

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

**FARKLI PEYNİR ÇEŞİTLERİNDEN BAKTERİYOSİN (ENTEROSİN)
ÜRETİCİSİ ENTEROKOK SUŞLARININ İZOLASYONU VE ÜRETİLEN
BAKTERİYOSİNLERİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)
İLE TANISI**

Mine AVCI

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Banu ÖZDEN TUNCER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2015**

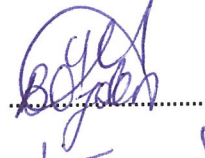
© 2015 [Mine AVCI]

TEZ ONAYI

Mine AVCI tarafından hazırlanan " Farklı Peynir Çeşitlerinden Bakteriyosin (Enterosin) Üreticisi Enterokok Suşlarının İzolasyonu ve Üretilen Bakteriyosinlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Tanısı" 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.

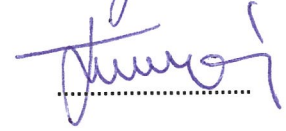
Danışman

Yrd. Doç. Dr. Banu ÖZDEN TUNCER
Süleyman Demirel Üniversitesi



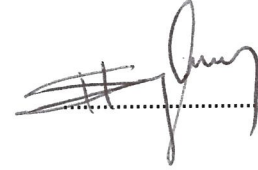
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Yasin TUNCER
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Hidayet SAĞLAM
Kilis 7 Aralık Üniversitesi



Enstitü Müdürü V. **Doç. Dr. Yasin TUNCER**

.....

TAAHHÜTNAME

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

Mine AVCI



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Enterekokların Genel Özellikleri.....	3
2.2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri.....	4
2.3. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması	7
2.3.1. Grup I bakteriyosinler (Lantibiyotikler).....	9
Grup IA.....	9
Grup IB.....	10
2.3.2. Grup II Bakteriyosinler (Lantibiyotik Olmayan Isı Stabil Bakteriyosinler)	10
Grup IIA (Pediyoisin benzeri bakteriyosinler)	10
Grup IIB (İki peptidli bakteriyosinler)	10
Grup IIC	11
2.3.3. Grup III bakteriyosinler (Yüksek moleküler ağırlığa sahip ısıya duyarlı bakteriyosinler)	11
2.3.4. Grup IV bakteriyosinler (Lipit veya karbonhidrat yan grupları içeren kompleks bakteriyosinler)	11
2.4. Bakteriyosinlerin Gıdalarda Kullanımı.....	12
2.5. Enterokoklar Tarafından Üretilen Bakteriyosinler	13
2.5.1. Enterosin A.....	15
2.5.2. Enterosin B.....	16
2.5.3. Enterosin P.....	17
2.5.4. Enterosin L50.....	17
2.5.5. Bakteriyosin 31.....	18
2.5.6. Enterosin AS-48.....	18
2.5.7. Enterosin 1071.....	19
2.5.8. Enterosin CRL35.....	20
2.5.9. Enterosin Q	21
2.5.10. Enterosin 81	21
2.5.11. Sitolisin.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.2. Mikroorganizmalar.....	24
3.3. Enterokok Suşlarının İzolasyonu.....	25
3.4. İzolatların Antibakteriyel Aktivite Özelliklerinin Belirlenmesi.....	26
3.5. Çapraz Aktivite Spektrumu	27
3.6. Proteolitik Enzim Uygulaması.....	27
3.7. İzolatların Fenotipik Tanısı	28
3.7.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi.....	28

3.7.2. MRS broth ortamında gelişme.....	28
3.8. Bakteriyosin Üreticisi Enterokok İzolatının Genotipik Tanısı.....	28
3.8.1. Genomik DNA izolasyonu.....	28
3.8.2. Enterokok izolatlarının 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması.....	30
3.8.3. Çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerinin elektroforezi.....	31
3.9. Enterokok Suşlarında Bakteriyosin Yapısal Genlerinin Belirlenmesi	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	36
4.1. Enterokok Suşlarının İzolasyonu.....	36
4.2. Enterokok İzolatlarının Antibakteriyel Aktivite Özelliklerinin Belirlenmesi.....	39
4.3. Proteolitik Enzim Uygulaması.....	43
4.4. Çapraz Aktivite Spektrumu	44
4.5. Bakteriyosin Üreticisi Enterokok İzolatlarının Tanısı.....	47
4.6. Enterokok Suşlarının Ürettiği Bakteriyosinlerin Tanısı.....	50
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ	75

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI PEYNİR ÇEŞİTLERİNDEN BAKTERİYOSİN (ENTEROSİN) ÜRETİCİSİ ENTEROKOK SUŞLARININ İZOLASYONU VE ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNLERİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE TANISI

Mine AVCI

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Banu ÖZDEN TUNCER

Bu tez çalışmasının amacı, farklı peynir çeşitlerinden bakteriyosin üretim yeteneğine sahip *Enterococcus* suşlarının izolasyonu ve moleküler düzeyde tanımlanması, antimikrobiyel aktivite spektrumlarının belirlenmesi ve bakteriyosin yapısal genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tespitidir. Çalışma kapsamında 33 adet peynir örneğinden 100 adet muhtemel enterokok suşu izole edilmiştir. Fenotipik olarak *Enterococcus* cinsi üyesi olarak tanımlanan 100 adet izolattan 11 adedinin antimikrobiyel aktivite denemelerinde farklı aktivite spektrumu gösterdiği belirlenmiş ve çalışmaya bu izolatlar ile devam edilmiştir. Proteolitik enzim uygulaması, bu izolatlar tarafından üretilen antimikrobiyel maddenin protein yapısında olduğunu göstermiştir. 16S rDNA analizine göre 6 adet izolat *Enterococcus faecium* ve 5 adet izolat *Enterococcus faecalis* olarak tanımlanmıştır. *Enterococcus* suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin moleküler düzeyde tanımlanması amacı ile yürütülen PZR uygulamaları sonucunda *E. faecalis* MBE29-1 ve *E. faecalis* MBE29-3 suşları sadece *entX* yapısal genine sahip iken; *E. faecium* MBE16-5 ve *E. faecalis* MBE31-4 suşları *entA* ve *entX* yapısal genlerine; *E. faecium* MBE15-2 ve *E. faecium* MBE 27-3 suşları *entA*, *entB* ve *entX* yapısal genlerine; *E. faecium* MBE12-3 suşu *entA* ve *entB* yapısal genlerine; *E. faecium* MBE22-2 suşu *entA*, *entP*, ve *entX* yapısal genlerine sahip bulunmuştur. *E. faecium* MBE27-2 suşu ise 4 adet yapısal enterosin geni (*entA*, *entB*, *entP* ve *entX*) içeren tek üretici suş olarak tanımlanmıştır. *E. faecalis* MBE1-9 ve *E. faecalis* MBE20-5 suşları tarafından üretilen enterosinler ise tez kapsamında kullandığımız primerler ile PZR ürünü vermemiştir.

Anahtar kelimeler: Peynir, Enterokok, Enterosin, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

2015, 75 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

ISOLATION OF BACTERIOCIN (ENTEROCIN) PRODUCER ENTEROCOCCI STRAINS FROM DIFFERENT TYPE CHEESE AND IDENTIFICATION OF BACTERIOCINS BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Mine AVCI

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Banu ÖZDEN TUNCER

The aim of the thesis is isolation of *Enterococcus* strains from different kind of cheeses capable of producing bacteriocin, and identification at molecular level, determination of antimicrobial activity spectrum and determination of structural genes of bacteriocin by Polymerase Chain Reaction of these bacteria (PCR). The scope of work ,100 presumptive *Enterococcus* strains were isolated from 33 different cheese samples. 11 isolates among the 100 isolates phenotypically defined as members of the genus *Enterococcus* determined that showed different activity spectrum that in the trial antimicrobial activity and study has continued with these isolates. Proteolytic enzyme study showed that antimicrobial substances produced by these isolates are protein structure. 6 isolates were identified as *Enterococcus faecium* and 5 isolates were identified as *Enterococcus faecalis* by 16S rDNA analysis. PCR treatments for molecular identification bacteriocins produced by *Enterococcus* strains showed that *E. faecalis* MBE29-1 and *E. faecalis* MBE29-3 has only *entX*, while *E. faecium* MBE16-5 and *E. faecalis* MBE31-4 has *entA* and *entX*; *E. faecium* MBE15-2 and *E. faecium* MBE 27-3 *entA*, *entB* and *entX*; *E. faecium* MBE12-3 has *entA* and *entB*; *E. faecium* MBE22-2 has *entA*, *entP*, and *entX* structural genes. *E. faecium* MBE27-2 strain identified as the only one producing strain that has 4 structural enterocin genes (*entA*, *entB*, *entP* and *entX*). Enterocins produced by *E. faecalis* MBE1-9 and *E. faecalis* MBE20-5 strains did not give PCR amplification products by the primers used in this study.

Key words: Cheese, Enterococci, enterocin, polymerase chain reaction (PCR)

2015, 75 pages

TEŞEKKÜR

Başta bana bu konuda çalışma imkanı sunan ve çalışmamın her aşamasında bilgi, yardım ve önerilerini esirgemeyen, bilimsel çalışma disiplini öğrenmemde ve akademik gelişimimde büyük emeği geçen Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Banu ÖZDEN TUNCER olmak üzere;

Çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan Sayın Doç. Dr. Yasin TUNCER'e;

Laboratuvar günlerini birlikte geçirdiğim çalışma arkadaşlarım Furkan DEMİRGÜL, Özge YÜCEER, Müge GÖK ve Burak GENİŞ'e;

Beni her konuda destekleyen sevgili aileme ve manevi desteğini benden esirgemeyen nişanlım Süleyman AVCI'ya;

3819-YL2-13 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Mine AVCI
ISPARTA, 2015

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Bakteriyosinin (nisin) fosfolipidlere bağlanarak por oluşturması.....	6
Şekil 2.2. Bakteriyosinlerin (nisin) Lipid II molekülüne bağlanarak por oluşturması	7
Şekil 2.3. Enterosin AS-48 ile muamele edilen <i>L. monocytogenes</i> hücreleri	19
Şekil 2.4. Enterosin CRL35'in <i>L. monocytogenes</i> hücreleri üzerine etkisinin elektron mikroskobu ile görüntüsü	21
Şekil 2.5. Sitolisin üretilmesi, salgılanması ve hedef hücre varlığında ve yokluğunda aktivitesi.....	22
Şekil 4.1. Muhtemel enterokok izolatlarından bazılarının <i>B. cereus</i> FM1 suşuna karşı gösterdiği inhibisyon zonları.....	39
Şekil 4.2. 1-9 nolu enterokok izolatının Proteinaz -K enzim uygulaması sonucu verdiği yarım ay görünümü inhibisyon zonu	44
Şekil 4.3. PZR ile çoğaltılan enterokok izolatlarının 16S rDNA bölgeleri	48
Şekil 4.4. Enterokok suşlarında <i>entA</i> yapısal genine ait PZR görüntüsü.....	52
Şekil 4.5. Enterokok suşlarında <i>entB</i> yapısal genine ait PZR görüntüsü.....	53
Şekil 4.6. Enterokok suşlarında <i>entP</i> yapısal genine ait PZR görüntüsü.....	54
Şekil 4.7. Enterokok suşlarında <i>entX</i> yapısal genine ait PZR görüntüsü.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Klaenhammer'e göre bakteriyosinlerin sınıflandırması.....	8
Çizelge 2.2. Cotter vd.'e göre bakteriyosinlerin sınıflandırması.....	8
Çizelge 3.1. İndikatör bakterilerin gelişme sıcaklıkları.....	25
Çizelge 3.2. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak reaksiyon karışımı..	31
Çizelge 3.3. Enterosin yapısal genlerinin belirlenmesinde hazırlanan reaksiyon karışımı	32
Çizelge 3.4. PZR primerleri, PZR koşulları ve PZR ürün büyüklükleri.....	33
Çizelge 4.1. Araştırmada kullanılan peynir örnekleri, örneklerin sağlandığı iller ve örneklerden elde edilen muhtemel enterokok izolatları ...	38
Çizelge 4.2. İndikatör bakterilere karşı farklı aktivite spektrumu veren enterokok izolatları ve zon çapları.....	40
Çizelge 4.3. Çapraz aktivite spektrumu.....	46
Çizelge 4.4. İzolatların 16S rDNA PZR fragmentlerinin dizi analizi sonucu saptanan genotipik tanısı	49
Çizelge 4.5. Enterokok suşlarında tespit edilen enterosin yapısal genleri	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bç	Baz çifti
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
g	Gram
kb	Kilobaz
kDA	Kilodalton
LAB	Laktik asit bakterileri
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
s	Saniye
sn	Saniye
SDS	Sodyum dodesil sülfat
µL	Mikrolitre

1.GİRİŞ

Hayvan ve insan sindirim sisteminin bir parçası olan ve laktik asit bakterileri (LAB) içerisinde yer alan *Enterococcus* cinsi bakteriler, yüzey sularında, toprakta, bitkilerde ve birçok gıda ürününde bulunmaktadır. 25'ten fazla türe sahip olan bu bakterilerden *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* türleri gıdalardan ve klinik kaynaklardan sıklıkla izole edilmektedir.

