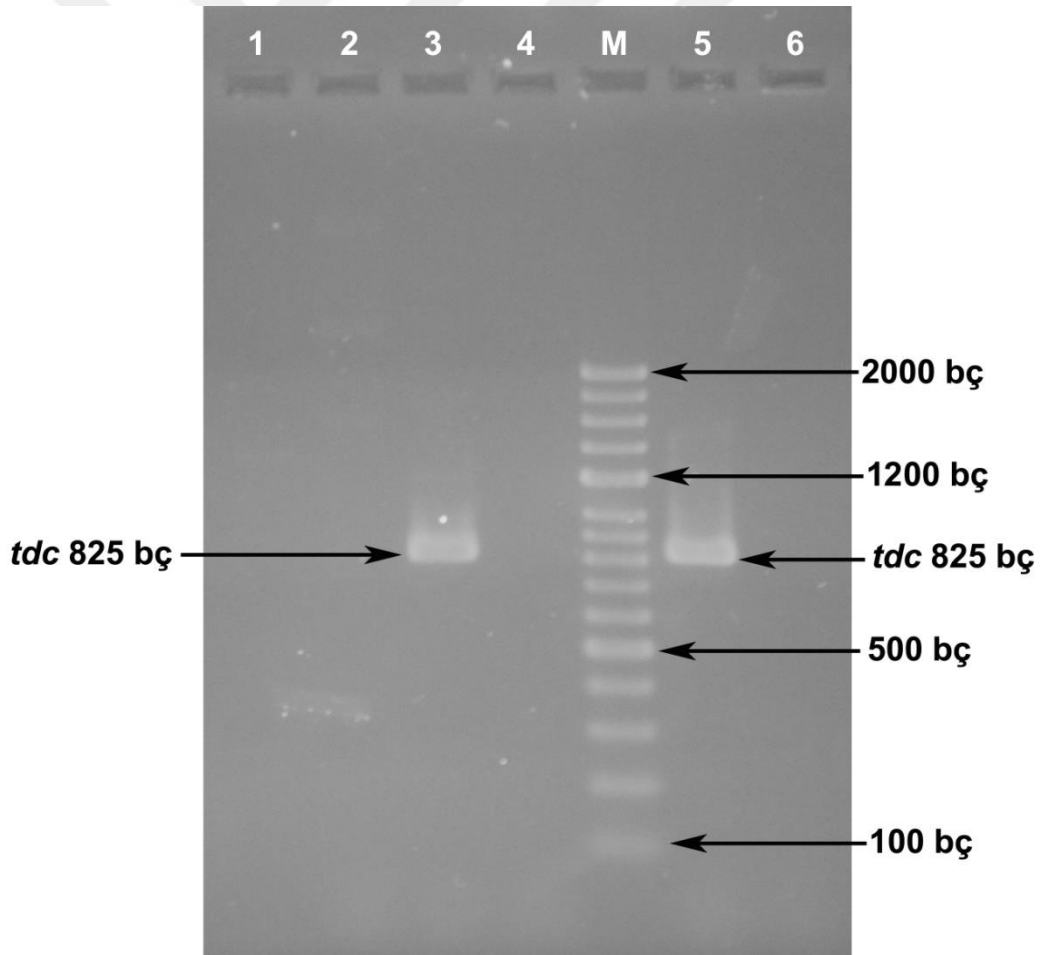
Mikroorganizmaların amino asit dekarboksilasyonu tür, suş ve çevresel koşullara göre farklılık göstermektedir. Bununla birlikte enterokoklarda tiramin üretiminin yaygın olarak tespit edildiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Andrighetto vd., 2001; Ambadoyiannis vd., 2004; Tuncer, 2009;

İnoğlu ve Tuncer, 2013; Yüceer ve Özden-Tuncer, 2015; Aspri vd., 2016; Avcı ve Özden-Tuncer, 2017; Zommiti vd., 2018). Andrighetto vd. (2001) İtalyan peynirinden izole edilen enterokok suşlarının hiçbirinin histidin, lizin ve ornitini dekarboksile edemediğinin tespit etmişlerdir. Ancak araştırmacılar *E. durans* izolatlarının tamamının, *E. faecalis* izolatlarının % 97.5'inin ve *E. faecium* izolatlarının % 77.8'inin tirozini dekarboksile ettiğini rapor etmişlerdir. Ambadoyiannis vd. (2004), inceledikleri izolatların hiçbirinin histamin, kadaverin veya putresin üretmediğini bununla birlikte, tiramin üretiminin *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* türleri için ortak bir özelliği olduğunu bildirmişlerdir. Tuncer (2009), yaptığı çalışmada 39 enterokok suşunun hiçbirinin histidin, lizin ve ornitini dekarboksile etmediğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte 39 suşun 36'sının (% 92.31) tiraminden tirozin ürettiği bulunmuştur. Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada İnoğlu ve Tuncer (2013) yılında yaptıkları çalışmada tulum peynirinden izole edilen 28 enterokok izolatının histidin, lizin ve ornitinin dekarboksile edemezken izolatların % 92.9'unun tirozini dekarboksile ederek tiramin ürettiği tespit edilmiştir. *E. faecium* suşunun tiramin üreticisi olduğunu bulmuştur. Yüceer ve Özden-Tuncer (2015), tarafından yapılan çalışmada sucuk örneklerinden izole edilen enterokokların hiçbirinin histidini, lizini ve ornitini dekarboksile etmediği ancak izolatların % 68'inin tirozini dekarboksile ettiği belirlenmiştir. Aspri vd. (2016), enterokok izolatlarının 7 gün inkübasyon süresi sonunda histidin veya ornitini dekarboksile edemezken, izolatların % 75'inin tirozini dekarboksile ettiğini tespit etmişlerdir. Avcı ve Özden-Tuncer (2017), yaptıkları çalışmada geleneksel Türk peynirlerinden izole ettikleri 11 enterokok suşunun 10'ununda tirozin dekarboksilaz aktivitesi tespit etmişlerdir.

Yüksek düzeyde biyojen amin tüketiminin organizmada çeşitli farmakolojik, fizyolojik ve toksik etkiler göstermesinden dolayı bakteriyosin üreticisi *E. mundtii* YB6.30 suşunun tirozin dışında test edilen diğer amino asitleri dekarboksile etmemesi bir avantajdır. Ancak söz konusu suşun tiramin üretim miktarının daha sonra yapılacak çalışmalar ile araştırılması gıda sistemlerinde kullanım güvenliğinin belirlenmesi için gerekmektedir.

4.2.5.1. Dekarboksilaz genlerinin PZR ile araştırılması

Histidin (*hdc*), lisin (*ldc*), ornitin (*odc*) ve tirozin (*tdc*) dekarboksilaz genlerinin araştırıldığı PZR denemesi sonucu *E. mundtii* YB6.30 suşunda sadece *tdc* geni varlığı tespit edilmiştir. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucu tirozin dekarboksilaz genine özgü 825 kb büyüklüğünde fragment elde edilmiştir (Şekil 4.6). PZR sonuçları amino asit dekarboksilaz besiyerinde elde edilen fenotipik test sonuçlarını desteklemektedir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da tiramin üretimi ile *tdc* geni varlığı arasında uyum olduğu bildirilmiştir (Bhardwaj vd., 2008; Kucerová vd., 2009; Kalhotka vd., 2012; İnoğlu ve Tuncer, 2013; Yüceer ve Özden-Tuncer, 2015; Avcı ve Özden-Tuncer, 2017).