Enterokoklar yüksek tuz ve asit konsantrasyonu gibi zorlayıcı koşullara dayanım gösterdikleri için birçok gıdada ortam şartlarına uyum sağlayabilmektedir. Bu bakteriler lipaz, proteaz üretme kapasiteleri ve bazı gıdalara arzu edilen organoleptik özellikler sağlayan belirli uçucu bileşikler sentezleme yetenekleri nedeniyle gıda endüstrisinde starter olarak kullanılabilir. *Enterococcus* suşlarının izole edildiği gıda örnekleri sebzeler olabileceği gibi daha çok et, süt ve süt ürünlerini kapsayan hayvansal ürünlerden oluşmaktadır. Bu bakterilerin gıdalarda bulunma sıklığı ise gıdanın çeşidine, mevsimsel değişikliklere ve gıdanın işlenme koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde çiğ süt ya da pastörize süttten üretilen geleneksel peynirlerin çoğunda enterokok türü bakteriler sıklıkla izole edilmekte ve bu bakteriler ürettikleri metabolitleri ile peynirlerin olgunlaşmasına katkı sağlamaktadır. Feta, Mozzarella, Bryndza, Tulum ve Beyaz peynir gibi birçok peynir çeşidinin üretiminde *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus durans* türlerinin kullanıldığı bilinmektedir. Söz konusu bakterilerin özellikle Akdeniz ülkelerinde üretilen geleneksel peynirlerin tipik tat ve aroma oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Enterokokların proteolitik ve lipolitik aktivitelerinin yanında karbon kaynağı olarak sitrat ve piruvatı kullanmaları, bazı enterokok türlerinin probiyotik özellikler içermesi ve bakteriyosin üretme yetenekleri bu bakterileri teknolojik açıdan önemli kılmaktadır. Bakteriyosinler, ribozomlarda sentezlenen protein yapısında bileşikler olup, yakın akraba türlerin yanında gıda kaynaklı patojenleri ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe edebilen doğal

antimikrobiyellerdir. Enterokoklar tarafından üretilen ve en çok rastlanılan bakteriyosinler diğer adı ile “enterosinler” A, B, P, AS-48, L50A, L50B, 1071A, 1071B, Q ve sitolisindir. Çoğu enterosin ısıya dayanıklı, lantibiyotik olmayan ve yakın türlerin yanında *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *C. spp.*, *Bacillus spp.* türlerine karşı da antibakteriyel etki gösterebilen küçük peptitlerdir.

Son yıllarda tüketicilerin kimyasal katkı içermeyen doğal gıdalara karşı artan talebi, gıda endüstrisini yeni ve alternatif stratejiler aramaya teşvik etmiştir. Birçok gıda sisteminde doğal olarak bulunmaları ile sahip oldukları bazı teknolojik ve probiyotik özellikler göz önüne alındığında gıda kaynaklı *Enterococcus* cinsine ait türler ve bu türler tarafından üretilen doğal antimikrobiyeller olan bakteriyosinler, artan ilginin odağı haline gelmiştir. Bu neden ile yapılan tez çalışmasında geleneksel olarak üretilmiş peynirlerden bakteriyosin üreticisi *Enterococcus* suşlarının izolasyonu, karakterizasyonu ve bu suşlar tarafından üretilen bakteriyosinlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile tanımlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Enterekokların Genel Özellikleri

Enterococcus cinsi bakteriler, 1984 yılına kadar “fokal streptokoklar” adı altında ve Lancefield tarafından yapılan gruplandırmaya göre D grup Streptokoklar içerisinde yer almaktaydı. *Enterococcus* cinsi ilk olarak, yapılan DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyon çalışmaları ile *Streptococcus* cinsinden ve daha sonra yapılan 16S rDNA dizi analizleri ile *Lactococcus* cinsinden ve diğer bazı Gram pozitif koklardan ayrılmışlardır. Böylece *Streptococcus* cinsi, *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus* olmak üzere 3'e ayrılmıştır. Günümüz taksonomisine göre *Enterococcus* cinsi, *Melissococcus*, *Tetragenococcus* ve *Vagococcus* cinsleri ile birlikte *Enterococcaceae* familyası içinde bulunurlar (Schleifer ve Kilpper-Bälz, 1984; 1987; Schleifer vd., 1985; Vos vd., 2009).

Gram pozitif, katalaz negatif reaksiyon gösteren ve spor oluşturmeyen *Enterococcus* cinsi bakteriler, gelişme ortamlarında tekli, ikili ya da kısa zincir halinde, kok bazen de oval kok morfolojisinde bulunmaktadır. Fakültatif anaerob ve kemoorganotrof olan ve zengin besinsel ihtiyaçları bulunan bu cins bakteriler, glukoz fermentasyonu sonucu L (+) laktik asit üretmektedir. *Enterococcus* cinsine ait bakterilerin büyük çoğunluğu (*E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* ve *E. mundtii*) 10 °C ve 45 °C'de, ortam pH'sının 9,6 olması durumunda, % 40 safra ve % 6,5 NaCl varlığında gelişme göstermektedir. 45 °C'de gelişmeyen *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. malodoratus* ve *E. moraviensis*; 10 °C'de gelişmeyen *E. cecorum* ve *E. columbae* ile % 6,5 NaCl varlığında az gelişen veya gelişemeyen *E. avium*, *E. saccharaminimus*, *E. cecorum* ve *E. columbae* suşlarıdır. *Enterococcus* cinsi bakterilerin optimum gelişme sıcaklıkları 35 °C'de olmakla birlikte 30 dk süre ile 60°C sıcaklık uygulamasında canlılıklarını sürdürebilirler (Franz vd., 1999; Klein, 2003; Foulquié Moreno vd., 2006; Fisher ve Phillips, 2009).

Günümüze kadar tanımlanan *Enterococcus* cinsi üyesi bakterilerden bazıları; *E. avium*, *E. asini*, *E. azikeevi*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E.*

durans, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. moraviensis*, *E. haemoperoxidus*, *E. porcinus*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. phoeniculicola*, *E. raffinosus*, *E. rottae*, *E. saccharolyticus*, *E. seriolicida*, *E. solitarius* ve *E. villorum*'dur. Bu bakteriler içerisinde *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları, ekstrem koşullara gösterdikleri dayanım (yüksek ve düşük sıcaklık uygulamaları, yüksek pH dereceleri ve tuz konsantrasyonlarına dayanım gibi) ile sahip oldukları teknolojik özellikler (asitlik üretimi, proteolitik ve lipolitik aktivite, probiyotik özellikler ve bakteriyosin üretimi gibi) nedeniyle gıda teknolojisinde özellikle süt ve süt ürünleri sanayinde kullanım alanı bulmaktadır (Foulquie Moreno vd., 2006; Erginkaya vd., 2007; İşleroğlu vd., 2008; Tatlı, 2009).

Bazı *Enterococcus* suşları hayvan ve insanlarda çeşitli hastalıklara (endokarditis ve idrar yolu enfeksiyonu gibi) neden olmaktadır. Diğer taraftan bazı araştırmacılar tarafından fekal bulaşlar olarak da görülen enterokokların bazı peynirlerde bulunması, hijyenik olmayan koşullarda üretim yapıldığını göstermektedir. Aynı zamanda bazı peynirlerde söz konusu bakteriler bozulmalara da neden olabilmektedir. Bu nedenle *Enterococcus* cinsi suşların peynir ve diğer fermente gıdaların üretiminde kullanılması halen tartışma konusudur (Franz vd., 1999; Giraffa, 2003; Malek vd., 2012).

2.2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri

Bakteriyosinler, mikroorganizmalar tarafından, ribozomal olarak sentezlenen, antibiyotiklere kıyasla dar etki spektrumuna sahip ve genellikle yakın türler üzerine etki gösteren, antibakteriyel aktiviteye sahip proteinlerdir (Klaenhammer vd., 1993; Floriano vd., 1998; Dinçer vd., 2009).

Bakteriyosinlerin gösterdiği inhibisyon aktivitesi, antibiyotiklerin sahip olduğu antibakteriyel etki ile benzerlik göstermektedir. Bu durum çoğu zaman bakteriyosinler ile antibiyotiklerin karıştırılmasına neden olmaktadır. Ancak bakteriyosinleri antibiyotiklerden ayıran bazı farklılıklar bulunmaktadır.

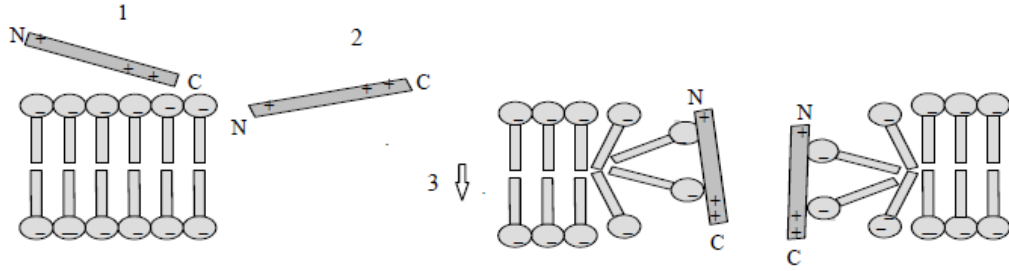
Bakteriyosinler ile antibiyotikler arasındaki temel farklılıklar şu şekilde özetlenebilir:

- Bakteriyosinler prepeptitler (öncü peptitler) olarak ribozomlarda üretilirler. Daha sonra translasyon sonrası işlemler ile öncü peptidin N-terminal ucunda bulunan lider peptidin uzaklaştırılması ile bakteriyosinlerin olgun formları oluşturulur. Antibiyotikler ise enzimatik işleme aracılığıyla aktif formlarını kazanırlar.
- Primer (birincil) metabolitler olan bakteriyosinler genellikle gelişme fazında üretilirken, sekonder (ikincil) metabolitler olan antibiyotikler ise durma fazında üretilirler.
- Bakteriyosin üreten hücreler kendi ürettikleri bakteriyosine karşı dirençlilik sağlayan proteinlere sahiptir. Dirençlilik proteinini kodlayan genler, bakteriyosinin yapısal genleri ile bağlantılı iken antibiyotik dirençliliği yöneten genler ise, yapısal antibiyotik genleri ile bağlantılı değildir.
- Bakteriyosinlerin etki spektrumları antibiyotiklere göre çok daha dardır (De Vuyst ve Vandamme 1991; 1994; Nes vd., 2002; Gillor vd., 2005; Reuranen, 2007; Yiğit, 2009).

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlere duyarlı olan mikroorganizmalar genellikle Gram pozitif bakterilerdir. Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkarit tabakası antimikrobiyel ajanlara karşı dirençli bir bariyer oluşturduğundan bu bakteriler bakteriyosinlerden genellikle etkilenmezler (Hyun-Jung Chung, 2003). Ancak Gram negatif bakterilerin dış membranında aşınmalara neden olan çeşitli fiziksel (soğuk şoku vb.) ve kimyasal (EDTA, Tris vb.) uygulamalar ile bu bakteriler de bazı bakteriyosinlere karşı duyarlı hale gelebilmektedir (Boziaris ve Adams, 1999; 2000; 2001; Osmanağaoğlu, 2005).

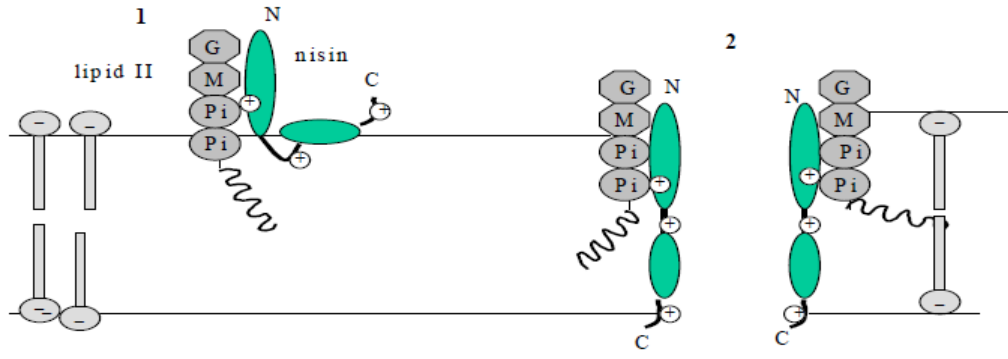
Bakteriyosinler duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptirler. Birçok bakteriyosin, hedef hücre membranında özel reseptör bölgeye ihtiyaç duymaksızın, bakteriyosinin pozitif yüklü N ve C

uçları, hedef hücre membranında bulunan negatif yüklü fosfolipidlerle birleşerek membrana bağlanmakta ve hücrenin membran bütünlüğünü bozmak suretiyle hedef hücre inhibisyonunu gerçekleştirmektedir (Şekil 2.1). Özel reseptör bölgeye ihtiyaç duymadan hedef hücre membranına bağlanan en bilinen bakteriyosin nisindir (Nes ve Holo 2000; Twomey vd., 2002; Hyun-Jung Chung, 2003; Hampikyan ve Çolak, 2007; Özbaş, 2014).



Şekil 2.1 . Bakteriyosinin (nisin) fosfolipidlere bağlanarak por oluşturması
 (1) Nisinin hücre zarına bağlanması
 (2) Zarın içine yerleşimi
 (3) Anyonik fosfolipidlerin bakteriyosin ile etkileşimi sonucu por oluşumu (Koponen, 2004).

Bakteriyosinlerin sahip olduğu diğer bir etki mekanizması ise; hücre duvarı sentezinin durdurulmasıdır. Bakteriyosin hücre duvarı sentezinin öncü molekülü olan ve peptidoglikan alt ünitelerini sitoplazmadan hücre duvarına taşıyan Lipid II molekülüne bağlanır ve Lipid II molekülünün peptidoglikan zincirine bağlanmasını engeller. Böylece hücre duvarı sentezi Şekil 2.2’de görüldüğü gibi durdurulur (Van Kraaij vd., 1999; Hampikyan ve Çolak, 2007; Özbaş, 2014). Hücre duvarı sentezinin durdurulması ile oluşan porlar, düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerin özellikle iyonların hücre dışına sızmasına yol açarlar (Şekil 2.2). Hücre içi pH dengesinin sağlanmasında oldukça önemli K^+ iyonlarının ve enerji kaynağı olan ATP moleküllerinin oluşan bu porlardan hücre dışına sızması, hücrede biyokimyasal olayların durmasına neden olmaktadır (Garcia-Garcera vd., 1993; Casaus vd., 1997; Bennik vd., 1998; Gillor vd., 2005; Kurt ve Zorba, 2005; Lubelski vd., 2008; Simova vd., 2009; Kavas ve Kavas, 2012).



Şekil 2.2. Bakteriyosinlerin (nisin) Lipid II molekülüne bağlanarak por oluşturması.

(1) Nisin ilk aşamada Lipid II'nin karbonhidrat parçasına dıştan yönelimli olarak bağlanır. N-terminal bölgesi bağlanma için gereklidir.

(2) C-terminal kısmı ise membranı geçerek por yapısını tamamlar (Koponen, 2004).

2.3. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsünde bulunan ve fermente gıda endüstrisinde çeşitli şekillerde kullanım olanağı bulunan LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, üzerinde deneysel çalışmaların en çok yapıldığı doğal antimikrobiyellerdir. LAB tarafından üretilen antimikrobiyel bileşiklerin sınıflandırılmasında pek çok farklı özellik kullanılmaktadır. Günümüzde halen kabul gören Klaenhammer'ın 1993 yılında yaptığı ve ardından Nes vd.'nin 1996 yılında bazı değişiklikler yaptığı sınıflandırmaya göre moleküler ağırlıkları, ısı stabiliteleri, etki spektrumları, enzim hassasiyetleri ve modifiye aminoasit içerikleri (lantiyonin ve β -metillantiyonin) esas alındığında LAB tarafından üretilen bakteriyosinler 4 gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.1) (Klaenhammer, 1993; Nes vd., 1996; Kurt ve Zorba, 2005; Dinçer vd., 2009).

Çizelge 2.1. Klaenhammer'e göre bakteriyosinlerin sınıflandırması (1993).

Grup I	Lantibiyotikler
	IA: Nisin benzeri, ince uzun, vida şeklinde, katyonik moleküller IB: Duramisin benzeri, globüler moleküller ile düşük net negatif yükler
Grup II	Lantibiyotik olmayan
	IIA: Pediyosin benzeri, anti-L.l bakteriyosinler IIB: İki peptidli bakteriyosinler
Grup III	Büyük, ısıya karşı kararsız proteinler
Grup IV	Lipit veya karbonhidrat yan grupları içeren kompleks bakteriyosinler

2005 yılında ise Cotter vd., Klaenhammer tarafından yapılan bakteriyosin sınıflandırılmasında bazı değişiklikler yaparak yeni bir sınıflandırma şekli oluşturmuştur. Bu sınıflandırmaya göre bakteriyosinler Sınıf I, Lantibiyotikler; Sınıf II, Lantibiyotik olmayan bakteriyosinler; daha önceki sınıflandırmada ısıya duyarlı bakteriyosinlerin oluşturduğu Sınıf III ise bakteriyolizinler adını alarak olarak 3'e ayrılmıştır (Çizelge 2.2). Klaenhammer sınıflandırmasında Sınıf IV içinde yer alan kompleks bakteriyosinler ise iptal edilmiştir (Cotter vd., 2005; Reunanen, 2007).

Çizelge 2.2. Cotter vd.'e göre bakteriyosinlerin sınıflandırması (2005).

Sınıflandırma	Açıklamalar
<u>Sınıf I</u> Lantiyonin içeren bakteriyosinler	Tek ve iki peptid lantibiyotik içerirler
<u>Sınıf II</u> Lantiyonin içermeyen bakteriyosinler	Küçük peptidlerden oluşan heterojen grup
<u>Sınıf III</u> Bakteriyosin olmayan litik proteinler	Büyük, ısıya duyarlı proteinler

2.3.1. Grup I bakteriyosinler (Lantibiyotikler)

Bu gruptaki bakteriyosinler daha çok "lantiyonin" içermeleri nedeniyle lantibiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Yapılarında bilinen amino asitlerden farklı olarak lantiyonin (Lan) ve β -metillantiyonin (MeLan) gibi tiyoeter amino asit türevlerini ve zincir içi sülfür köprülerini bulunduran bu grup bakteriyosinler polisiklik yapıdadır (Schnell vd., 1988). Bununla birlikte lantibiyotikler sık sık dehidroalanin (Dha) ve dehidrobütirin (Dhb) gibi doymamış amino asitleri de içermektedir (Kellner ve Jung, 1989). Nadir bulunan amino asitler translasyon sonrası gerçekleşen enzimatik modifikasyonlar sonucu oluşmaktadır. Lantibiyotikler ribozomlarda iki farklı parçadan oluşan inaktif öncü peptitler (prepeptit) olarak sentezlenmektedir (Jung, 1991; Sahl vd., 1995). Aktivite kazanmaları için translasyon sonrası amino ucunda bulunan lider peptit proteolitik enzim aktivitesiyle uzaklaştırılmalıdır. Bu enzimatik reaksiyon lantibiyotiğin üretildiği hücrenin içinde gerçekleşebildiği gibi lantibiyotiğin hücre dışına transferi sırasında veya sonrasında da gerçekleşebilmektedir (McAuliffe vd., 2001). Lantibiyotik gen kümeleri bakteriyel kromozomlar üzerinde veya plazmidler ile transpozonlar gibi hareketli elemanların üzerinde lokalize olmuşlardır (Gillor vd.,2005). Bu grup bakteriyosinlerin molekül ağırlıkları 5 kDa'dan daha düşüktür. Pozitif yüke sahip hidrofobik moleküller olan lantibiyotikler genellikle ısı uygulamalarına karşı stabilitelelerini korumaktadır (Twomey vd., 2002; Kurt ve Zorba, 2005; Foulquie'-Moreno vd., 2006; Savadogo vd., 2006).

Bu gruptaki bakteriyosinler kimyasal yapılarına ve antimikrobiyel aktivitelerine göre IA (nisin-benzeri) ve IB (duramisin-benzeri) lantibiyotikleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Savadogo vd., 2006).

Grup IA: Bu grupta yer alan bakteriyosinler katyonik, hidrofobik ve doğrusal polipeptidlerdir. Hedef hücrelerde membran bütünlüğünü bozarak oluşturdukları porlardan hücre içeriğinin dışarı sızması ile bakteriyel inhibisyonu gerçekleştirirler. Bu grubun en bilinen üyesi nisindir (Koponen, 2004).

Grup IB: Globüler yapıda olan bu grup bakteriyosinler yüksüz veya düşük negatif yüke sahiptir. Antimikrobiyel aktivitelerini enzim inhibitörü olarak görev yaparak gösterirler ve hedef hücrede spesifik enzimleri inhibe ederler (Koponen, 2004).

2.3.2. Grup II Bakteriyosinler (Lantibiyotik Olmayan Isı Stabil Bakteriyosinler)

Grup I bakteriyosinlerinden farklı olarak Grup II bakteriyosinleri yapılarında lantiyonin gibi amino asitler içermemektedir. Isı uygulamasına karşı dayanıklı olan bu bakteriyosinlerin molekül ağırlıkları 10 kb'dan azdır. 3 alt gruba ayrılan Grup II bakteriyosinler antimikrobiyel aktivitelerini, hedef hücrelerin zar geçirgenliğini bozarak göstermektedir (Poeta vd., 2007; Simova vd., 2009; Leroy ve De Vuyst, 2010; Lahtinen vd., 2012).

Grup IIA (Pediyoşin benzeri bakteriyosinler): Bu grupta yer alan bakteriyosinler özellikle *L.* cinsine karşı antimikrobiyel aktivite gösteren peptitlerdir. Bu grupta yer alan bakteriyosinler *L.*'dan başka *C.*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* suşlarına karşı da aktiftirler (Drider vd., 2006). Enterosinler genellikle bu sınıfa üyedir ve çok güçlü anti*L.* etkiye sahiptirler (Leroy ve De Vuyst, 2010).

Pediyoşine benzerlikleri ile dikkat çeken Grup IIA bakteriyosinleri, peptit zincirinin N-uç bölgelerinde bulunan YGNGVXC (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys) amino asit motifi ile karakterize edilirler. Grup IA lantibiyotikleri gibi hedef hücre membranlarında por oluşturmak suretiyle aktivitelerini gösterirler. Pediyoşin PA-1 (AçH), lökosin A, sakasin P ve enterosin A bu grubun bilinen üyeleridir (Nes vd., 1996; Franz vd., 1999; Ennahar vd., 2000; O'Sullivan vd., 2002).

Grup IIB (İki peptidli bakteriyosinler): İki peptidli bakteriyosinler olarak bilinen bu grubun üyeleri arasında bulunan bakteriyosinler laktokoksin G, laktokoksin F ve laktasin F'dir. Amino asit dizileri birbirinden farklı olan bu

peptitler ayrı ayrı zayıf bir inhibisyona sahip iken bir arada bulduklarında meydana gelen sinerjetik etki ile tam aktivite gösterirler. İki polipeptidin aktif hale gelmesiyle bu bakteriyosinler de hücre membranında por oluşturarak antimikrobiyel aktivite göstermektedir (Nes vd., 2002; Folquie-Moreno vd., 2006; Kıran vd., 2013).

Grup IIC: Grup IIA ve IIB alt grupları dışında kalan diğer Grup II bakteriyosinlerinden oluşan Grup IIC üyelerine örnek olarak asidosin B verilebilir. Bu grupta yer alan bakteriyosinlerin çoğu, yapılarında bulunan sistein amino asit kalıntılarından dolayı tiyolbiyotikler veya sistibiyotikler olarak anılırlar (De Martinis vd., 2002; Riley ve Wertz, 2002; Alvarez-Cisneroz vd., 2011).

2.3.3. Grup III bakteriyosinler (Yüksek moleküler ağırlığa sahip ısıya duyarlı bakteriyosinler)

Bu gruptaki bakteriyosinlerin molekül ağırlıkları 30 kDa'dan daha büyüktür. Şimdiye kadar sadece *Lactobacillus* cinsi üyeleri tarafından üretildiği bildirilen bu grup bakteriyosinler ısıya karşı duyarlı olup hidrofilik özellik göstermektedir. Helvetisin J, laktasin A ve B bu grupta yer alan bazı bakteriyosinlerdir (Klaenhammer, 1993; Jeevaratnam vd., 2004; Salminen vd., 2005; Ferreira vd., 2007).

2.3.4. Grup IV bakteriyosinler (Lipit veya karbonhidrat yan grupları içeren kompleks bakteriyosinler)

Bu gruptaki bakteriyosinler polipeptit zincirlerinin yanında aktivitelerini gösterebilmeleri için yapılarında bulunan karbonhidrat veya lipid yan gruplarına ihtiyaç duymaktadır. Plantarasin S, laktosin 27 ve lökonosin S bu grupta bulunan bakteriyosinlerdir (Klaenhammer 1993; Nes ve Tagg 1996; Ennahar vd., 2000; Nes ve Holo 2000).

2.4. Bakteriyosinlerin Gıdalarda Kullanımı

Modern toplumlarda gıda güvenliği ile ilgili duyulan endişe her geçen gün artmaktadır. Gıdalara eklenen kimyasal katkıların neden olabileceği toksik ve alerjik etkilerden çekinen toplum, doğal kaynaklar ile üretilen gıdalar ve bu gıdalar ile oluşturulmuş diyetlere ilgi duymaktadır. Son yıllarda sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı kimyasal katkı içermeyen doğal gıdalar, tüketiciler arasında popüler hale gelmiştir. Diğer taraftan kimyasal olarak sentezlenen koruyucu ve antibiyotiklerin uzun süreli tüketiminin, insan bağırsak sisteminde bulunan yararlı bakterilerin sayısını azaltarak insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebileceği bilinen bir gerçektir. Kimyasal koruyucular ve antibiyotiklerin tersine GRAS statüsünde yer alan nisin gibi bakteriyosinler, gıda üretim proseslerinde kontaminasyon yolu ile bulaşan mikroorganizmaları inhibe etmelerinden dolayı sebze, süt, peynir, et, ve diğer gıda ürünlerinde gıda koruyucu olarak güvenle kullanılabilir (Deegan vd., 2006; Settanni ve Corsetti, 2008).

Bakteriyosinler günümüzde gıdaların muhafaza sürelerini uzatmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Fermente gıda ürünlerinde bakteriyosin üreticisi LAB starter kültür ya da yardımcı kültür olarak fermentasyon proseslerine katılarak, gıdanın aroma gelişimine katkıda buldukları gibi bozulma etmeni ve patojen bakterileri inhibe ederek raf ömrünü de uzatmaktadır. Ayrıca saflaştırılmış bakteriyosinlerin direkt olarak gıdalara eklenmesi de mümkündür (Settanni ve Corsetti, 2008).

Antik çağlardan beri doğal koruyucu olan bakteriyosin üreticisi suşlar peynir ve yoğurt gibi ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Yang vd., 2012; Todorov vd., 2014). Diğer taraftan et ve et ürünleri, balık ve diğer deniz ürünleri, zeytin, çeşitli turşular ile çeşitli içeceklerin üretiminde bakteriyosinler ve bakteriyosin üreticisi LAB kullanılmaktadır (Settanni ve Corsetti, 2008).

L. monocytogenes, *S. aureus*, *C. botulinum* ve *Salmonella* spp. gibi birçok patojen mikroorganizma üzerinde etkili olmaları nedeniyle, LAB tarafından üretilen

bakteriyosinlerin gıdalarda kullanım potansiyelleri oldukça artmıştır (Kurt ve Zorba, 2005; Yiğit, 2009; Altuntaş ve Ayhan, 2010; Altuntaş vd., 2010). Gıda teknolojisinde nisin, *L. lactis* suşları tarafından üretilen ve LAB'ne ait tanımlanan ilk antibakteriyel peptitdir (Rogers 1928). Nisaplin adı ile ticari üretimi yapılan nisinin, Gıda ve İlaç İdaresi tarafından Amerika Birleşik Devletleri dahil birçok ülkede gıda koruyucusu olarak kullanımı onaylanmıştır (Settanni ve Corsetti, 2008). Nisin süt, et, peynir ve yüksek asitli konserve ürünlerinde *C. türlerinin* inhibe edilmesi ve diğer bozulma etmeni bakterilerin gelişiminin engellenmesi amacı ile başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Rilla vd., 2003; Delves-Broughton, 2005; Udampijitkul vd., 2012; Garde vd., 2014; Avila vd., 2014). Ayrıca ticari olarak üretimi yapılan ve Alta® 2341 markası ile bilinen pediyosin PA-1, et ürünlerinde *L. monocytogenes* gelişimini engellemek amacı ile kullanılmaktadır (Settanni ve Corsetti, 2008). Geleneksel Avrupa peynirleri gibi süttten üretilen birçok gıda ürünüde işleme esnasında hayvan kaynaklı kontaminasyonlar sıklıkla meydana gelmektedir. Bakteriyosin üreticisi *Enterococcus* suşları peynir üretiminde starter ya da yardımcı starter kültür olarak kullanılarak kontaminant floranın gelişmesi engellenebilmektedir (Foulquie' - Moreno vd., 2006).