Şekil 4.7. *E. mundtii* YB6.30 suşunda histidin (*hdc*), lisin (*ldc*), tirozin (*tdc*) ve ornitin (*odc*) dekarboksilaz genlerinin PZR amplifikasyonu

- | | | |
|---|--|--|
| 1 | <i>hdc</i> | : - |
| 2 | <i>ldc</i> | : - |
| 3 | <i>tdc</i> | : 825 bç |
| 4 | <i>odc</i> | : - |
| M | Genesta™ 100 bp DNA Marker (GeneAll) | : 2000, 1800, 1600, 1400, 1200 , 1000, 900, 800, 700, 600, 500 , 400, 300, 200, 100 bç |
| 5 | Pozitif kontrol <i>E. faecalis</i> NYE54 (<i>tdc</i> ⁺) | : 825 bç |
| 6 | Negatif kontrol (su) | : - |



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında *E. mundtii* YB6.30 suşunun teknolojik ve güvenlik değerlendirmesi yapılarak gıda endüstrisinde starter/yardımcı starter kültür olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır. *E. mundtii* YB6.30 suşu RSM ortamında 30 ve 37 °C'de düşük asit üretim özelliği gösterken MRS broth ortamında 37 °C'de 24. saat inkübasyon sonunda hızlı asit üretim özelliği göstermiştir. Asit üretim yeteneği starter kültür seçiminde önemli bir kriterdir ve hızlı asit üretim yeteneğine sahip suşlar starter, orta ve düşük seviyede asit üreten suşlar ise genellikle yardımcı starter kültür olarak kullanılmaktadır. Proteolitik aktivite fermente gıda üretiminde starter kültür olarak kullanılacak suşların belirlenmesinde kullanılan temel özelliklerden biridir. *E. mundtii* YB6.30 suşu kalsiyum kazeinat agarda proteolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Lipolitik aktivite starter kültür olarak kullanılacak suşlarda arzu edilen bir özellik olmakla beraber son üründe istenmeyen acı tat oluşumuna da neden olabilmektedir. Lipolitik aktivite testi sonucu *E. mundtii* YB6.30 suşunun lipolitik aktivite göstermediği belirlenmiştir. Nitrat redüktaz testi sonucu *E. mundtii* YB6.30 suşunun nitratı redükte ettiği tespit edilmiştir. Et endüstrisinde starter kültür olarak kullanılacak suşlarda nitrat redüktaz aktivitesi istenilen bir özelliktir.

Antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç enterokokların patojenitesine katkıda bulunan faktörlerden biridir. Enterokoklar klinik olarak öneme sahip antibiyotiklere karşı doğal ve kazanılmış direnç özellikleri gösterebilmektedir. Çalışma kapsamında bakteriyosinogenik *E. mundtii* YB6.30 suşunun denemelerde kullanılan klinik olarak öneme sahip hiçbir antibiyotiğe direnç göstermemesi bir avantajdır. *E. mundtii* YB6.30 suşunda hemolitik aktivite ve jelatinaz üretimi tespit edilmemiştir. PZR denemeleri ile *E. mundtii* YB6.30 suşunda 16 virülens faktör geni araştırılmış ve YB6.30 suşunun virülens faktör içermediği tespit edilmiştir. Hemolitik aktivite ve jelatinaz üretim özelliğinin araştırıldığı fenotipik ve genotipik test sonuçları arasında uyum olduğu belirlenmiştir. Amino asit dekarboksilaz denemesi sonucu *E. mundtii* YB6.30

suşunun denemelerde kullanılan amino asit öncüleri arasından yalnız tirozini dekarboksile ederek tiramin oluşturduğu belirlenmiştir.

Bakteriyosinogenik *E. mundtii* YB6.30 suşunun teknolojik özellikleri ve güvenlik değerlendirmesinin araştırıldığı denemelerde elde edilen sonuçlar doğrultusunda bu suşun gıda endüstrisinde starter/yardımcı starter kültür olarak kullanımın potansiyeli bulunduğu tespit edilmiştir. *E. mundtii* YB6.30 suşunun ileride yapılacak çalışmalar ile gıda üretim süreçlerinde denenmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Aarestrup, F.M., Butaye, P., Witte, W., 2002. Nonhuman Reservoirs of Enterococci. The enterococci American Society of Microbiology, 55-99.
- Abrantes, M.C., Kok, J., Lopes M.D.F., 2013. EfaR is a Major Regulator of *Enterococcus faecalis* Manganese Transporters and Influences Processes Involved in Host Colonization and Infection. Infection and Immunity, 81 (3), 935-944.
- Achemchem, F., Abrini, J., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in Goat's Milk and Goat's Jben by The Bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 Strain. Journal of Food Protection, 69 (10), 2370-2376.
- Adifon, D.E., 2018. Peynirden İzole Edilen Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli (YSAD) Enterokoklarda Virülens Faktörlerin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Aguilar-Galvez, A., Guillermo, S., Dubois-Dauphin, R., Campos, D., Thonart, P., 2011. The Influence of Growth Conditions on Enterocin-like Production by *Enterococcus faecium* CWBI-B1430 and *Enterococcus mundtii* CWBI-B1431 Isolates from Artisanal Peruvian Cheeses. Annals of Microbiology, 61 (4), 955-964.
- Ahmadova, A., Todorov, S.D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T.M., Kuliyeu, A., Chobert, J.M., Haertlé, T., Franco, B.D.G.M., 2013. Evaluation of Antimicrobial Activity, Probiotic Properties and Safety of Wild Strain *Enterococcus faecium* AQ71 Isolated from Azerbaijani Motal Cheese. Food Control, 30 (2), 631-641.
- Ahn, H.J., Kim, J.H., Jo, C., Lee, J.W., Yook, H.S., Byun, M.W., 2004. Combined Effects of Gamma Irradiation and a Modified Atmospheric Packaging on the Physicochemical Characteristics of Sausage. Radiation Physics and Chemistry, 71 (1-2), 53-56.
- Akçelik, M., Tuncer, Y., 2007. Preliminary Biochemical and Genetic Characterisation of the Bacteriocins Produced by Three *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Strains. Australian Journal of Dairy Technology, 62 (1), 19.
- Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M., 2009. Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi, 25 (1), 59-70.
- Akpınar Kankaya, D., Özden-Tuncer, B., Tuncer, Y., 2017. Gıda Kaynaklı Enterokokların Potansiyel Risk Faktörleri. The Journal Of Food, 42 (1), 8-19.

- Akpınar Kankaya, D., 2017. Hayvansal Gıdalardan İzole Edilen Vankomisin Dirençli *Enterococcus*, *Pediococcus* ve *Weissella* Suşlarının Potansiyel Risk Faktörlerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Araştırılması. Doktora Tezi, T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Ambadoyiannis, G., Hatzikamari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., 2004. Probiotic and Technological Properties of Enterococci Isolates from Infants and Cheese. Food Biotechnology, 18 (3), 307-325.
- Ammor, M.S., Mayo, B., 2007. Selection Criteria for Lactic Acid Bacteria to be Used as Functional Starter Cultures in Dry Sausage Production: An Update. Meat Science, 76 (1), 138-146.
- Anagnostopoulos, D., Bozoudi, D., Tsaltas, D., 2018. Enterococci Isolated from Cypriot Green Table Olives as a New Source of Technological and Probiotic Properties. Fermentation, 4 (2), 48.
- Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Valdivia, E., 2005. Control of *Listeria monocytogenes* in Model Sausages by Enterocin AS-48. International Journal of Food Microbiology, 103 (2), 179-190.
- Andrighetto, C., Knijff, E.D.O., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F., 2001. Phenotypic and Genetic Diversity of Enterococci Isolated from Italian Cheeses. Journal of Dairy Research, 68 (2), 303-316.
- Arbabi, L., Boustanshenas, M., Rahbar, M., Owlia, P., Adabi, M., Koohi, S.R., Afshar, M., Fathizadeh, S., Majidpour, A., Talebi-Taher, M., 2016. Antibiotic Susceptibility Pattern and Virulence Genes in *Enterococcus* spp. Isolated from Clinical Samples of Milad Hospital of Tehran, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 11 (3), 1-9.
- Archimbaud, C., Shankar, N., Forestier, C., Baghdayan, A., Gilmore, M.S., Charbonné, F., Joly, B., 2002. In Vitro Adhesive Properties and Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* Strains. Research in Microbiology, 153 (2), 75-80.
- Arizcun, C., Barcina, Y., Torre, P., 1997. Identification and Characterization of Proteolytic Activity of *Enterococcus* spp. Isolated from Milk and Roncal and Idiazabal cheese. International Journal of Food Microbiology, 38 (1), 17-24.
- Askar, A., Treptow, H., 1986. Biogene Amine In Lebensmitteln, Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. Ulmer
- Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., Papademas, P., 2016. Raw Donkey Milk as a Source of *Enterococcus* diversity: Assessment of Their Technological Properties and Safety Characteristics. Food Control, 73, 81-90.