Doğal gıda koruyucusu olarak gıdalara bakteriyosin ilave edilmesi ile gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların çoğalması engellenmekle birlikte, gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmalar nedeni ile yaşanan ekonomik kayıplar en aza indirgenmektedir. Ayrıca bakteriyosin kullanımı ile gıdaların üretiminde sıklıkla kullanılan kimyasal koruyucuların miktarı azaltılabilmekte ve aynı zamanda gıdaların korunmasında uygulanan ısı işlemler ve diğer fiziksel muameleler azaltılabilmektedir. Böylece tüketicilerin de arzu ettiği daha az işlem görmüş, besinsel değeri ve organoleptik özellikleri korunmuş gıdaların üretimi sağlanabilmektedir (Thomas ve Wimpenny, 1996; Powell, 2006; Dinçer vd., 2009; Altuntaş ve Ayhan, 2010; Kavas ve Kavas, 2012).

2.5. Enterokoklar Tarafından Üretilen Bakteriyosinler

Enterococcus cinsi üyesi bakteriler birçok gıdada bulunmaktadır. Hayvanların dışkılarından, kullanılan sulardan, sağım ekipmanlarından ve süt depolama tanklarından kontaminasyon yolu ile peynirlere bulaştığı düşünülen bu cins bakteriler özellikle Akdeniz ülkelerinde çiğ koyun ya da keçi sütü kullanılarak üretilen peynirlerde sıklıkla bulunmaktadır. Günümüzde *Enterococcus* cinsi bakterilerin, peynirin olgunlaşmasında ve son ürüne has tat ve koku oluşumunda oldukça önemli role sahip olduğu bilinmektedir (Manolopoulou vd., 2003; Foulquié-Moreno vd., 2006). Ürüne has tat ve lezzet sağlamanın yanında ürettikleri bakteriyosinler ile enterokoklar peynir ve ette yaygın olarak bulunan *L. monocytogenes* gibi çeşitli patojenlere karşı koruyucu ajan görevi de üstlenmektedir (De Vuyst ve Vandamme, 1994).

Enterokoklar tarafından üretilen ilk bakteriyosin benzeri madde 1955 yılında tanımlanmıştır. Bu tarihten itibaren farklı araştırmacılar tarafından çok sayıda bakteriyosin üreticisi enterokok suşu izole edilmiş ve birçok bakteriyosin diğer adı ile enterosin tanımlanmıştır. Enterokoklar tarafından üretilen enterosinlerin çoğu *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarından izole edilmiş ve moleküler olarak karakterizasyonu yapılmıştır (Nes vd., 2007; Badarinath ve Halami, 2011). Enterosin üretici suşlar fermente gıdaların (süt ürünleri, sosis vb.) yanında, fermente olmayan gıdalar (balık, sebze vb.), silaj, su, hayvan ve insan dışkısından izole edilmiştir (Foulquié-Moreno vd., 2006; Ferreira vd., 2007; Bilgin, 2008; Tuncer, 2009; Tuncer vd., 2014; Anadani ve Khan, 2014).

Enterokokların en bilinen enterosinleri; A, B, P, AS-48, L50A, L50B, 1071A, 1071B, Q, CRL35, Bakteriyosin 31 ve Sitolisin'dir. Söz konusu enterosinler *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. spp.* (özellikle *C. botulinum* ve *C. perfringens*) ve *Vibrio cholerae*'ya karşı aktivite göstermektedir. Enterosinler genellikle Sınıf II bakteriyosinler grubunun bir üyesi olan enterosinler, güçlü anti-Listeriyal etkili, ısıya karşı dayanıklı peptitlerdir (Sparo vd., 2012). Gıdalarda kullanılacak bir antimikrobiyel madde için istenen koşulları sağlayan enterosinler, gıda

koruyucusu olarak çeşitli gıda sistemlerinde uygulama potansiyeli taşımaktadır (Giraffa, 2003; Gürsoy ve Kınık, 2006; Ferreira vd., 2007).

Enterosinler diğer çoğu bakteriyosin gibi, sitoplazmik membran üzerinde etkili olup hücre membranında por oluşturmak suretiyle hücre içi moleküllerin hücre dışına sızmasına neden olmaktadır. Enterokokal bakteriyosinler genellikle *L. spp.*, *Staphylococcus spp.*, *C. spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *E. coli* ve *Vibrio cholerae* gibi bazı Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı inhibitör aktiviteye sahiptirler (McAuliffe vd., 2001; Kopenon, 2004; Foulquie-Moreno vd., 2006; Bilgin, 2008; İşleroğlu vd., 2008b; Tuncer vd., 2014).

Enterosinler, proteinaz- K, α -kemotripsin, tripsin, pepsin gibi çeşitli proteolitik enzim uygulamaları ile aktivitelerini tamamen ya da kısmen kaybetmektedir. Diğer taraftan enterosinler lipaz, amilaz ve katalaz enzim uygulamaları sonucunda aktivitelerini korumaktadır. Yüksek asitliğe sahip ortamlarda aktiviteleri artan enterosinler aynı zamanda geniş pH aralıklarında aktivite göstermektedir. Donma ve buzdolabı koşulları ile yüksek sıcaklığa (100°C) dayanım gösteren enterosinler liyofilizasyon ile kurutmadan sonra uzun süre stabilitelerini koruyabilmektedirler (Cleveland vd., 2001; Bilgin, 2008).

2.5.1. Enterosin A

E. faecium suşları tarafından üretilen enterosin A, pediyosin benzeri bakteriyosinleri içeren Sınıf IIa üyesidir (Bellei vd., 2011). İlk olarak *E. faecium* CTC492 suşu tarafından üretildiği tespit edilen ve 4829 Da moleküler ağırlığa sahip enterosin A, 47 amino asit kalıntısı ile iki disülfid köprüsü içermektedir (Aymerich vd., 1996; Casaus vd., 1997; Liu vd., 2008; Xiaoyuan Hu vd., 2014). Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etki göstermeyen enterosin A, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *Propionibacterium spp.*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gibi birçok Gram pozitif bakteriye karşı inhibitör aktivite göstermektedir (Casaus vd., 1997). Etki mekanizması üyesi olduğu Sınıf IIa bakteriyosinlerle aynı olup hücre zarında por oluşturmaya yöneliktir (O'Keeffe vd., 1999).

Enterosin A geniş bir pH aralığında (pH 2 ile 11 arasında) aktivitesini korumaktadır. Logaritmik fazın sonuna doğru maksimum seviyede üretilen enterosin A proteolitik enzim uygulamalarına karşı duyarlıdır. Buna karşın söz konusu bakteriyosin, 20 dk süre ile 80-100°C ısı uygulaması ve lipaz ve α -amilaz enzim uygulaması sonucu aktivitesini korumaktadır. Liyofilizasyon işlemi ve 12 ay süre ile -20°C'de depolama, enterosin A'nın aktivitesini etkilememektedir (Ennahar ve Deschamps, 2000; Bilgin, 2008).

Enterosin A üretim yeteneği aktarılmış *L. lactis* MG1614 suşunun kullanıldığı Cottage peyniri üretim denemelerinde, 2. günün sonunda *L. monocytogenes* tespit edilememiştir. Enterosin A üretim yeteneği içermeyen *L. lactis* suşlarının kullanıldığı Cottage peyniri kontrol örneklerinde ise 10. günde halen *L. monocytogenes* varlığını sürdürmüştür (Liu vd., 2008). Munster (kırmızı yüzeyli olgunlaştırılmış yumuşak peynir) peynirlerinde yüzeye sprej olarak uygulanan enterosin A üreticisi *E. faecium* WHE81 suşunun, peynir olgunlaşmasına ve peynir yüzeyinde pigment oluşumuna bir etkisi olmadığı ancak *L. monocytogenes* gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Izquierdo vd., 2009). Enterosin A üreticisi suşlar süt ürünleri yanında fermente et ürünlerinde de *L. monocytogenes* gelişimini inhibe etmektedir. Callewaert vd., (2000) yaptıkları bir çalışmada et kaynaklı olmayan *E. faecium* CCM 4231 ve *E. faecium* RZS C13 suşlarının fermente sucuk üretiminde kullanılması ile *L. monocytogenes* sayısının belirgin şekilde azaldığını tespit etmişlerdir (Aymerich vd., 2000).

2.5.2. Enterosin B

Sınıf II üyesi olan enterosin B, *E. faecium* suşları tarafından üretilmektedir. Küçük moleküler ağırlıklı, ısı uygulamasına dayanıklı, katyonik ve hidrofobik yapıya sahip olan enterosin B, yapısında modifiye amino asit içermemektedir (Casaus vd., 1997). Enterosin B, pediyosin benzeri bakteriyosinlerin içerdiği "YGNGVXC" amino asit dizisini içermemesine rağmen pediyosin benzeri bakteriyosinler ile sekans benzerliği taşımaktadır (Franz vd., 1999).

Gram negatif bakterilere karşı inhibisyon etkisi göstermeyen enterosin B, enterosin A gibi aralarında *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *Propionibacterium* spp., *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gibi Gram pozitif, patojen ve bozulma etmeni bakterilerin bulunduğu geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Ayrıca enterosin A ve B birlikte sinerjetik etki göstermektedir (Casaus vd., 1997; Aymerich vd., 2000).

2.5.3. Enterosin P

Cintas vd., (1997) İspanyol fermente sosisinden izole ettikleri *E. faecium* P13 suşunun enterosin P üreticisi olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları amino asit dizi analizine göre enterosin P'nin Grup IIa'yı oluşturan pedyosin benzeri bakteriyosinlerin yapısında bulunan "YGNGVXC" dizisine sahip ve moleküler ağırlığının da yaklaşık olarak 4,5 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Enterosin P gıda bozulma etmeni *E. faecalis*, *Staphylococcus carnosus*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum* ve *Propionibacterium* spp. suşları ile gıda kaynaklı patojen bakteriler olan *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *C. botulinum* ve *S. aureus* gibi birçok Gram pozitif bakteriyi içeren geniş bir etki spektrumuna sahiptir (Cintas vd., 1997; Salminen vd., 2005).

2.5.4. Enterosin L50

E. faecium L50 suşu tarafından üretildiği tespit edilen enterosin L50, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *C. perfringens*, ve *C. botulinum* gibi birçok Gram pozitif, patojen ve bozulma etmeni bakteriye karşı inhibisyon etkisi göstermektedir. Enterosin L50 bakteriyosinin aktivitesi, yapısal olarak birbirine oldukça benzeyen, küçük, katyonik ve hidrofobik yapıda ve sinerjetik etkili iki peptidin varlığına bağlıdır. Enterosin L50A ve L50B olarak bilinen bu iki peptitten L50A'nın aktivitesi daha fazladır (Cintas vd., 1998; Salminen vd., 2005).

Sıvı ortamda Ent L50A ve Ent L50B Gram negatif bakterilerin gelişmesini inhibe etmektedir. Yapılan çalışmada Gram negatif suşlar Ent L50B'ye Ent L50A'dan

daha duyarlı bulunmuş ve bu durum da bu iki peptidin etki modlarının farklı olabileceğini düşündürmüştür (Izquierdo vd., 2008).

2.5.5. Bakteriyosin 31

E. faecalis suşunda bulunan konjugatif bir plazmitte (pYI17) iki gen tarafından kodlanan bakteriyosin 31 Grup IIa üyesi olup 43 amino asitten oluşmaktadır. Dar bir antibakteriyel spektruma sahip olan bakteriyosin 31 kendi türü ile *L. monocytogenes* suşları üzerine inhibitör aktivite göstermektedir (Tomita vd., 1996; Salminen vd., 2005).

2.5.6. Enterosin AS-48

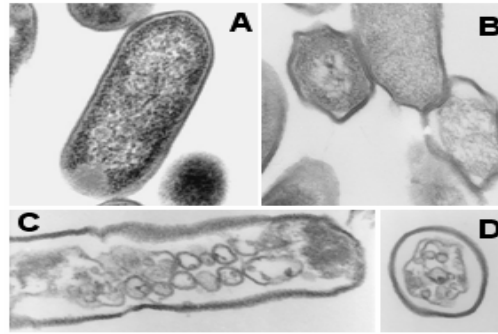
Enterosin AS-48, farklı kaynaklardan izole edilen *E. faecalis* suşları ile özellikle süt ve geleneksel peynirler başta olmak üzere gıda kaynaklı *E. faecium* suşları tarafından üretilen ve 7,4 kDa moleküler ağırlığa sahip, Grup III bakteriyosinlere üye bir enterosindir (Galvez vd., 1989; Jett vd., 1994; Joosten vd., 1997; Alvarez-Cisneros vd., 2011).

N-terminal ucunda bulunan metiyonin amino asiti ile C-terminal ucunda bulunan triptofan amino asiti arasında kurulmuş peptid bağı neticesinde halkasal yapıda olan enterosin AS-48, geniş pH aralıklarına, yüksek sıcaklık uygulamalarına ve çeşitli parçalayıcı ajanlara karşı stabilitesini korumaktadır. Diğer taraftan sindirim sistemi enzimleri olan tripsin ve pepsin gibi enzimler ile parçalanmaktadır. Bu özellikleri enterosin AS-48'i gıda uygulamaları için uygun bir aday yapmaktadır (Montalbán-Lopéz vd., 2008).

Enterosin AS-48 birçok Gram pozitif bakteriye karşı oldukça etkin inhibisyon aktivitesi göstermektedir. *Micrococcus* ve *Staphylococcus* suşları daha az duyarlı olmakla birlikte, *Brochothrix thermosphacta* ve *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinslerine ait türler ile *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *Paenibacillus* spp., *B. licheniformis*, *B. macroides*, *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *G. stearothermophilus*, *C. perfringens*, *C. sporogenes* ve *C. tetani*

cinsleri enterosin AS-48 ile inhibe olmaktadır. Yapılan çalışmalar Gram negatif bakterilerin de enterosin AS-48 ile inhibe olabildiğini göstermiştir. Ancak Gram negatif bakteriler Gram pozitif bakteriler ile kıyaslandığında bakteriyel membranlarının getirdiği koruyucu bariyer etkisi ile katı ortamlarda enterosin AS-48'e karşı 10 kat az duyarlılık göstermektedir. Enterosin AS-48'e karşı en hassas olan Gram negatif bakteriler *Myxococcus*, *E. coli* ve *Rhizobium* olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan enterosin AS-48 ile inhibisyonu sağlanan ancak AS-48'e karşı daha dayanıklı olan *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* ve *Klebsiella* gibi Gram negatif bakteriler de bulunmaktadır (Galv ez vd., 1989; Abriouel vd., 1998; Ananou vd., 2005; Mertinez-Viedma vd., 2008; Grande Burgos vd., 2012).

Hedef hücre inhibisyonunun gerçekleşmesi için birden fazla enterosin AS-48 molekülünün hedef hücre membranına farklı noktalardan bağlanması gerekmektedir (Galvez vd., 1989). Şekil 2.3'te g r ld ğu gibi sitoplazmik membrana ulaşan AS-48 molekülleri, hücre içi iyonların ve k uk molekül ağırlıklı oz nm ř moleküllerin dışarı sızmasına neden olan porlar oluşturmakta ve böylece hücre inhibisyonu gerçekleşmektedir (Galvez vd., 1991).



Şekil 2.3. Enterosinin AS-48 ile muamele edilen *L. monocytogenes* hücreleri. (A)Enterosin AS-48 uygulanmayan hücre, (B) 0.1 µg/ml enterosin AS-48 uygulanan hücreler (2 s), (C ve D) 3 µg/ml enterosin AS-48 uygulanan hücreler (10 dk) (Mendoza vd., 1999).

2.5.7. Enterosin 1071

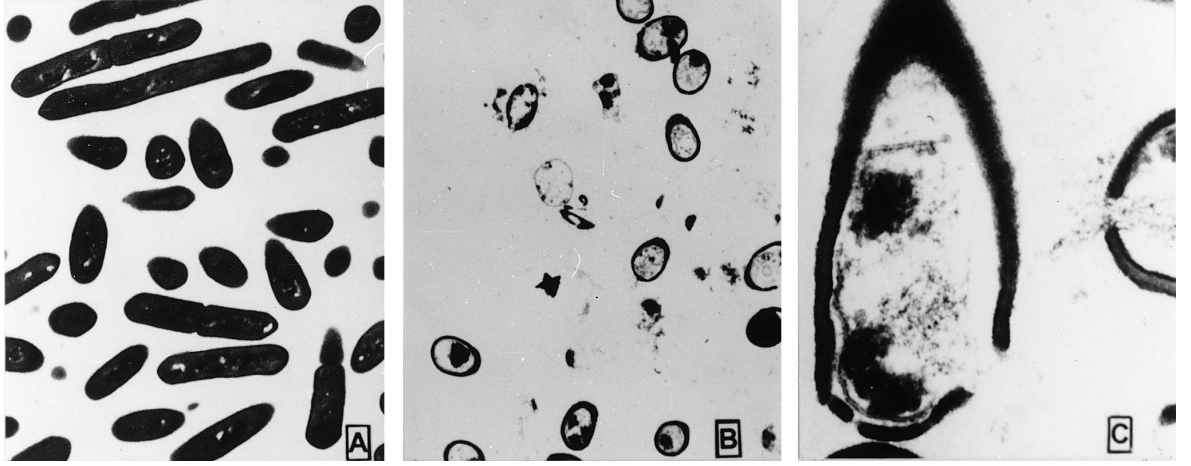
Arjantin peynirinden izole edilen *E. faecalis* FAIR-E 309 ve minyatür domuz dışkılarından izole edilen *E. faecalis* BFE 1071 suşları tarafından üretilen enterosin 1071, enterosin L50 gibi iki peptitli bir bakteriyosindir. 1071A ve 1071B olmak üzere sırasıyla 39 ve 34 amino asitten enterosin 1071, Grup IIB üyesidir. Ayrıca enterosin 1071A ve enterosin 1071B' nin moleküler ağırlıkları sırası ile 4,2 kDa ve 3,8 kDa olarak tespit edilmiştir (Vancanneyt vd., 1999; Balla vd., 2000; Franz vd., 2002; Maldonado vd., 2010).

Enterosin 1071A ve 1071B inhibitör etkisini hedef hücre membranlarında por oluşturmak suretiyle göstermekte ve *C. tyrobutyricum*, *L. salivarius*, *L. innocua* ve *Micrococcus* spp. ve *Enterococcus* spp. gibi Gram pozitif bakterilere karşı etkili olmaktadır (Balla vd., 2000; Salminen vd., 2005).

2.5.8. Enterosin CRL35

Enterosin CRL35 bakteriyosini, geleneksel Arjantin Tafi peynirinden izole edilen ve önce *E. faecium* olarak tanımlanan daha sonra *E. mundtii* CRL35 olarak adlandırılan bir enterokok suşu tarafından üretilmektedir. Grup IIA üyesi olan CRL35 enterosini, *L.* suşlarına karşı antibakteriyel etki gösterdiği gibi Herpes simplex virüsüne (tip I ve tip II) karşı da etkili olabilmektedir (Giori vd., 1983; Wachsman vd., 1999; 2003; Minahk vd., 2000; Masias vd., 2014).

Hedef hücrelerde, hücre membranlarının elektrik potansiyelini bozarak oluşturduğu porlardan iyonların sızmasına yol açarak hücrenin lize olmasına neden olmaktadır (Şekil 2.4) (Minahk vd., 2000).



Şekil 2.4. Enterosin CRL35'in *L. monocytogenes* hücreleri üzerine etkisinin elektron mikroskobu ile görüntüsü
A: Normal *L. monocytogenes* kültürü
B ve C: Enterosin CRL35 ile muamele edilmiş *L. monocytogenes* kültürü (Minahk vd., 2000).

2.5.9. Enterosin Q

Enterosin Q, çoklu bakteriyosin üreticisi olan *E. faecium* L50'nin ürettiği enterosinlerden biridir (Criado vd., 2006). Tek bir peptitten oluşan söz konusu enterosin 7,383 bç büyüklüğe sahip pCIZ2 plazmidi üzerinde kodlanmaktadır (Nes vd., 2007). Moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 3,9 kDa olarak tespit edilen Enterosin Q'nun biralarda bozulmaya neden olan *Lb. brevis* ve *P. damnosus* ile *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. perfringens* ve *C. botulinum*'a karşı oldukça etkili olduğu saptanmıştır (Cintas vd., 1998).

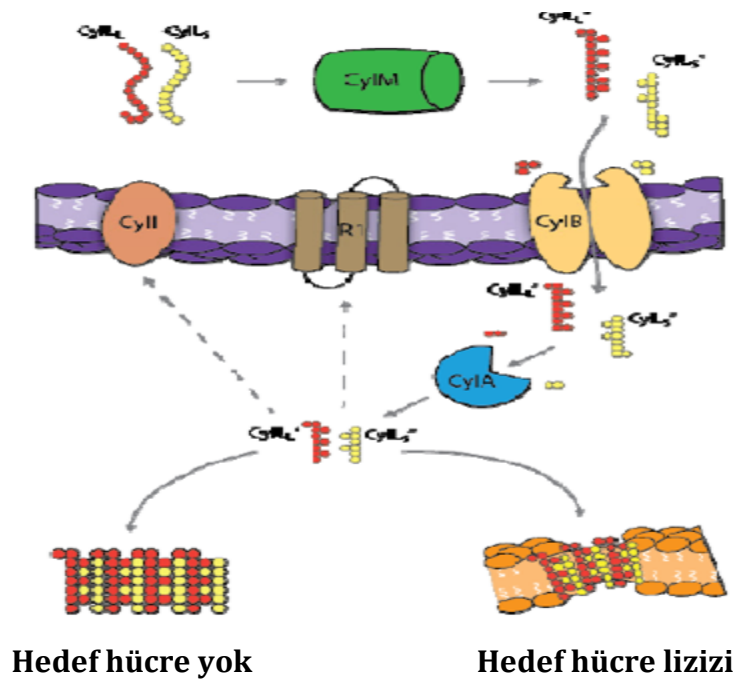
2.5.10. Enterosin 81

Yumuşak bir tür peynir olan Munster peynirlerinden izole edilen *E. faecium* WHE 81 tarafından üretilen enterosin 81, diğer birçok enterosin gibi hedef hücre membranlarında hücre içeriğinin dışarı sızmasına neden olan porlar oluşturmakta ve bakterisidal aktivite göstermektedir. Söz konusu enterosin başta *Enterococcus* spp. ve *L. monocytogenes* olmak üzere *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* ve *C.* türlerine karşı da etkili olmaktadır (Ennahar vd., 1998).

2.5.11. Sitolisin

Sitolisin *E. faecalis* suşları tarafından üretilen ve Grup I Lantibiyotikler içerisinde yer alan tek enterosindir (Gilmore vd., 1994). Sitolisin üretimi *E. faecalis* izolatları arasında değişkenlik gösterebilir (Jett vd., 1994). Sitolisin üretiminden sorumlu genler ya kromozomal olarak kodlanmış 150 kb büyüklükte olan patojenite adası içinde (PAI) ya da konjüгатif, feromona duyarlı plazmidler üzerinde bulunmaktadır (Shankar vd., 2004; Van Tyne vd., 2013).

Sitolisinin inhibitör etkisi hücre membranının bozulması ile olmaktadır (Vlkova vd., 2011). Şekil 2.5'te sitolisin aktivitesi hedef hücre varlığında ve yokluğunda gözlenmiştir. Hedef hücre yokluğunda alt birim etkin ve multimerik kompleksler oluşturur. Hedef hücre varlığında hücre zarında porlar oluşturduğu gözlenmiştir (Van Tyne vd., 2013).



Şekil 2.5. Sitolisin üretimi, salgılanması ve hedef hücre varlığında ve yokluğunda aktivitesi (Van Tyne vd., 2013).

Bazı temel özellikleri diğer lantibiyotiklerle benzerlik gösterse de sitolisin ayrıca benzersiz özelliklere de sahiptir (Van Tyne vd., 2013). Enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler içerisinde hemolitik aktivite gösteren tek bakteriyosindir. Ökaryot ve Gram pozitif bakteriler üzerinde de etkili olan sitolisin virülans faktör olarak kabul edilmekte ve bu nedenle antimikrobiyel ajan olarak kullanılamamaktadır (Jett vd., 1994; Haas ve Gilmore 1999; Poeta vd., 2007).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında Denizli, Isparta, Balıkesir, Bolu, Kayseri, Manisa, Van ve Erzincan illerinden temin edilen; keçi, koyun, inek sütleri kullanılarak geleneksel olarak üretilmiş Beyaz peynir, Tulum peyniri, Kelle peyniri, Otlu peynir olmak üzere toplam 33 adet peynir örneği kullanılmıştır. Buz üzerinde laboratuara getirilen peynir örnekleri 2013 yılı Eylül- Aralık ayları arasında yerel pazarlardan toplanmıştır.

3.2. Mikroorganizmalar

Araştırma kapsamında Türkiye'nin değişik illerinden sağlanan peynir örneklerinden izole edilen 100 adet muhtemel enterokok izolatu kullanılmıştır. Ayrıca enterokok izolatlarının antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi için 23 adet indikatör bakteri kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de antimikrobiyel aktivite denemelerinde kullanılan bakteriler ve gelişme koşulları verilmiştir.