- Avci, M., Özden-Tuncer, B., 2017. Safety Evaluation of Enterocin Producer *Enterococcus* sp. Strains Isolated from Traditional Turkish Cheeses. Polish journal of Microbiology, 66 (2), 223-233.
- Ay, Z., Tuncer, Y., 2016. Combined Antimicrobial Effect of Nisin, Carvacrol and EDTA against *Salmonella* Typhimurium in TSBYE at 4 °C and 37 °C. Romanian Biotechnological Letters, 21 (4), 11667.
- Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H., El-Soda, M., 2004. Selection of Wild Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Egyptian Dairy Products According to Production and Technological Criteria. Food Microbiology, 21 (6), 715-725.
- Barbosa, J., Ferraira, V., Teixeira, P., 2009. Antibiotic Susceptibility of Enterococci Isolated from Traditional Fermented Meat Products. Food Microbiology, 26 (5), 527-532.
- Banerjee, T., Anupurba, S., 2015. Prevalence of Virulence Factors and Drug Resistance in Clinical Isolates of Enterococci: A Study from North India. Journal of Pathogens, 2015.
- Banwo, K., Sanni, A., Tan, H., 2013. Technological Properties and Probiotic Potential of *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Cow Milk. Journal of Applied Microbiology, 114 (1), 229-241.
- Bauer, F., Seus, I., Paulsen, P., Vali, S., 1994. The Formation of Biogenic Amines in Meat and Meat Products. 40 th International Congress of Meat Science and Technology, Netherlands.
- Ben Belgacem, Z., Abriouel, H., Omar, N.B., 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 (4), 462-470.
- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Perez-Pulido, R., 2004. Functional and Safety Aspects of Enterococci Isolated from Different Spanish Foods. Systematic and Applied Microbiology, 27 (1), 118-130.
- Bennik, M.H., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L.G., Smid, E.J., 1998. A Novel Bacteriocin with a YGNGV Motif from Vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: Full Characterization and Interaction with Target Organisms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1373 (1), 47-58.
- Bennik, M.H.J., Van Overbeek, W., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., 1999. Biopreservation in Modified Atmosphere Stored Mungbean Sprouts: The Use of Vegetable-associated Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria to Control

the Growth of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 28 (3), 226-232.

Bhardwaj, A., Malik, R.K., Chauhan, P., 2008. Functional and Safety Aspects of Enterococci in Dairy Foods. Indian Journal of Microbiology, 48 (3), 317-325.

Billström, H., Lund, B., Sullivan, A., Nord, C.E., 2008. Virulence and Antimicrobial Resistance in Clinical *Enterococcus faecium*. International Journal of Antimicrobial Agents, 32 (5), 374-377.

Bories, P.N., Bories, C., 1995. Nitrate Determination in Biological Fluids by an Enzymatic One-Step Assay with Nitrate Reductase. Clinical Chemistry 41 (6), 904-907.

Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H., 1999. Improved Screening Procedure for Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria. International Journal of Food Microbiology, 53 (1), 33-41.

Bradley R.L., Arnold E., Barbano D.M., Semerad R.G., Smith D.E., Vines B.K., 1992. Chemical and Physical Methods. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16, 433-531.

Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., Harwood, V.J., 2012. Enterococci in the Environment. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 76 (4), 685-706.

Camargo, I.L.B.C., Gilmore, M.S., Darini, A.L.C., 2006. Multilocus Sequence Typing and Analysis of Putative Virulence Factors in Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Sensitive *Enterococcus faecium* Isolates from Brazil. Clinical Microbiology and Infection, 12 (11), 1123-1130.

Cancilla, M.R., Powell, I.B., Hillier, A.J., Davidson, B.E., 1992. Rapid Genomic Fingerprinting of *Lactococcus lactis* Strains by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction with 32P and Fluorescent Labels. Applied and Environmental Microbiology, 58 (5), 1772-1775.

Čanigová, M., Ducková, V., Lavová, M., Bezeková, J., Kročko, M., 2016. Selected Technological Properties and Antibiotic Resistance of Enterococci Isolated from Milk. Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences, 10 (1), 518-523.

Capozzi, V., Ladero, V., Beneduce, L., Fernández, M., Alvarez, M.A., Benoit, B., Laurent, B., Grieco, F., Spano, G., 2011. Isolation and Characterization of Tyramine-Producing *Enterococcus faecium* Strains from Red Wine. Food Microbiology, 28 (3), 434-439.

Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A., 2008. Occurrence of Virulence Factors and Antibiotic Resistances in *Enterococcus faecalis* and

Enterococcus faecium Collected from Dairy and Human Samples in North Italy. Food Control, 19 (9), 886-892.

- Carrasco de Mendoza, M., Meinardi, C.A., Meinardi, S.A., Arturo, C., 1989. Actividad Caseinolítica Exocelular de Enterococos Para Starters Lácticos. Revista Argentina de Lactología, 2, 27-37.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Anna Zadernowska, A., Łaniewska-Trokenheim, Ł., 2017. Virulence Factors of *Enterococcus* spp. Presented in Food. LWT, 75, 670-676.
- Chandler, J.R., Dunny, G.M., 2004. Enterococcal Peptide Sex Pheromones: Synthesis and Control of Biological Activity. Peptides, 25 (9), 1377-1388.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., Van Der Donk, W.A., 2005. Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics. Chemical Reviews, 105 (2), 633-684.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L., 2001. Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. International Journal of Food Microbiology, 71 (1), 1-20.
- Clewell, D.B., 1993. Bacterial Sex Pheromone-Induced Plasmid Transfer. Cell, 73 (1), 9-12.
- Clewell, D.B., An, F.Y., Flannagan, S.E., Antiporta, M., Dunny, G.M., 2000. Enterococcal Sex Pheromone Precursors are Part of Signal Sequences for Surface Lipoproteins. Molecular Microbiology, 35 (1), 246-247.
- Clewell, D.B., Francia, M.V., Flannagan, S.E., An, F.Y., 2002. Enterococcal Plasmid Transfer: Sex Pheromones, Transfer Origins, Relaxases and the *Staphylococcus aureus* Issue. Plasmid, 48 (3), 193-201.
- Clewell, D.B., 2007. Properties of *Enterococcus faecalis* Plasmid pAD1, a Member of a Widely Disseminated Family of Pheromone-Responding, Conjugative, Virulence Elements Encoding Cytolysin. Plasmid, 58 (3), 205-227.
- CLSI, 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S26 CLSI, Wayne, PA.
- Cogan, B.T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., BianchiSalvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodriguez, E., 1997. Characterization of The Lactic Acid Bacteria in Artisanal Dairy Products. Journal of Dairy Research, 64, 409-421.
- Collins M.D, Farrow J.A.E, Jones D., 1986. *Enterococcus mundtii* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 36 (1), 8-12.

- Comerlato, C.B., Resende, M.C., Caierão, J., D'azevedo, P.A., 2013. Presence of Virulence Factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Susceptible and Resistant to Vancomycin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108 (5), 590-595.
- Coppola, S., Villani, F., Coppola, R., Parente, E., 1990. Comparison of Different Starter Systems for Water-Buffered Mozzarella Cheese Manufacture. *Le lait*, 70 (5-6), 411-423.
- Cossart, P., Toledo-Arana, A., 2008. *Listeria monocytogenes*, a Unique Model in Infection Biology: An overview. *Microbes and Infection*, 10 (9), 1041-1050.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food. *Nature Reviews Microbiology*. 3 (10), 777-788.
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Cui, H., Qu, X., 2012. Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (12), 16668-16707.
- Çıtak, S., Yucel, N., Orhan, S., 2004. Antibiotic Resistance and Incidence of *Enterococcus* species in Turkish White Cheese. *International journal of dairy technology*, 57 (1), 27-31.
- Da Costa, R.J., Voloski, F.L., Mondadori, R.G., Duval, E.H., Fiorentini, Â.M., 2019. Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Journal of Food Quality*, 2019.
- De Castro, A., Montañó, A., Casado, F.J., Sanchez, A.H., Rejano, L., 2002. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as Starter Cultures for Spanish-Style Green Olive Fermentation. *Food Microbiology*, 19 (6), 637-644.
- De Giori, G.S., De Valdéz, G.F., De Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G., 1983. Microflora of Tafi Cheese: Changes During Manufacture and Maturation. *Journal of Food Protection*, 46 (6), 518-521.
- Demirgöl, F., Tuncer, Y., 2017. Detection of Antibiotic Resistance and Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sucuk, a Traditional Turkish Dry-Fermented Sausage. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37 (5), 670.
- De Las Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A.V., Munoz, R., 2006. PCR Detection of Foodborne Bacteria Producing the Biogenic Amines Histamine, Tyramine, Putrescine and Cadaverine. *Journal of Food Protection*, 69 (10), 2509-2514.
- Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2010. Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal-Associated Bacteria

Warfare: Inventory and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. *Marine Drugs*, 8 (4), 1153-1177.

De Vuyst, L., Foulquie Moreno, M., Revets, H., 2003. Screening for Enterocins and Detection of Hemolysin and Vancomycin Resistance in Enterococci of Different Origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84 (3), 299-318.

De Vuyst, L., Vandamme, E.J., 1994. Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, 91-142.

Diep, D.B., Nes, I.F., 2002. Ribosomally Synthesized Antibacterial Peptides in Gram Positive Bacteria. *Current Drug Targets*, 3 (2), 107-122.

Doming K.J., Mayer H.K., Kneifel W., 2003. Methods Used for the Isolation, Enumeration, Characterisation and Identification of *Enterococcus spp.* 2. Phenoand Genotypic Criteria. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2-3), 165-188.

Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Review*, 15 (2), 167-193.

Dovat, A.M., Reinbold, G.W., Hammond, E.G., Vedamuthu, E.R., 1970. Lipolytic and Proteolytic Activity of *enterococci* and Lactic Group *streptococci* Isolated from Young Cheddar Cheese. *Journal of Milk and Food Technology*, 33 (9), 365-372.

Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Bierne, H., 2005. Sorting Sortases: A Nomenclature Proposal for the Various Sortases of Gram-Positive Bacteria. *Research in Microbiology*, 156 (3), 289-297.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M., Prévost, H., 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 70 (2), 564-582.

Du, H., Yang, J., Lu, X., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., Zhang, C., Lu, F., 2018. Purification, Characterization, and Mode of Action of Plantaricin GZ1-27, a Novel Bacteriocin against *Bacillus cereus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (18), 4716-4724.

Duh, R., Singh, K.V., Malathum, K., Murray, B.E., 2001. In Vitro Activity of 19 Antimicrobial Agents Against Enterococci from Healthy Subjects and Hospitalized Patients and Use of An ace Gene Probe from *Enterococcus faecalis* for Species Identification. *Microbial Drug Resistance*, 7 (1), 39-46.

Dunny, G.M., Leonard, B.A., Hedberg, P.J., 1995. Pheromone-Inducible Conjugation in *Enterococcus faecalis*: Interbacterial and Host-Parasite Chemical Communication. *Journal of Bacteriology*, 177 (4), 871-876.

- Dunny, G.M., 2007. The Peptide Pheromone-Inducible Conjugation System of *Enterococcus faecalis* Plasmid pCF10: Cell-Cell Signalling, Gene Transfer, Complexity and Evolution. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 362 (1483), 1185-1193.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., 2001. Technologically Important Properties of Lactic Acid Bacteria Isolates from Beyaz Cheese Made From Raw Ewes' Milk. Journal of Applied Microbiology, 91 (5), 861-870.
- Dworniczek, E., Kuzko, K., Mróz, E., Wojciech, Ł., Adamski, R., Sobieszczńska, B., Seniuk, A., 2003. Virulence Factors and *in vitro* Adherence of *Enterococcus* Strains to Urinary Datheters. Folia Microbiologica 48 (5), 671-678.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2001. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange Between Food and Medical Isolates. Applied of Environmental Microbiology, 67 (4), 1628-1635.
- El Soda, M., 2002. Selection of *Enterococcus faecium* Strains for Egyptian Cheesemaking. Presentations: Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects, European Commission Project FAIR-CT97-3078, 30-31 May 2002, Berlin, Germany.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A., 2000. Class Ila Bacteriocins: Biosynthesis, Structure and Activity. FEMS Microbiology Reviews, 24 (1), 85-106.
- Ercan, S. Ş., Soysal, Ç., Bozkurt, H., 2017. Gıdalarda Bulunan Biyojen Aminlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 3 (2), 534-550.
- Erol İ., 2007. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık, Ankara.
- Essid, I., Ben Ismail, H., Bel Hadj Ahmed, S., Ghedamsi, R., Hassouna, M., 2007. Characterization and Technological Properties of *Staphylococcus xylosus* Strains Isolated from a Tunisian Traditional Salted Meat. Meat Science. 77 (2), 204-212.
- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M., Oliver, G., Toldrá, F., 1999. Hydrolysis of Pork Muscle Sarcoplasmic Proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*. Applied and Environmental Microbiology, 65 (2), 578-584.
- Farías, M.E., Farías, R.N., Holgado, A.D.R., Sesma, F., 1996. Purification and N-terminal Amino Acid Sequence of Enterocin CRL 35, a 'Pediocin-Like' Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* CRL 35. Letters in Applied Microbiology, 22 (6), 417-419.

- Favaro L, Penna A.L.B, Todorov S.D., 2015. Bacteriocinogenic LAB from Cheeses—Application in Biopreservation?. Trends in Food Science Technology, 41 (1), 37-48.
- Feng, G., Guron, G.K., Churey, J.J., Worobo, R.W., 2009. Characterization of Mundticin L, A class IIa Anti-*Listeria* Bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. Applied Environmental Microbiology, 75 (17), 5708-5713.
- Field, D., Ross, R.P., Hill, C., 2018. Developing Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria into Next Generation Biopreservatives. Current Opinion in Food Science. 20, 1-6.
- Fisher, K., Phillips, C., 2009. The Ecology, Epidemiology and Virulence of Enterococcus. Microbiology, 155 (6), 1749-1757.
- 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.
- Foulquié Moreno, M.R., 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 (2), 214-229.
- Foulquié Moreno, M., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The Role and Application of Enterococci in Food and Health. International Journal of Food Microbiology, 106 (1), 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., 1996. Production and Characterization of Enterocin 900, A Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from Black Olives. International Journal of Food Microbiology 29 (2-3), 255-270.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Enterococci At The Crossroads of Food Safety?. International Journal of Food Microbiology 47 (1-2), 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, W., 2001. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococci Isolated from Food. Applied of Environmental Microbiology, 67 (9), 4385-4389.
- Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in Foods—A Conundrum for Food Safety. International Journal of Food Microbiology, 88 (2-3), 105-122.

- Franz, C.M., Van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H., Galvez, A., 2007. Diversity of Enterococcal Bacteriocins and Their Grouping in A New Classification Scheme. *FEMS Microbiology Reviews*, 31 (3), 293-310.
- Galgano F, Favati F, Bonadio M, Lorusso V, Romano P., 2009. Role of Biogenic Amines as Index of Freshness in Beef Meat Packed with Different Biopolymeric Materials. *Food Research International*, 42 (8), 1147-1152.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M.C., Galgano, F., Crudele, M.A., Favati, F., Guerzoni, M.E., Suzzi, G., 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.
- Gençcelep, H., Kaban, G., Aksu, M.İ, Öz, F., Kaya M., 2008. Determination of Biogenic Amines in Sucuk. *Food Control*, 19 (9), 868-872.
- Gilmore, S.M., Coburn, P.S., Nallapareddy, S.R., Murray, B.E., 2002. The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. Washington: American Society for Microbiology, 301-354.
- Gingerich, T.M., Lorca, T., Flick, G.J., Pierson, M.D., Mc Nair H.M., 1999. Biogenic Amine Survey and Organoleptic Changes in Fresh, Stored and Temperature-Abused Bluefish. *Journal Food Protection* 62 (9), 1033-1037.
- Giraffa, G., Gatti, M., Carminati, D., Neviani, E., 1993. Biochemical and Metabolic Characteristics of Strains Belonging to *Enterococcus* Genus Isolated from Dairy Products. In *Proceedings of the Congress on Biotechnology and Molecular Biology of Lactic Acid Bacteria for the Improvement of Foods and Feeds Quality*, Naples, February. 23-24.
- Giraffa, G., 1995. Enterococcal Bacteriocins: Their Potential as Anti-Listeria Factors in Dairy Technology. *Food Microbiology*, 12, 291-299.
- Giraffa, G., Carminati, D., 1997. Control of *Listeria monocytogenes* in the Rind of Taleggio, A Surface-Smear Cheese, by A Bacteriocin from *Enterococcus faecium* 7C5. *Sciences des Aliments* 17, 383-391.
- Giraffa, G., 2002. Enterococci From Foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26 (2), 163-171.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of Enterococci in Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2-3), 215-222.
- Gomes, B.C., Esteves, C.T., Palazzo, I.C.V., Darini, A.L.C., Felis, G.E., Sechi, L.A., Franco, B.D.G.M., De Martinis, E.C.P., 2008. Prevalence and Characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian Foods. *Food Microbiology*, 25 (5), 668-675.