İzole edilen muhtemel enterokok suşları ile tez çalışmasında kullanılan diğer kültürler uygun besiyeri ortamlarında geliştirildikten sonra, % 20 oranında gliserol ilave edilmiş stok tüplerinde ve -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. İndikatör bakteriler ve gelişme sıcaklıkları

İndikatör Bakteri	Besiyeri ve Gelişme Sıcaklığı (°C)
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2003	MRS, 37
<i>Lactococcus lactis</i> 2907	GM17, 30
<i>Lactococcus lactis</i> 2908	GM17, 30
<i>Lactococcus lactis</i> 2909	GM17, 30
<i>Enterococcus faecalis</i> 2602	MRS, 37
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	MRS, 37
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	TSB, 37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	TSB, 37
<i>Staphylococcus cornosus</i> 2709	TSB, 37
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	TSB, 37
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	TSB, 37
<i>Bacillus cereus</i> 2732	TSB, 37
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 2001	GM17, 30
<i>Lactococcus lactis</i> 2910	GM17, 30
<i>Enterococcus faecalis</i> 2708	MRS, 37
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	TSB, 37
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15813	TSB, 37
<i>L. innocua</i> 2813	TSB,37
<i>Staphylococcus aureus</i> 3022	TSB,37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TSB,37
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	TSB,37
<i>Salmonella</i> Typhimurium 3085	TSB,37
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	TSB,37

*MRS: de Man Rogosa Sharpe Broth; GM17: Glukoz M17 Broth (% 5 Glukoz);
TSB+YE: Triptik Soy Broth (% 0,5 maya ekstraktı)

3.3. Enterokok Suşlarının İzolasyonu

Enterokok suşlarının izolasyonu için peynir örneklerinden, aseptik olarak 10 gram tartılmış ve 90 ml fizyolojik tuzlu su (FTS, %0,85 NaCl) içerisinde homojenize edilmiştir (Waring Blender, 8011 ESHGB2WTS3, Torrington, CT). Böylece ilk dilüsyonu elde edilmiş olan süspansiyondan 10^{-5} seviyesine kadar seri dilüsyonları hazırlanmış ve her bir dilüsyondan mikropipet yardımıyla 100 µl alınarak Kanamycin Eskulin Azide (KAAA, Lab M, Ltd., Bury, Lancashire, U.K.) agar ortamına aktarılmış ve drigalski spatülü ile yayma ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24-48 s (s) inkübasyona bırakılan petrilere koyu kahverengi renkte görülen tipik enterokok kolonileri seçilerek MRS (de Man Rogosa Sharpe Agar, Lab M,Ltd., Bury, Lancashire, U.K.) broth ortamında yine 37 °C'de 24 s süre ile geliştirilmiştir. Daha sonra bu bakterilerin % 20 oranında steril gliserol içeren stokları hazırlanarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4. İzolatların Antibakteriyel Aktivite Özelliklerinin Belirlenmesi

Muhtemel enterokok izolatları MRS broth ortamında 37 °C'de 18 s geliştirilmiştir. Aktif kültürden MRS agar ortamına öze yardımıyla sürme ekim yapılmış ve 37 °C'de 18 s inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan koloniler steril kürdan aracılığıyla MRS agar ortamına nokta ekim yapılmış ve 37 °C'de 18 s inkübe edilmiştir. MRS, GM17 (%0,5 glukoz), TSB (Tryptic Soy Broth, Lab M, Ltd., Bury, Lancashire, U.K.), TSB+ME (%0,5 maya ekstraktı) ortamlarında geliştirilen indikatör bakterilerden 100 µl alınarak %0,7 agar içeren 5 ml GM17 (% 0,5 glukoz ilave edilmiş M17) (Merck, Darmstadt, Germany), TSB, TSB+ME ortamlarına inoküle edilmiştir. İnkübasyon sonrasında yumuşak agarlar antibakteriyel aktivesi test edilecek, nokta ekim yapılmış enterokok kolonileri üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Petrilere indikatör bakterilerin gelişmesi için uygun olan inkübasyon sıcaklığında (Çizelge 3.1) 18 s inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda enterokok kolonilerinin indikatör bakterilere karşı verdikleri inhibisyon zonları incelenmiştir (van Belkum vd., 1989). Farklı aktivite spektrumu veren 11 izolat seçilmiş ve çalışmaya bu enterokok izolatları ile devam edilmiştir.

3.5. Çapraz Aktivite Spektrumu

Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının birbirlerine karşı antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesinde van Belkum vd. (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Enterokok izolatları MRS broth ortamında 37 °C'de 18-24 s geliştirilmiş ve MRS agar ortamına sürme ekim yapılmıştır. 37 °C'de 18-24 s inkübe edilen petrilere steril kürdan aracılığıyla MRS agar ortamına nokta ekim yapılmış ve 37 °C'de 18-24 s inkübasyona bırakılmıştır. MRS broth ortamında geliştirilen ve indikatör bakteri gibi nokta ekim yapılan izolatlar üzerine dökülecek olan enterokok suşlarından 100 µl alınarak % 0,7 agar içeren, 5 ml MRS yumuşak agara inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonrasında yumuşak agarlar antibakteriyel aktivesi test edilecek, nokta ekim yapılmış enterokok kolonileri üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Petrilere indikatör bakteri olarak kullanılan enterokok suşlarının gelişmesi için uygun olan inkübasyon sıcaklığında (37°C), 18-24 s inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda birbirlerine karşı gösterdikleri inhibisyon zonları incelenmiştir.

3.6. Proteolitik Enzim Uygulaması

Enterokok izolatları tarafından üretilen antibakteriyel maddelerin protein doğası proteolitik enzim uygulamasıyla test edilmiştir (Ryan vd., 1996). Enterokok izolatları MRS broth ortamında 37 °C'de 18 s geliştirilmiş ve MRS agar ortamına sürme ekim yapılmıştır. 37 °C'de 18 s inkübe edilen petrilere steril kürdan aracılığıyla MRS agar ortamına nokta ekim yapılmış ve 37 °C'de 18 s inkübasyona bırakılmıştır. İnokülasyon süresi sonunda gelişen kolonilerin yaklaşık 0,5 cm uzağına 20 µl Proteinaz-K (30 µg/mL, Sigma-Aldrich, Almanya) enzimi damlatılmış ve 37 °C'de 45 dakika tutulmuştur. Süre sonunda üst tabaka olarak 100 µl indikatör bakteri ilave edilmiş yumuşak agar dökülmüştür. İndikatör bakteri olarak *S. Tyhphimurium* 3085 kullanılmıştır. Petrilere indikatör bakteri olan *S. Tyhphimurium* 3085'un gelişme sıcaklığı olan 37 °C'de 18 s süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnokülasyon süresi sonunda zon şekilleri incelenmiştir.

3.7. İzolatların Fenotipik Tanısı

3.7.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi

Seçilen kolonilerin mikroskopik morfolojileri, Gram boyama yöntemi ile hazırlanan preparatların 1000X büyütme ile ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda belirlenmiştir. Katalaz testi için KAA agar ortamında geliştirilen bakteri kolonileri lam üzerine aktarılmış % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisinden 1 damla ilave edilerek gaz çıkışı olup olmadığı incelenmiştir.

3.7.2. MRS broth ortamında gelişme

İzolatlar MRS broth ortamında 37 °C'de 18 s geliştirildikten sonra % 6,5 NaCl ilave edilerek ve pH'sı 9,6'ya yükseltilecek şekilde hazırlanan iki ayrı MRS broth ortamına inoküle edilmiş ve 37 °C'de 18 s inkübasyona bırakılmıştır. Bu testlere ek olarak izolatların MRS broth ortamında 10 °C ve 45 °C'de gelişme özellikleri de incelenmiştir (Manero ve Blanch, 1999).

3.8. Bakteriyosin Üreticisi Enterokok İzolatının Genotipik Tanısı

3.8.1. Genomik DNA izolasyonu

Enterokok suşları 37 °C'de 18 s süre ile geliştirilmiş ve bu aktif kültürlerden steril Eppendorf tüplerine 500 µl aktarılmıştır. Hücrelerin çöktürülmesi için tüpler 13000 devirde 5 dakika santrifüje (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) tabi tutulmuştur. Üst faz dökülmüş ve kalan hücre çökeltisi 500 µl Liziz Buffer'da çözdürülmüştür. Tüpler 37 °C'deki su banyosu içerisinde 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda 30 µl % 10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS, Serva, Heidelberg, Almanya) ilave edilip 80 °C'lik su banyosunda (Nüve NB9, Türkiye) 5 dakika ısıtılmasına tabi tutulmuştur. Sonrasında hücre süspansiyonu üzerine 700 µl fenol:kloroform (1:10) (Merck) çözeltisi ilave edilerek 13000 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir Eppendorf tüpüne alınarak üzerine 700 µl 2-propanol (Merck) ilave edilmiş ve tüpler

13000 devirde 5 dakika santrifüje tabi tutulmuştur. Bu kez üst faz dökülerek oluşan hücre çökeltisi yaklaşık 5 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Süre sonunda çökelti 50 µl Tris-EDTA içerisinde çözülmüştür. İzole edilen genomik DNA örnekleri -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Cancilla vd., 1992).

İzole edilen DNA örneklerinin varlığı agaroz jel elektroforez yöntemi ile tespit edilmiştir. Genomik DNA örneklerinin elektroforezi % 0,7 (w/v) agaroz (AppliChem, Darmstadt, Almanya) oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Bu işlem için Thermo OWL EASYCAST B2 (Amerika Birleşik Devletleri) yatay jel sistemi kullanılmıştır. Agaroz 100 mL tris-asetat elektroforez tamponu (50X TAE electrophoresis Buffer, Thermo, Litvanya) içerisinde mikrodalga fırında (Arçelik MD 565 S, Türkiye) çözülmüştür. Genomik DNA örneklerinin aktarılacağı kuyucukları elde etmek için jelin üst ve orta kısmına iki adet jel tarağı yerleştirilmiş ve jelin polimerizasyonu için 30 dk beklenmiştir. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra taraklar jele zarar vermeden ortamdan alınmış ve jelin üstünü kapatacak biçimde elektroforez tankına tris-asetat tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Her genomik DNA örneklerinden 15'er µL alınarak yeni steril Ependorf'a aktarılıp üzerlerine 2'şer µL izleme boyası ilave edilmiştir. Boyanan genomik DNA örnekleri mikropipet yardımı ile jel kuyucuklarına aktarılmıştır. Elektroforez işlemi 85 voltta 1.5-2 s süreyle yapılmıştır. Bu süre sonunda elektrik akımı kesilip ortamdan alınan jel, kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış 0,2 µg/mL etidyum bromit içeren çözeltisinde 30 dk süre ile boyanmıştır. Boyama işlemi sonunda jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışık altında incelenmiştir. Jel fotoğraflarının çekiminde Nikon D5100 dijital fotoğraf makinesi kullanılmıştır.

Liziz Çözeltisi

NaCl	250	mM
EDTA	10	mM
Tris HCl	10	mM
Lizozim	100	mg
Destile su	50	mL

pH 8,0± 0,02

0,45 µm por çaplı şırınga ucu filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir

SDS (%10)

SDS	10	g
Destile su	100	mL

Tris- EDTA

Tris	0,121	g
EDTA	0,037	g
Destile su	100	mL

pH 8,0 ± 0,02

121°C'de 15 dk süre ile otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.8.2. Enterokok izolatlarının 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak reaksiyon karışımı Çizelge 3.2'de verilmiştir. Enterokok izolatlarında 16S rDNA bölgesinin çoğaltılmasında pA (ileri primer) 5`- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3` ve pE (geri primer) 5`- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT- 3` primerleri kullanılmıştır (Edwards vd., 1989). Bakteriyosin üreticisi enterokok izolatlarında 16S rDNA bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması Techne TC300 (Cambridge, İngiltere) termal döngü cihazında yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak reaksiyon karışımı

Madde adı	Hacim
PCR Master Mix (Fermentas)	25 µl
Su	20 µl
İleri primer	1 µl
Geri primer	1 µl
Genomik DNA	3 µl
Toplam	50 µl

PZR tüplerinde hazırlanan karışım cihaza yerleştirilmiş ve 1 döngü 94 °C'de 120 saniye başlangıç denatürasyonu, 30 döngü 94 °C'de 30 saniye/55 °C'de 60 saniye/72 °C'de 90 saniye çoğaltma ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika son uzama aşamalarından oluşan PZR protokolü kullanılmıştır.

3.8.3. Çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerinin elektroforezi

Çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerinin elektroforezi % 1,5 oranında agaroz içeren jellerde Thermo OWL EASYCAST B2 cihazında yapılmıştır. Agaroz, 100 ml Tris-asetat elektroforez tamponu içinde mikrodalga fırında çözülmüştür. Hazırlanan jel ortamının 45 °C'ye kadar soğuması beklenmiş ve yatay elektroforez tankına dökülmüştür. Jel tarağı yerleştirilmiş ve jelin polimerizasyonu için 35-40 dakika beklenmiştir. Daha sonra tarak ortama zarar verilmeden çıkartılmış ve jelin üstünü kaplayacak şekilde elektroforez tankına tampon çözelti (Tris-Asetat) ilave edilmiştir. 10 µl PZR ürünü 2 µl Orange Loading Dye ile karıştırılmış ve bu karışımın tümü jel kuyucuğuna aktarılmıştır. Elektroforez 65 voltta, 1 s süreyle yapılmıştır. Süre sonunda ortamdaki jel, 0,2 µg/ml etidyum bromit içeren tris-asetat tamponunda 30 dakika boyanmıştır. Fragmentin büyüklüğü O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Fermentas #SM1153, Litvanya) kullanılarak hesaplanmıştır. PZR ürünlerinin DNA dizi analizi ABI PRISM 3730XL (Perkin Elmer, ABD) otomatik gen sekans cihazı kullanılarak REFGEN Gen Araştırma ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. (Ankara, Türkiye)'nde yaptırılmıştır. 16S rDNA dizi benzerliği National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST programı kullanılarak tespit edilmiştir.

3.9. Enterokok Suşlarında Bakteriyosin Yapısal Genlerinin Belirlenmesi

Enterokok suşlarında bakteriyosin yapısal genlerinin belirlenmesinde enterosin A, enterosin B, enterosin P, enterosin AS-48, enterosin 1071, enterosin L50, enterosin Q, sitolisin, bakteriyosin 31 ve enterosin X için spesifik primerler kullanılmıştır. Enterosin yapısal genlerinin belirlenmesinde hazırlanan reaksiyon karışımı Çizelge 3.3'te verilmiştir. Çizelge 3.4'te ise primer sekansları, PZR koşulları ve PZR ürün büyüklükleri verilmiştir.