- Gök-Charyyev, M., Özden-Tuncer, B., Akpınar-Kankaya, D., Tuncer, Y., 2019. Bacteriocinogenic Properties and Safety Evaluation of *Enterococcus faecium* YT52 Isolated from Boza, A Traditional Cereal Based Fermented Beverage. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 14 (1), 41-53.
- Gökmen, M., Önen, A., Ektik, N., Kara, R., Torlak, E., Metli, M., 2017. Detection of Prevalence, Antibiotic Resistance and Virulence Factors of *Enterococcus* spp. Isolated From Ready to Eat Foods. *Kocatepe Veterinary Journal*, 10 (2), 76-82.
- Gray, J.I., Macdonald, B., Pearson, A.M., Morton, I.D., 1981. Role of Nitrite in Cured Meat Flavor: A Review. *Journal of Food Protection*, 44 (4), 302-312.
- Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N.B., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A., 2006. Inhibition of Toxicogenic *Bacillus cereus* in Rice-Based Foods by Enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 106 (2), 185-194.
- Green, G., Dicks, L.M.T., Bruggeman, G., Vandamme, E.J., Chikindas, M.L., 1997. Pediocin PD-1, A Bactericidal Antimicrobial Peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Journal of Applied Microbiology*, 83 (1), 127-132.
- Hardie, J.M., Whiley, R.A., 1997. Classification and Overview of the Genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 83 (1), 1-11.
- Hemalatha, G., Bhaskaran, K., Sowmiya, M., Anusheela, H., Sethumadhavan K. , 2017. A study on Virulence Factors and Antimicrobial Resistance Pattern among Enterococci Isolated from Various Clinical Specimens from A Tertiary Care Hospital. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 5 (7), 2969-2974.
- Herrero, M., Mayo, B., Gonzalez, B., Suarez, J.E., 1996. Evaluation of Technologically Important Traits in Lactic Acid Bacteria Isolated from Spontaneous Fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 81 (5), 565-570.
- Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y., Haertlé, T., 2017. Bacteriocin Producing *Enterococcus faecalis* Isolated from Chicken Gastrointestinal Tract Originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, Screening, Safety Evaluation and Probiotic Properties. *Food Control*, 78, 187-195.
- Hendrickx, A.P., Willems, R.J., Bonten, M.J., Van Schaik, W., 2009. LPxTG Surface Proteins of Enterococci. *Trends in Microbiology*, 17 (9), 423-430.
- Hollenbeck, B.L., Rice, L.B., 2012. Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*, 3 (5), 421-569.

- Holzapfel, W.H., Guidas, C., Franz, C.M.A.P., 2002. General Overview of the Enterococci. Presentations: Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects, European Commission Project FAIR-CT97-3078, 30-31.
- Huddleston, J.R., 2014. Horizontal Gene Transfer in the Human Gastrointestinal Tract: Potential Spread of Antibiotic Resistance Genes. *Infection and Drug Resistance*, 7, 167-176.
- Hudson, J. A., Bigwood, T., Cooney, J., McIntyre, L., Billington, C., Heinemann, J. A., Wall, F., 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus mundtii* Isolated from Soil. *Food Microbiology*, 32 (2), 354-360.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., 2003. Functionality of Enterococci in Meat Products. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2-3), 223-233.
- İnoğlu, Z.N., Tuncer, Y., 2013. Safety Assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. *Journal of Food Safety* 33 (3), 369-377.
- İşlerioğlu, H., Yıldırım, Z., Demirpençe, Y., Yıldırım, M., 2008. Enterokoklar: Biyokimyasal, Fizyolojik ve Fonksiyonel Özellikleri ile Patojenitesi. *Akademik Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi*, 6 (3), 16-26.
- Jahan, M., Zhanel, G.G., Sparling, R., Holley, R.A., 2015. Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance from *Enterococcus faecium* of Fermented Meat Origin to Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 199, 78-85.
- Jaouani, I., Abbassi, M.S., Ribeiro, S.C., Khemiri, M., Mansouri, R., Messadi, L., Silva, C.C.G., 2015. Safety and Technological Properties of Bacteriocinogenic Enterococci Isolates from Tunisia. *Journal of Applied Microbiology*, 119 (4), 1089-1100.
- Jeeveratnam, K., Jamuna, M., Bawa, A.S., 2005. Biological Preservation of Foods- Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 446-454.
- Jiménez, E., Ladero, V., Chico, I., Maldonado-Barragán, A., López, M., Martín, V., Fernández, L., Fernández, M., Álvarez M.A., Torres, C., Rodríguez, J.M., 2013. Antibiotic Resistance, Virulence Determinants and Production of Biogenic Amines Among Enterococci from Ovine, Feline, Canine, Porcine and Human Milk. *BMC Microbiology*, 13 (1), 288.
- Jung, G., Sahl, H.G., 1991. Nisin and Novel Lantibiotics. Springer Science and Business Media.

- Kalhotka, L., Manga, I., Přichystalová, J., Hůlová, M., Vyletělová, M., Šustová K., 2012. Decarboxylase Activity Test of The Genus *Enterococcus* Isolated from Goat Milk and Cheese. *Acta Veterinaria Brno*, 81 (2), 145-151.
- Kanematsu, E., Deguchi, T., Yasuda, M., Kawamura, T., Nishino, Y., Kawada, Y., 1998. Alterations in The GyrA Subunit of DNA Gyrase and The ParC Subunit of DNA Topoisomerase IV Associated with Quinolone Resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 (2), 433-435.
- Karovicova, J., Kohajdova, Z., 2005. Biogenic Amine in Foods. *Chem papers*, 59 (1), 70-79.
- Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K., Sameshima, T., 2002. Biochemical and Genetic Characterization of Mundticin KS, an Antilisterial Peptide Produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (8), 3830-3840.
- Khan, H., Flint, S., Yu, P.L., 2010. Enterocins in Food Preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 141 (1-2), 1-10.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12 (1-3), 39-85.
- Klare, I., Werner, G., Witte, W., 2001. Enterococci. Habitats, Infections, Virulence Factors, Resistances to Antibiotics, Transfer of Resistance Determinants. *Contributions to Microbiology* , 8, 108- 122.
- Klein, G., 2003. Taxonomy, Ecology, and Antibiotic Resistance of Enterococci from Food and The Gastro-Intestinal Tract. *International Journal of Food Microbiology*. 88 (2-3), 123-131.
- Kolter, R., Moreno, F., 1992. Genetics of Ribosomally Synthesized Peptide Antibiotics. *Annual Reviews in Microbiology*, 46 (1), 141-161.
- Komprdo, T., Sladková, P., Petirová, E., Dohnal, V., Burdychová, R., 2010. Tyrosine and Histidine Decarboxylase Positive Lactic Acid Bacteria and Enterococci in Dry Fermented Sausages. *Meat Science*, 86 (3), 870-877.
- Koral, G., Tuncer, Y., 2014. Nisin Z-Producing *Lactococcus lactis* Subsp. *Lactis* GY l32 Isolated from Boza. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38 (3), 1044-1053.
- Korhonen, H., 2009. Milk-Derived Bioactive Peptides: From Science to Applications. *Journal of Functional Foods*, 1 (2), 177-187.

- Kozłowicz, B.K., Dworkin, M., Dunny, G.M., 2006. Pheromone-Inducible Conjugation in *Enterococcus faecalis*: A Model for The Evolution of Biological Complexity?. International Journal of Medical Microbiology, 296 (2-3), 141-147.
- KucEROVÁ, K., SvobodOVÁ, H., TůMA, Š., Ondráčková, I., PlockOVÁ, M., 2009. Production of Biogenic Amines by Enterococci. Czech Journal Food Science, 27 (2), 50-55.
- Landeta, G., Curiel, J.A., Carrascosa, A.V., Muñoz, R., de Las Rivas, B., 2013. Technological and Safety Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Spanish Dry-Cured Sausages. Meat Science. 95 (2), 272-280.
- Lauková, A., Kandričáková, A., ŠčerboVá, J., StropfOVÁ, V., 2016. Enterococci Isolated from Farm Ostriches and Their Relation to Enterocins. Folia Microbiologica, 61 (4), 275-281.
- Latasa, C., Solano, C., Penade, S. J. R., Lasa, I., 2006. Biofilm associated proteins. Comptes Rendus Biologies, 329, 849-857.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M.T, Vidal-Carou, M.C., 2012. Control of Biogenic Amines in Fermented Sausages: Role of Starter Cultures. Front Food Microbiology , 3, 1-9.
- Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J., Williems, R.J., 2004. A Novel Putative Pathogenicity Island Linked to Esp Virulence Gene of *Enterococcus faecium* and Associated with Epidemicity. Journal of Bacteriology, 186 (3), 672-682.
- Lee, K., 2005. A Media Design Program for Lactic Acid Production Coupled with Extraction by Electrodialysis. Bioresource Technology, 96 (13), 1505-1510.
- Ledda, A., Scintu, M.F., Pirisi, A., Sanna, S., Mannu, L., 1994. Technological Characterization of *lactococci* and *enterococci* for The Manufacture of Fiore Sardo Sheep cheese. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 45, 443-456.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., 1992. Microbiological Study of White-Brined Cheese Made from Raw Goat Milk. Food Microbiology, 9 (1), 13-19.
- Liu, D.C., Wu, S.W., Tan, F.J., 2010. Effects of Addition of Anka Rice on The Qualities of Low-Nitrite Chinese Sausages. Food Chemistry, 118 (2), 245-250.
- Lopes, M.F., Simões, A.P., Tenreiro, R., Marques, J.J., Crespo, M.T., 2006. Activity and Expression of A Virulence Factor, Gelatinase, in Dairy Enterococci. International Journal Food Microbiology, 112 (3), 208-214.

- Lorenzo, J.M., Martínez, S., Franco, I., Carballo, J., 2007. Biogenic Amine Content During The Manufacture of Dry-Cured Lacón, A Spanish Traditional Meat Product: Effect of Some Additives. *Meat Science*, 77 (2), 287-293.
- Lukášová, J., Šustáčková, A., 2003. Enterococci and Antibiotic Resistance. *Acta Veterinaria Brno*, 72 (2), 315-323.
- Lundén, J., Tolvanen, R., Korkeala, H., 2004. Human Listeriosis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. *Journal of Dairy Science*, 87, 6-11.
- Macedo, A.C., Malcata, F.X., 1997. Role of Adventitious Microflora in Proteolysis and Lipolysis of Serra Cheese: Preliminary Screening. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung Und-Forschung A*, 205 (1), 25-30.
- Malek, R., El-Attar, A., Mohamed, M., Anwar, S., El-Soda, M., Béal, C., 2012. Technological and Safety Properties Display Biodiversity Among Enterococci Isolated from Two Egyptian Cheeses, “Ras” and “Domiat”. *International Journal of Food Microbiology*, 153 (3), 314-322.
- Manavalan, J., Kannaiyan, K., Velatyutham, A., Vadivel, S., Kuthalaramalingam, S., 2015. Phenotypic Speciation of Enterococci with Special Reference to Prevalence, Virulence and Antimicrobial Resistance. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 3 (10), 2623-2629.
- Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, I., Sechi, L.A., 2003. Comparison of The Incidence of Virulence Determinants and Antibiotic Resistance Between *Enterococcus faecium* Strains of Dairy, Animal and Clinical Origin. *International Journal Of Food Microbiology*, 88 (2-3), 291-304.
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I.G., Anifantakis, E.M., 2003. Evolution of Microbial Populations During Traditional Feta Cheese Manufacture and Ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 82 (2), 153-161.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Aymerich, T., 2006. Molecular, Technological and Safety Characterization of Gram-Positive Catalase-Positive Cocci From Slightly Fermented Sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 107 (2), 148-158.
- Martinez-Murcia, A.J., Collins, M.D., 1991. *Enterococcus sulfureus*, A New Yellow-Pigmented *Enterococcus* Species. *FEMS Microbiology Letters*, 80 (1), 69-73.
- Mikuška, P., Večeřa, Z., 2003. Simultaneous Determination of Nitrite and Nitrate in Water by Chemiluminescent Flow-Injection Analysis. *Analytica Chimica Acta*, 495 (1-2), 225-232.

- Minahk, C.J., Morero, R.D., 2003. Inhibition of Enterocin CRL35 Antibiotic Activity by Mono-And Divalent Ions. *Letters In Applied Microbiology*, 37 (5), 374-379.
- Miralles, M.C., Flores, J., Perez-Martinez, G., 1996. Biochemical Test for The Selection of *Staphylococcus* Strains As Potential Meat Starter Cultures. *Food Microbiology*, 13 (3), 227-236.
- Medeiros, A.W., Pereira, R.I., Oliveira, D.V., Martins, P.D., d'Azevedo, P.A., Van der Sand, S., Frazzon, J., Frazzon, A.P.D., 2014. Molecular Detection of Virulence Factors Among Food and Clinical *Enterococcus faecalis* Strains in South Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (1), 327-332.
- Molinos, A.C., Abriouel, H., Omar, N.B., Valdivia, E., López, R.L., Maqueda, M., Cañamero, M.M., Gálvez, A., 2005. Effect of Immersion Solutions Containing Enterocin AS-48 On *Listeria monocytogenes* in Vegetable Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (12), 7781-7787.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R., 2006. Technological and Molecular Characterisation of Enterococci Isolated from North-West Italian Dairy Products. *International Dairy Journal*, 16 (8), 867-875.
- Morea, M., Baruzzi, F., Cocconcelli, P.S., 1999. Molecular and Physiological Characterization of Dominant Bacterial Populations in Traditional Mozzarella Cheese Processing. *Journal Applied Microbiology*, 87 (4), 574-582.
- Morrison, D., Woodford, N., Cookson, B., 1997. Enterococci As Emerging Pathogens of Humans. *Journal of Applied Microbiology*, 83 (1), 89-99.
- Mundy, L.M., Sahm, D.F., Gilmore, M., 2000. Relationship Between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (4), 513-522.
- Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Valdivia, E., 2004. Biocontrol of Psychrotrophic Enterotoxigenic *Bacillus cereus* in Nonfat Hard Cheese by An Enterococcal Strain-Producing Enterocin AS-48. *Journal of Food Protection*, 67 (7), 1517-1521.
- Murray, B.E., 1990. The Life and Times of The *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3, 46-65.
- Nallapareddy, S.R., Qin, X., Weinstock, G.M., Hook, M., Murray, B.E., 2000. *Enterococcus faecalis* Adhesin, Ace, Mediates Attachment to Extracellular Matrix Proteins Collagen Type IV and Laminin As Well As Collagen Type I. *Infection and Immunity*, 68 (9), 5218-5224.

- Nallapareddy, S.R., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 2003. Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* Exhibit Strain-Specific Collagen Binding Mediated by Acm, A New Member of The MSCRAMM Family. *Molecular Microbiology*, 47 (6), 1733-1747.
- Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Okhuysen, P.C., Murray, B.E., 2008. A Functional Collagen Adhesin Gene, Acm, in Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* Correlates with The Recent Success of This Emerging Nosocomial Pathogen. *Infection and Immunity*, 76 (9), 4110-4119.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H., 1996. Biosynthesis of Bacteriocins in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70 (2-4), 113-128.
- Nishie, M., Nagao, J.I., Sonomoto, K., 2012. Antibacterial Peptides "Bacteriocins": An Overview of Their Diverse Characteristics and Applications. *Biocontrol Science*, 17 (1), 1-16.
- Nieto-Arribas, P., Poveda, J.M., Seseña, S., Palop, L., Cabezas, L., 2009. Technological Characterization of *Lactobacillus* Isolates from Traditional Manchego Cheese for Potential Use As Adjunct Starter Cultures. *Food Control*, 20 (12), 1092-1098.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Chicón, R., Cabezas, L., Palop, L., 2011. *Enterococcus* Populations in Artisanal Manchego Cheese: Biodiversity, Technological and Safety Aspects. *Food Microbiology*, 28 (5), 891-899.
- Nunez, M., Rodriguez, J. L., Garcia, E., Gaya, P., Medina, M., 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Enterocin 4 During the Manufacture Andripening of Manchego Cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 83 (6), 671-677.
- Oancea, C., Klare, I., Witte, W., Werner, G., 2004. Conjugative Transfer of The Virulence Gene, Esp, Among Isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54 (1), 232-235.
- Ochoa, S.A., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L.B., Saldaña, Z., Cázares-Domínguez, V., Eslava, C.A., López-Martínez, B., Hernández-Castro, R., Xicohtencatl-Cortes, J., 2013. Molecular Analysis and Distribution of Multidrugresistant *Enterococcus faecium* Isolates Belonging to Clonal Complex 17 in A Tertiary Care Center in Mexico City. *BMC Microbiology*, 13, 291.
- Ogier, J.C., Serror, P., 2008. Safety Assesment of Dairy Microorganisms: The *Enterococcus* Genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (3), 291-301.