Çizelge 3.3. Enterosin yapısal genlerinin belirlenmesinde hazırlanan reaksiyon karışımı

Madde adı	Hacim
PCR Master Mix	25 µl
Su	20 µl
İleri Primer	1 µl
Geri Primer	1 µl
Genomik DNA	3 µl
Toplam	50 µl

Çizelge 3.4. PZR primerleri, PZR koşulları ve PZR ürün büyüklükleri

Enterosin	Primer Sekansı (5'-3')	PZR koşulları	PZR ürün büyüklüğü (bp)	Referans	
Enterosin A (Ent A)	f: AATATTATGGAAATGGAGTGTAT r: GCACTTCCCTGGAATTGCTC	94°C 5 dk	1 döngü	126	Yousif vd., 2005
		94°C 60 sn			
		56°C 60 sn	35 döngü		
		72°C 40 sn			
Enterosin B (Ent B)	f: GAAAATGATCACAGAATGCCTA r: GTTGCATTTAGAGTATACATTTG	94°C 5 dk	1 döngü	162	Yousif vd., 2005
		94°C 60 sn			
		50°C 60 sn	35 döngü		
		72°C 40 sn			
Enterosin P (Ent P)	f: TATGGTAATGGTGTATTGTAAT r: ATGTCCCATACCTGCCAAAC	94°C 5 dk	1 döngü	120	Yousif vd., 2005
		94°C 60 sn			
		50°C 60 sn	35 döngü		
		72°C 40 sn			
Enterosin 1071A-1071B (Ent 1071A-1071B)	f: CCTATTGGGGGAGAGTCGGT r: ATACATTCTTCCACTTATTTTT	94°C 5 dk	1 döngü	343	Belgacem vd. 2010
		94°C 60 sn			
		51°C 60 sn	35 döngü		
		72°C 40 sn			
Enterosin L50A-L50B (Ent L50A-L50B)	f: TGGGAGCAATCGCAAAATTAG r: ATGCCCATCCTTCTCCAAT	94°C 5 dk	1 döngü	98	Belgacem vd. 2010
		94°C 60 sn			
		52°C 60 sn	35 döngü		
		72°C 40 sn			
		72°C 10 dk	1 döngü		

Çizelge 3.4. PZR primerleri, PZR koşulları ve PZR ürün büyüklükleri (Devam)

Enterosin	Primer Sekansı (5'-3')	PZR koşulları	PZR ürün büyüklüğü (bp)	Referans	
Bakteriyosin 31 (Bac 31)	f: TATTACGGAAATGGTTTATATTGT r: TCTAGGAGCCCAAGGGCC	94°C 5 dk	1 döngü	123	Yousif vd., 2005
		94°C 60 sn			
		50°C 60 sn	35 döngü		
		72°C 40 sn			
		72°C 10 dk	1 döngü		
Enterosin AS-48 (Ent AS-48)	f: GAGGAGTTTCATGATTTAAAGA r: CATATTGTTAAATTACCAAGCAA	94°C 5 dk	1 döngü	340	Yousif vd., 2005
		94°C 60 sn			
		50°C 60 sn	35 döngü		
		72°C 40 sn			
		72°C 10 dk	1 döngü		
Enterosin Q (Ent Q)	f:TGAATTTTCTTCTTAAAAATGGTATCGCA r: TTAACAAGAAATTTTTTCCCATGGCAA	94°C 5 dk	1 döngü	105	Belgacem vd. 2010
		94°C 60 sn			
		56°C 60 sn	35 döngü		
		72°C 40 sn			
		72°C 10 dk	1 döngü		
Sitolizin	f: GTGTTGAGGAAATGGAAGCG r: TCTCAGCCTGAACATCTCCAC	94°C 5 dk	1 döngü	324	Brandao vd. 2010
		94°C 60 sn			
		60°C 60 sn	35 döngü		
		72°C 40 sn			
		72°C 10 dk	1 döngü		
Enterosin X	f: GTT TCT GTA AAA GAG ATG AAA C r: CCT CTT AAT CAT TAA CCA TAC	94°C 5 dk	1 döngü	500	Edalatian vd. 2012
		94°C 60 sn			
		50°C 60 sn	35 döngü		
		72°C 40 sn			
		72°C 10 dk	1 döngü		

PZR ürünlerinin elektroforezi, Thermo OWL EASYCAST B2 cihazı kullanılarak % 1,5 oranında hazırlanan agaroz jellerde yapılmıştır. % 1,5 agaroz oranı ile hazırlanan jeller yatay elektroforez tankına yerleştirilmiş ve jel yüzeyini kapatacak şekilde tris-asetat tampon dökülmüştür. İzleme boyası ilave edilen 5 µl PZR ürünü jelde oluşturulan kuyucuklara yüklenmiştir. PZR fragmentlerinin büyüklüğü O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Fermentas #SM1153, Litvanya) kullanılarak hesaplanmıştır. Süre sonunda ortamdan alınan jel 0,2 µg/ml etidyum bromit içeren tampon çözeltide yaklaşık 1 s boyanmış ve UV ışık altında Nikon D5100 dijital fotoğraf makinası ile görüntülenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Enterokok Suşlarının İzolasyonu

Araştırma kapsamında kullanılan peynir örneklerini Denizli, Isparta, Balıkesir, Bolu, Kayseri, Van, Erzincan, Manisa illerinden sağlanan, geleneksel yolla üretilmiş Beyaz peynir, Tulum peyniri, Kelle peyniri ve Otlı peynir oluşturmaktadır. Araştırmada kullanılan Beyaz peynir örneklerinin 14 adedinde, Tulum peyniri örneklerinin 7 adedinde, Kelle peyniri örneklerinin 2 adedinde enterokok suşlarına rastlanmış olup Otlı peynir örneğinden enterokok suşu izole edilememiştir (Çizelge 4.1).

Peynir örneklerinin FTS kullanılarak hazırlanan seri dilüsyonlarından Kanamycin Eskulin Azide Agar (KAA) ortamlarına yayma ekim yapılmış ve 37 °C'de 24-48 s inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda KAA ortamlarında koyu kahverengi renkte görülen 100 adet koloni muhtemel enterokok izolatu olarak seçilmiş ve MRS broth ortamlarına % 20 oranında gliserol ilave edilerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Seçilen izolatlardan Gram pozitif, kok morfolojisine sahip, katalaz negatif, 10 °C ve 45 °C sıcaklıkta, pH 9,6'ya ayarlanmış ve % 6,5 NaCl içeren MRS broth ortamlarında gelişme gösterebilen 100 adet izolat fenotipik olarak *Enterococcus* cinsi üyesi olarak tanımlanmış ve çalışmaya bunlarla devam edilmiştir (Çizelge 4.1).

Ülkemizde farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda Beyaz peynir (Karakuş vd., 1992; Çıtak vd., 2004; İşleroğlu vd., 2008a ; Bilgin, 2008), Tulum peyniri (Bostan vd., 1992; Tuncer, 2009; Özden Tuncer vd., 2013; Yoğurtçu ve Tuncer, 2013), Otlı peynir (İşleyici ve Akyüz, 2009), gibi farklı peynir örneklerinden enterokok suşları izole edilmiştir. Ayrıca bazı Avrupa ülkelerinde geleneksel olarak üretilen çeşitli peynirlerden (Bryndza, Cebreiro, Kefalotyri, Manchego, Picante da Beira Baixa, Semicotto Caprino vb.) enterokok cinsi üyesi bakterilerin sıklıkla izole edildiği bildirilmiştir (Litopoulou-Tzanetaki, 1990; Wessels vd., 1990; Freitas vd., 1995; Cintas vd., 2000; Suzzi vd., 2000; Saavedra

vd., 2003;2004; Ambadoyiannis vd., 2004; Jurkovič vd., 2006; Galvez vd., 2009; Rivas vd., 2012; Favaro vd., 2014).

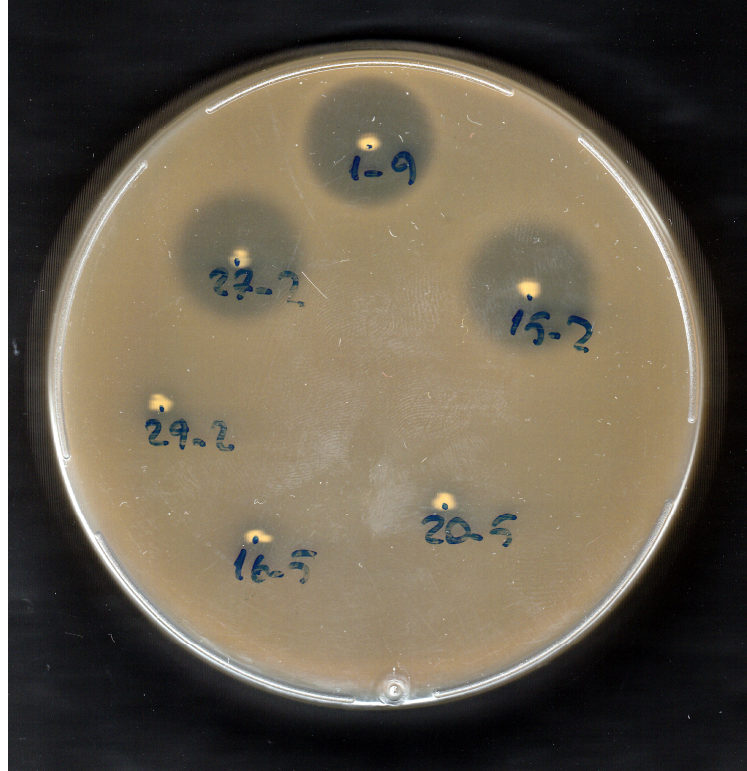
Araştırma kapsamında kullanılan Otlu peynir örneğinden enterokok suşu izole edilememesi örnekte enterokok suşu olmadığını düşündürmektedir. Ülkemizde geleneksel bir peynir olarak üretilen Kelle peyniri ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle Kelle peynirinden enterokok suşu izole edilen tez çalışması bir ilk niteliği taşımaktadır.

Çizelge 4.1. Araştırmada kullanılan peynir örnekleri, örneklerin sağlandığı iller ve örneklerden elde edilen muhtemel enterokok izolatları

Peynir Örneği	İzolasyon materyali	İl	İzolat No
1	Koyun Tulum Peyniri	Denizli	1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10
2	Keçi Beyaz Peynir	Denizli	-
3	Keçi Beyaz Peynir	Denizli	-
4	Otlı Peynir	Van	-
5	Koyun Beyaz Peynir	Denizli	-
6	Koyun Beyaz Peynir	Denizli	-
7	İnek Beyaz Peynir	Denizli	7-1, 7-2
8	Koyun Beyaz Peynir	Denizli	8-1, 8-2, 8-3, 8-4, 8-5, 8-6, 8-7, 8-8, 8-9, 8-10
9	Keçi Beyaz Peynir	Denizli	9-1
10	İnek Beyaz Peynir	Denizli	-
11	İnek Beyaz Peynir	Denizli	11-1, 11-2, 11-3
12	İnek Beyaz Peynir	Denizli	12-1, 12-2, 12-3
13	İnek Beyaz Peynir	Denizli	13-1, 13-2
14	İnek Beyaz Peynir	Denizli	14-1, 14-2, 14-3, 14-4, 14-5, 14-6
15	İnek Beyaz Peynir	Denizli	15-1, 15-2, 15-3
16	İnek Beyaz Peynir	Denizli	16-1, 16-2, 16-3, 16-4, 16-5
17	İnek Beyaz Peynir	Denizli	17-1
18	İnek Beyaz Peynir	Manisa	-
19	İnek Beyaz Peynir	Denizli	19-1, 19-2, 19-3, 19-4, 19-5, 19-6, 19-7
20	Koyun Tulum Peyniri	Isparta	20-1, 20-2, 20-3, 20-4, 20-5
21	İnek Beyaz Peynir	Isparta	21-1, 21-2, 21-3, 21-4
22	İnek Tulum Peyniri	Kayseri	22-1, 22-2, 22-3, 22-4, 22-5
23	İnek Tulum Peyniri	Kayseri	23-1, 23-2, 23-3
24	İnek Tulum Peyniri	Bolu	24-1, 24-2, 24-3, 24-4, 24-5
25	Koyun Tulum Peyniri	Kayseri	-
26	Koyun Tulum Peyniri	Kayseri	-
27	İnek Tulum Peyniri	Bolu	27-1, 27-2, 27-3
28	İnek Tulum Peyniri	Erzincan	28-1, 28-2
29	Kelle Peyniri	Balıkesir	29-1, 29-2, 29-3, 29-4
30	Kelle Peyniri	Balıkesir	30-1, 30-2, 30-3, 30-4
31	İnek Beyaz Peynir	Denizli	31-1, 31-2, 31-3, 31-4, 31-5
32	İnek Beyaz Peynir	Denizli	32-1, 32-2
33	İnek Beyaz Peynir	Denizli	33-1, 33-2, 33-3, 33-4, 33-5

4.2. Enterokok İzolatlarının Antibakteriyel Aktivite Özelliklerinin Belirlenmesi

Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesinde van Belkum vd. (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Enterokok izolatlarının antibakteriyel aktivite spektrumlarının belirlenmesi amacı ile kullanılan indikatör bakteriler ve bu bakterilerin gelişme koşulları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Toplam 23 adet Gram pozitif ve Gram negatif indikatör bakteriye karşı antibakteriyel aktivite özellikleri araştırılan 100 adet enterokok izolatından 70 adedinin çeşitli indikatör bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. Farklı antibakteriyel spektrumu gösteren 11 adet izolat seçilmiş ve çalışmaya bunlarla devam edilmiştir. Şekil 4.1’de bazı izolatların *B. cereus* FM1 2732 suşuna karşı verdiği inhibisyon zonları görülmektedir.