- Oladipo, C.I., Sanni, A., Chakraborty, W., Chakraborty, S., Jana, S., Rudra, D.S., Gacchui, R., Swarnakar, S., 2015. Technological Properties of Strains of *Enterococcus gallinarum* Isolated from Selected Nigerian Traditional Fermented Foods. *Malaysian Journal Microbiology*, 11 (1), 1-13.
- Ordóñez, J.L., Callejón, R.M., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., 2017. Evaluation of Biogenic Amines Profile in Opened Wine Bottles: Effect of Storage Conditions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 139-147.
- Oscáriz, J.C., Lasa, I., Pisabarro, A.G., 1999. Detection and Characterization of Cerein 7, A New Bacteriocin Produced by *Bacillus Cereus* with A Broad Spectrum of Activity. *FEMS Microbiology Letters*, 178 (2), 337-341.
- Oscáriz, J.C., Pisabarro, A.G., 2000. Characterization and Mechanism of Action of Cerein 7, A Bacteriocin Produced by *Bacillus Cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology*, 89 (2), 361-369.
- Özden-Tuncer, B., Ay, Z., Tuncer, Y., 2013. Occurrence of Enterocin Genes, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance in 3 Bacteriocin-Producer *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. *Turkish Journal of Biology*, 37 (4), 443-449.
- Özdestan, Ö., Üren, A., 2012. Gıdalarda Biyojen Aminlerle İlgili Yasal Düzenlemeler, *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 12, 27-40.
- Özkalp, B., Özden, B., Tuncer, Y., Şanlıbaba, P., Akçelik, M., 2007. Technological Characterization of Wild-Type *Lactococcus Lactis* Strains Isolated from Raw Milk and Traditional Fermented Milk Products İn Turkey. *Le Lait*, 87 (6), 521-534.
- Özmen-Toğay, S., Keskin, A.Ç., Açık, L., Temiz, A., 2010. Virulence Genes, Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Naturally Fermented Turkish Foods. *Journal of applied microbiology*, 109 (3), 1084-1092.
- Özmen-Toğay, S., Temiz, A., 2011. Gıda Kaynaklı Enterokokların Gıda ve İnsan Sağlığı Yönünden Önemi. *The Journal of Food*, 36 (5), 303-310.
- Özoğul, F., Küley, E., Özoğul, Y., 2004. Balık ve Balık ürünlerinde Oluşan Biyojenik Aminler. *Ege Ürünleri Su Ürünleri Dergisi*, 21 (3-4), 375-381.
- Penna, A.L.B., de Paula, A.T., Casarotti, S.N., Silva, L.F., Diamantino, V.R., Todorov, S.D., 2015. Overview of The Functional Lactic Acid Bacteria in Fermented Milk Products. *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*, 100-154.
- Perin, L.M., Miranda, R.O., Todorov, S.D., de Melo Franco, B.D.G., Nero, L.A., 2014. Virulence, Antibiotic Resistance and Biogenic Amines of

Bacteriocinogenic Lactococci and Enterococci Isolated from Goat Milk. International Journal of Food Microbiology, 185, 121-126.

- Pingitore, E.V., Todorov, S.D., Sesma, F., de Melo Franco, B.D.G., 2012. Application of Bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in The Control of *Listeria monocytogenes* in Fresh Minas Cheese. Food Microbiology, 32 (1), 38-47.
- Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., 2006. Genotypic and Phenotypic Heterogeneity in *Enterococcus* Isolates from Batzos, A Raw Goat Milk Cheese. International Journal Of Food Microbiology, 109 (1-2), 109-120.
- Poeta, P., Igrejas, G., Costa, D., Sargo, R., Rodrigues, J., Torres, C., 2008. Virulence Factors and Bacteriocins in Faecal Enterococci of Wild Boars. Journal of Basic Microbiology, 48 (5), 385-392.
- Pourazrang, H., Moazzami, A.A., Fazly Bazzaz, B.S., 2002. Inhibition of Mutagenic N-Nitroso Compound Formation in Sausage Samples Using L-Ascorbic Acid and α -Tocopherol. Meat Science, 62 (4), 479-483.
- Pritchard, G.G., Coolbear, T., 1993. The Physiology and Biochemistry of The Proteolytic System in Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 12 (1-3), 179-206.
- Rachon, G., Peñaloza, W., Gibbs, P.A., 2016. Inactivation of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 in A Selection of Low Moisture Foods. International Journal of Food Microbiology, 231, 16-25.
- Restuccia, D., 2017. Quality and Safety Issues Related with the Presence of Biogenic Amines in Foods. E. C. Nutrition, 8 (5), 160-162.
- Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M., 2005. Screening of Virulence Determinants in *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Breast Milk. Journal of Human Lactation, 21 (2), 131-137.
- Ribeiro, S.C., Coelho, M.C., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.M., Dapkevicius, M.L.E., Silva, C.C.G., 2014. Technological Properties of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Pico Cheese An Artisanal Cow's Milk Cheese. Journal Of Applied Microbiology, 116 (3), 573-585.
- Rich, C., Favre-Bonte, S., Sapena, F., Joly, B., Forestier, C., 1999. Characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates, FEMS Microbiology Letters, 173 (1), 55-61.
- Saavedra, L., Minahk, C., de Ruiz Holgado, A. P., Sesma, F., 2004. Enhancement of The Enterocin CRL35 Activity by A Synthetic Peptide Derived from The

NH₂-Terminal Sequence. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48 (7), 2778-2781.

Sallem, R.B., Klibi, N., Klibi, A., Said, B.L., Dziri, R., Boudabous, A., Torres, C., Slama, K.B., 2016. Antibiotic Resistance and Virulence of Enterococci Isolates From Healthy Humans in Tunisia. Annals of Microbiology, 66 (2), 717-725.

Salvucci, E., LeBlanc, J.G., Pérez, G., 2016. Technological Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Cereal Material. LWT-Food Science and Technology, 70, 185-191.

Santarelli, R.L., Pierre, F., Corpet, D.E., 2008. Processed Meat and Colorectal Cancer: A Review of Epidemiologic and Experimental Evidence. Nutrition and Cancer, 60 (2), 131-144.

Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., 2001. Biochemical Properties of Enterococci Relevant to Their Technological Performance. International Dairy Journal, 11 (8), 621-647.

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., 2002. Effect of *Enterococcus faecium* on Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristics of Greek Feta Cheese, International Journal of Food Microbiology, 76 (1-2), 93-105.

Sava, I.G., Heikens, E., Huebner, J., 2010. Pathogenesis and Immunity in Enterococcal Infections, Clinical Microbiology and Infection, 16 (6), 533-540.

Sebranek, J.G., Bacus, J.N., 2007. Cured Meat Products Without Direct Addition of Nitrate or Nitrite: What Are The Issues?, Meat Science, 77 (1), 136-147.

Semedo, T., Almeida, S.M., Martins, P., Silva Lopes, M.F., Figueiredo Marques, J.J., Tenreiro, R., Crespo, MTB., 2003a. Comparative Study Using Type Strains and Clinical and Food Isolates to Examine Hemolytic Activity and Occurrence of The *cyl* Operon in Enterococci. Journal of Clinical Microbiology, 41 (66), 2569-2576.

Semedo, T., Santos, M. A., Lopes, M. F., Marques, J. J. F., Crespo, M. T., Tenreiro, R., 2003b. Virulence Factors in Food, Clinical and Reference Enterococci: A Common Trait in The Genus?. Systematic and Applied Microbiology, 26 (1), 13-22.

Serio, A., Chaves-López, C., Paparella, A., Suzzi, G., 2010. Evaluation of Metabolic Activities of Enterococci Isolated from Pecorino Abruzzese Cheese. International Dairy Journal, 20 (7), 459-464.

- Settanni, L., Guarcello, R., Gaglio, R., Francesca, N., Aleo, A., Felis, G. E., Moschetti, G., 2014. Production, Stability, Gene Sequencing and In Situ Anti-Listeria Activity of Mundticin KS Expressed by Three *Enterococcus mundtii* Strains. *Food Control*, 35 (1), 311-322.
- Shalaby, A.R., 1996. Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health. *Food Research International*, 29 (7), 675-690.
- Shankar, N., Coburn, P., Pillar, C., Haas, W., Gilmore, M., 2004. Enterococcal Cytolysin: Activities and Association with Other Virulence Traits in A Pathogenicity Island. *International Journal of Medical Microbiology*, 293 (7-8), 609-618.
- Silla-Santos, M.H., 1996. Biogenic Amines: Their Importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3), 213-231.
- Singh, K.V., Qin, X., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 1998. Generation and Testing of Mutants of *Enterococcus faecalis* in Mouse Peritonitis Model. *Journal of Infectious Diseases*, 178 (5), 1416-1420.
- Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., 2001. Advances in The Study of Proteolysis During Cheese Ripening. *International Dairy Journal*, 11 (4-7), 327-345.
- Söyletir, G., Çerikçioğlu, N., 1996. Streptokok infeksiyonları, Enfeksiyon Hastalıkları, Editörler: A. Willke, G. Söyletir, M. Doğanay. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul , 329-339.
- Strzelecki, J., Sadowy, E., Hryniewicz, W., 2011. Enterococcal Surface Proteins Responsible for Interactions with Host Tissues. *Postepy Microbiology*, 50 (1), 31-42.
- Suk-Kyung, L., Koichi, T., Haruyoshi, T., Yasuyoshi, I., 2006. Pheromone-Responsive Conjugative Vancomycin Resistance Plasmids in *Enterococcus faecalis* Isolates from Humans and Chicken Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (10), 6544-6553.
- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T., 2000. A Survey of the Enterococci Isolated from An Artisanal Italian Goat's Cheese (Semicotto Caprino). *Journal of Applied Microbiology*, 89 (2), 267-274.
- Suzzi, G., Torriani, S., 2015. Biogenic Amines in Foods. *Frontiers in Microbiology*, 6, 472.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria, *Bacteriological Reviews*, 40 (3), 722.

- Talon, R., Leroy, S., 2011. Diversity and Safety Hazards of Bacteria Involved in Meat Fermentations. *Meat Science*, 89(3), 303-309.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten H.M.L.J., Huis in't Veld, J.H.J., 1990. Occurrence and Formation of Biologically Active Amines in Foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11 (1), 73-84.
- Tenover, F.C., Hugles, J.M., 1996. The Challenges of Emerging Infectious Diseases Development and Spread of Multiply Resistant Bacterial Pathogens. *The Journal of the American Medical Association* , 275 (4), 300-304.
- Terns, M.J., Milkowski, A.L., Claus, J.R., Sindelar, J.J., 2011. Investigating The Effect of Incubation Time and Starter Culture Addition Level on Quality Attributes of Indirectly Cured, Emulsified Cooked Sausages. *Meat Science*, 88 (3), 454-461.
- Trivedi, K., Cupakova, S., Karpiskova, R., 2011. Virulence Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Food-Stuffs. *Veterinarni Medicina*, 56 (7), 352-357.
- Tsai, H.C., Ballom, K.F., Xia, S., Tang, J., Marks, B.P., Zhu, M.J., 2019. Evaluation of *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 As A Surrogate for *Salmonella* During Cocoa Powder Thermal Processing. *Food Microbiology*, 82, 135-141.
- Tsaikalidou, E., Monolopoulou, E., Kabarakı, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K., Kalantzopoulos, G., 1994. The Combined Use of Whole Cell Protein Extracts for The Identification and Enzyme Activity Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Greek Dairy Products. *Systematic Applied Microbiology*, 17 (3), 444-458.
- Tuncer, Y., 2009. Some Technological Properties of Phenotypically Identified Enterococci Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. *African Journal of Biotechnology*, 8 (24), 7008-7016.
- 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 (1), 4940-4948.
- Tuncer, M., Özden Tuncer, B., Tuncer, Y., 2014. Çiğ Sütten İzole Edilen Enterosin B Üreticisi *Enterococcus faecalis* MYE58 Suşunun Güvenlik Değerlendirmesi. *The Journal Of Food*, 39 (5), 275-282.
- Turp, G., Sucu, Ç., 2016. Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit Kullanımına Potansiyel Alternatif Yöntemler. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 12 (2), 231-242.
- Upadhyaya, P.M.G., Umapathy, B.L., Ravikumar, K.L., 2010. Comparative Study for the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase, Hemolysin

and Biofilm Among Clinical and Commensal Isolates Of *Enterococcus faecalis*. Journal Of Laboratory Physicians. 2 (2), 100-104.

Valenzuela, A.S., ben Omar, N., Abriouel, H., López, R.L., Veljovic, K., Cañamero, M.M., Topisirovic, M.K.T., Gálvez, A., 2009. Virulence Factors, Antibiotic Resistance, and Bacteriocins in Enterococci from Artisan Foods of Animal Origin. Food Control, 20 (4), 381-385.

Vandenbergh, P.A., 1993. Lactic Acid Bacteria, Their Metabolic Products and Interference with Microbial Growth. FEMS Microbiology Reviews, 12 (13), 221-237.

Vankerckhoven, V., Autgaerden, T.V., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., Goossens, H., 2004. Development of A Multiplex PCR for The Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants Among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. Journal of Clinical Microbiology, 42 (10), 4473-4479.

Von Wright A, Bruce A. 2003. Genetically modified microorganisms and their potential effects on human health and nutrition. Trends Food Science Technology, 14, 264-276.

Vu, J.T., Carvalho, J.M., 2011. *Enterococcus*: Review of Its Physiology, Pathogenesis, Diseases and The Challenges It Poses for Clinical Microbiology. Frontiers In Biology, 6, 357-366

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.

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, 98 (1), 216-228.

Wachsman, M.B., Farias, M.E., Takeda, E., Sesma, F., de Ruiz Holgado, A.P., de Torres, R.A., Coto, C.E., 1999. Antiviral Activity of Enterocin CRL35 Against Herpesviruses. International Journal of Antimicrobial Agents 12, 293-299.

Wachsman, M.B., Castilla, V., de Ruiz Holgado, A.P., de Torres, R.A., Sesma, F., Coto, C.E., 2003. Enterocin CRL35 Inhibits Late Stages of HSV-1 and HSV-2 Replication In Vitro. Antiviral Research, 58 (1), 17-24.

Wardal, E., Sadowy, E., Hryniewicz, W., 2010. Complex Nature of Enterococcal Pheromone-Responsive Plasmids. Polish Journal of Microbiology, 59 (2), 79-87.

- Wessels, D., Jooste, P.J., Mostert, J.F., 1990. Technologically Important Characteristics of *Enterococcus* Isolates from Milk and Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*, 10 (3-4), 349-352.
- Willems, R.J., Bonten, M.J., 2007. Glycopeptide-Resistant Enterococci: Deciphering Virulence, Resistance and Epidemicity, *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20 (4), 384-390.
- Yang, C.C., Konisky, J.O.R.D.A.N., 1984. Colicin V-Treated *Escherichia coli* does not Generate Membrane Potential. *Journal of Bacteriology*, 158 (2), 757-759.
- Yüceer, Ö., Özden-Tuncer, B., 2015. Determination of Antibiotic Resistance and Biogenic Amine Production of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Turkish Sausage (Sucuk). *Journal Food Safety*, 35 (2) 276-285.
- Zanardi, E., Dazzi, G., Madarena, G., Chizzolini, R., 2002. Comparative Study on Nitrite and Nitrate Ions Determination. *Annella Facolta di Medicina Veterinaria di Parma*, 22, 70-86.
- Zarringhalami, S., Saahari, M.A., Hamidi-Esfehani, Z., 2009. Partial Replacement of Nitrite by Annatto As A Colour Additive In Sausage. *Meat Science*, 81 (1), 281-284.
- Zendo, T., Eungruttanagorn, N., Fujioka, S., Tashiro, Y., Nomura, K., Sera, Y., Kobayashi, G., Nakayama, J., Ishizaki, A., Sonomoto, K., 2005. Identification and Production of A Bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 Isolated from Soybean, *Journal of applied microbiology*, 99 (5), 1181-1190.
- Zendo, T., Yoneyama, F., Sonomoto, K., 2010. Lactococcal Membrane Permeabilizing Antimicrobial Peptides. *Applied Biotechnology and Microbiology*, 88 (1), 1-9.
- Zommiti, M., Cambronel, M., Maillot, O., Barreau, M., Sebei, K., Feuilleley, M., Ferchichi, M., Connil, N. 2018. Evaluation of Probiotic Properties and Safety of *Enterococcus faecium* Isolated from Artisanal Tunisian Meat "Dried Ossban. *Frontiers in microbiology*, 9, 1685.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Melike KASAP

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir, 1987

Medeni hali : Bekar

Yabancı dil: İngilizce

E-posta: melikekasap@hotmail.com.tr



Eğitim Durumu

Lise : Turgutlu Niyazi Üzmez Lisesi , 2001-2004

Lisans: Manisa Celal Bayar Üniversitesi, 2006-2010

Meslek deneyimleri

Naturel Konserve -2010 (Stajer)

Hızallar Un -2010 (Gıda Mühendisi)

Daşkan Tarım -2011- 2013(Kalite Kontrol Müdürü)

Atlas Osgb - 2013 (C sınıfı İş Güvenliği Uzmanı)

Site Osgb -2013 (C sınıfı İş Güvenliği Uzmanı)

Yayınları

KASAP, M., TUNCER, Y., 2018. Fermente Sucuktan İzole Edilen Enterosin Üreticisi *Enterococcus mundtii* YB6.30 Suşunun Güvenlik Değerlendirmesi. Presented at the Imascon 2018 Uluslararası Marmara Fen ve Sosyal Bilimler Kongresi ,917-923.