Şekil 4.1. Muhtemel enterokok izolatlarından bazılarının *B. cereus* FM1 suşuna karşı gösterdiği inhibisyon zonları

Çizelge 4.2. İndikatör bakterilere karşı farklı aktivite spektrumu veren enterokok izolatları ve zon çapları

İndikatör Bakteriler	Sıcaklık (°C)	Besiyeri*	Enterokok İzolatları (Ø mm)											
			1-9	12-3	15-2	16-5	20-5	22-2	27-2	27-3	29-1	29-3	31-4	
<i>Lb. plantarum</i> LMG2003	37	MRS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> 2910	30	GM17	7	9	12	16	-	-	13	10	-	10	-	
<i>L.lactis</i> 2909	30	GM17	16	13	14	-	-	-	14	13	-	15	-	
<i>L. lactis</i> 2908	30	GM17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	-	
<i>L. lactis</i> 2907	30	GM17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i> 2602	37	MRS	-	15	-	-	-	-	-	-	-	13	-	
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	37	MRS	8	14	10	6	-	5	8	14	5	8	6	
<i>E. faecalis</i> 2708	37	MRS	-	10	-	-	-	-	-	8	-	-	-	
<i>L. monocytogenes</i> ATCC7644	37	TSB	12	23	24	10	7	9	26	23	6	11	6	
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19115	37	TSB+YE	13	5	10	9	6	7	10	6	4	14	6	
<i>L. innocua</i> 2813	37	TSB	7	9	8	6	4	5	9	9	4	6	4	
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15813	37	TSB	4	13	17	7	3	5	13	13	3	7	4	

*MRS: de Man Rogosa Sharpe Broth; GM17: Glukoz M17 Broth (% 5 glukoz); TSB+YE: Triptik Soy Broth (% 0.5 maya ekstraktı)

Çizelge 4.2. İndikatör bakterilere karşı farklı aktivite spektrumu veren enterokok izolatları ve zon çapları (Devam)

İndikatör Bakteriler	Sıcaklık (°C)	Besiyeri*	Enterokok İzolatları (Ø mm)										
			1-9	12-3	15-2	16-5	20-5	22-2	27-2	27-3	29-1	29-3	31-4
<i>S. aureus</i> ATCC25923	37	TSB+YE	7	7	10	9	6	7	9	7	6	8	8
<i>S. aureus</i> ATCC29213	37	TSB+YE	11	13	10	15	12	11	10	12	10	12	14
<i>S. aureus</i> FRI3022	37	TSB+YE	7	6	6	5	4	6	7	6	5	6	4
<i>S. carnosus</i> MC1, B 2709	37	TSB+YE	8	5	5	6	5	6	7	6	5	15	6
<i>S. entereditis</i> ATCC13076	37	TSB	7	7	8	7	8	5	16	6	5	7	5
<i>S. Tyhphimurium</i> ATCC14028	37	TSB	-	8	14	4	-	6	-	8	-	-	5
<i>S. Tyhphimurium</i> 3085	37	TSB+YE	10	15	16	14	14	9	12	13	14	17	8
<i>B. cereus</i> ATCC10876	37	TSB+YE	6	7	5	7	6	6	6	7	5	6	6
<i>B. cereus</i> FM1 2732	37	TSB+YE	17	5	16	-	-	-	16	-	-	18	-
<i>P. pentosaceus</i> 2001	30	GM17	19	15	16	-	-	-	17	14	5	18	-
<i>E.coli</i> ETEC 3083	37	TSB+YE	5	6	6	4	-	-	6	7	-	7	-

*MRS: de Man Rogosa Sharpe Broth; GM17: Glukoz M17 Broth (% 5 glukoz); TSB+YE: Triptik Soy Broth (% 0.5 maya ekstraktı)

1-9 izolatının denemelerde kullanılan indikatör bakterilerden 17 adedine karşı; 12-3 izolatının 20 adedine karşı; 15-2 izolatının 15 adedine karşı; 16-5 izolatının 15 adedine karşı; 20-5 izolatının 11 adedine karşı; 22-2 izolatının 13 adedine karşı; 27-2 izolatının 17 adedine karşı; 27-3 izolatının 19 adedine karşı; 29-1 izolatının 13 adedine karşı; 29-3 izolatının 19 adedine karşı; 31-4 izolatının 13 adedine karşı inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. Enterokok izolatlarından hiçbiri denemelerde kullanılan *Lactobacillus plantarum* LMG2003 ve *Lactococcus lactis* 2907 bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite göstermemiştir (Çizelge 4.2).

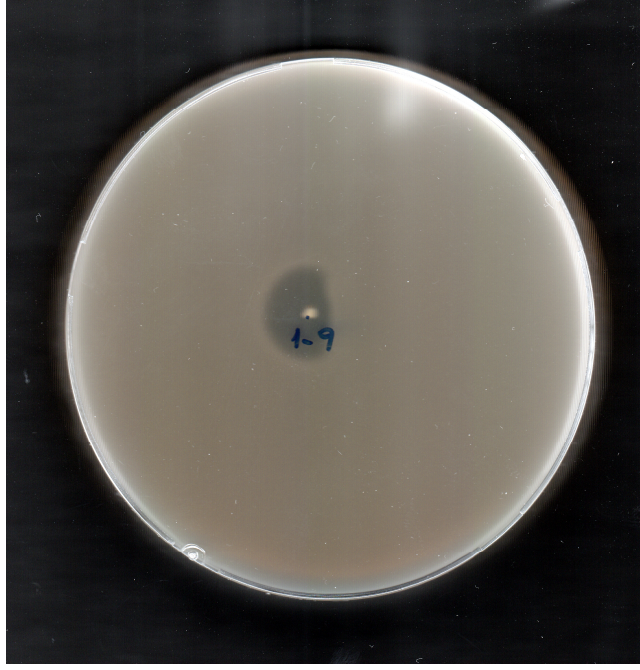
Enterosinler genellikle üretilen enterokok suşlarına yakın akraba türler olmak üzere, Gram pozitif mikroorganizmalara karşı özellikle de *L. spp.*, *Bacillus spp.*, *C. spp.*, *Staphylococcus spp.* üzerinde etkili olabilmektedir (Jeevaratnam vd., 2003; Parada vd., 2007; Izquierdo vd., 2008; Deshmukh ve Thorat, 2013). Tez çalışmasından elde edilen verilere göre *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları kendi türlerine yakın akraba türlerin yanında *L.* ve *Staphylococcus* türlerine karşı da inhibisyon zonu vermişlerdir. Tuncer (2009) tulum peynirinden izole ettiği *E. faecium*, *E. faecalis*, ve *E. durans* suşlarının *L.* ve *Staphylococcus* suşlarına karşı antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Farklı ülkelerde geleneksel olarak üretilmiş çeşitli peynirlerden izole edilen enterokok suşlarının tez çalışmasına benzer olarak özellikle *L.* ve *Staphylococcus* türlerine karşı inhibisyon aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Galvez vd., 2009; Edalatian vd., 2012; Rivas vd., 2012). Farklı bir çalışmada ise mozarella peynirinden izole edilmiş olan *E. faecium* suşunun antimikrobiyel aktivite denemelerinde tez çalışmasından farklı olarak *Lb. sakei* ATCC15521 ile *L. monocytogenes* ATCC19115 suşuna karşı inhibisyon aktivitesi gösterdiği ancak *S. aureus* ATCC29213 suşunu etkilemediği tespit edilmiştir (Tulini vd., 2011).

Diğer taraftan tez çalışması kapsamında izole edilen söz konusu enterosin üreticisi suşlardan 6 adedi *S. Typhimurium* ATCC 14028'e karşı; 5 adedi *S. Typhimurium* 3085'e karşı; 7 adedi de *E. coli* ETEC 3083 suşuna karşı antimikrobiyel aktivite göstermiştir. Garcia-Cano vd. (2014), yapılan tez

çalışmasından elde edilen bulgulara benzer olarak, Cotija peynirinden izole ettikleri 1 adet *E. faecium* ve 1 adet *E. faecalis* suşunun *L. monocytogenes* ve *S. aureus* suşları ile *S. enterica*, *S. Typhimurium* ve *E. coli* suşlarına karşı da inhibisyon aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir.

4.3. Proteolitik Enzim Uygulaması

Çeşitli indikatör bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilen 1-9, 12-3, 15-2, 16-5, 20-5, 22-2, 27-2, 27-3, 29-1, 29-2, 29-3, 31-4 izolatları tarafından üretilen antibakteriyel maddelerin protein yapısında olup olmadığı proteolitik enzim uygulaması sonucu tespit edilmiştir. Proteolitik enzim uygulamasında 12-3, 15-2, 27-2, 27-3 suşları için *L. monocytogenes* ATCC7644; 16-5, 20-5, 22-2, 29-1, 29-2, 29-3, 31-4 suşları için *S. Typhimurium* 3085; 1-9 suşu için *P. pentosaceus* 2001 suşları indikatör bakteri olarak kullanılmıştır. Ryan vd., (1996) tarafından önerilen yöntemle göre steril kürdan aracılığı ile oluşturulan enterokok kolonilerinin yaklaşık 0,5 cm uzağına Proteinaz-K enzimi damlatılmış ve 37 °C'de 45 dk süre ile bekletilmiştir. Süre sonunda 18 s süre ile geliştirilen indikatör bakterilerden 100 µl alınıp yumuşak agar ortamına aktarılmış ve agarın donmasına müsaade edilmeden kolonilerin üzerine dökülmüştür. İndikatör bakterilerin optimum gelişme sıcaklığında 18 s süre ile inkübasyona bırakılan petrilere koloni çevrelerinde oluşan inhibisyon zonlarının yarım ay şeklinde oluşması, üretilen antimikrobiyel maddenin protein doğasında olduğunun kanıtı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.2). Proteolitik enzim uygulaması sonucu, tüm izolatlar tarafından üretilen antibakteriyel maddenin protein yapısında olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.2. 1-9 nolu enterokok izolatının Proteinaz- K enzim uygulaması sonucu verdiği yarım ay görünümlü inhibisyon zonu

Bakteriyosinlerin tümünde antibakteriyel etkinlik ana protein yapıdan kaynaklanmaktadır. Enterokok bakteriyosinleri de diğer LAB tarafından üretilen bakteriyosinler gibi proteolitik enzim uygulamaları (proteinaz-K, pepsin, tripsin ve α -kemotripsin gibi) ile antimikrobiyel aktivitelerinin tamamını ya da bir kısmını kaybetmektedir (Park vd., 2003; Tuncer, 2009; Tuncer ve Özden, 2010; Rajaram vd., 2010; Koral ve Tuncer, 2014). Tüm izolatlar tarafından üretilen antibakteriyel maddelerin proteolitik bir enzim olan proteinaz-K'dan etkilenmesi bu izolatlar tarafından üretilen inhibitör maddelerin bakteriyosin olduğunun güçlü bir kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

4.4. Çapraz Aktivite Spektrumu

Peynir örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının birbirlerine karşı antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesinde van Belkum vd. (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Buna göre 1-9 suşu 8 adet (12-3, 15-2, 16-5, 22-2, 27-2, 27-3, 29-3, 31-4); 12-3 suşu 6 adet (16-5, 20-5, 22-2, 29-1, 29-3, 31-4); 15- 2 suşu 4 adet (16-5, 22-2, 29-1, 31-4); 16-5 suşu 2 adet (29-1, 31-4); 22-2

suşu 2 adet (20-5, 29-1); 27-2 suşu 5 adet (16-5, 20-5, 22-2, 29-1, 31-4); 27-3 suşu 5 adet (16-5, 20-5, 22-2, 29-1, 31-4); 29-3 suşu 7 adet (12-3, 15-2, 16-5, 20-5, 22-2, 29-1, 31-4) enterokok suşuna karşı inhibitör etki göstermiştir. Ancak 20-5, 29-1, 31-4 suşları hiçbir bakteriye karşı inhibitör etki göstermemiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Çapraz aktivite spektrumu

Test Edilen Üretici Suşlar	İndikatör Bakteriler (Ø mm)										
	1-9	12-3	15-2	16-5	20-5	22-2	27-2	27-3	29-1	29-3	31-4
1-9	(-)	13	14	14	-	14	10	19	10	-	9
12-3	-	(-)	-	6	7	8	-	-	8	4	7
15-2	-	-	(-)	6	-	7	-	-	7	-	10
16-5	-	-	-	(-)	-	-	-	-	6	-	7
20-5	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-
22-2	-	-	-	-	6	(-)	-	-	6	-	-
27-2	-	-	-	6	12	8	(-)	-	8	-	13
27-3	-	-	-	8	7	6	-	(-)	6	-	7
29-1	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-
29-3	-	14	14	14	9	14	-	-	11	(-)	7
31-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)

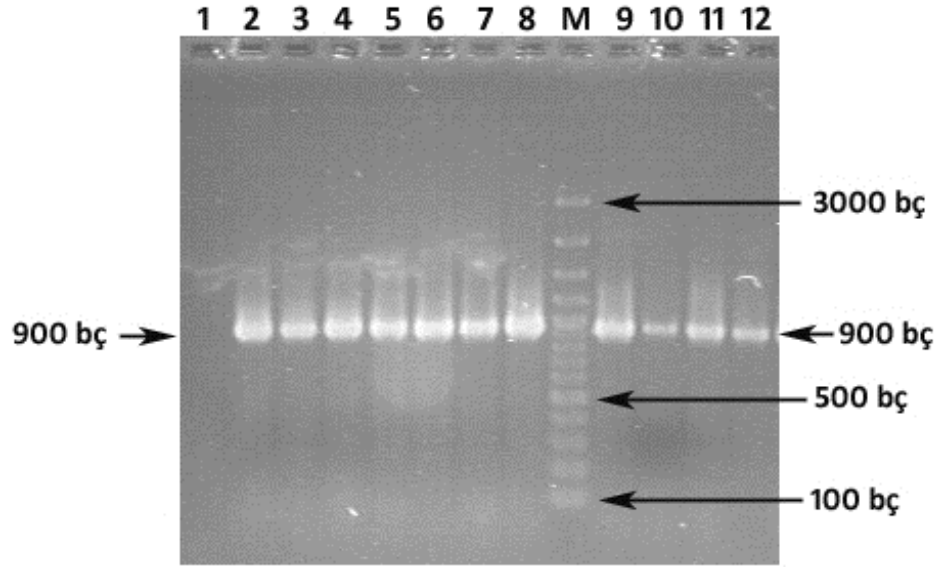
Bakteriyosin üreticisi bütün suşlar kendi ürettikleri bakteriyosine karşı direnç sağlayan bağışıklık proteinleri sentezleme yeteneğine sahiptir. Söz konusu dirençlilik proteinlerini kodlayan genler genellikle bakteriyosin üreticisi suşlarda bakteriyosin üretiminden sorumlu genler ile aynı gen kümesinde yer almaktadır (Abee, 1995; Siegers ve Entian, 1995; Bierbaum ve Sahl, 2009; Heng vd.,2007; Nissen-Meyer vd., 2009; van Belkum vd., 2011). Tez çalışması kapsamında yapılan çapraz aktivite spektrumu testi beklenildiği gibi her bir enterosin üreticisi suşun kendi bakteriyosinine karşı dirençli olduğunu göstermiştir.

4.5. Bakteriyosin Üreticisi Enterokok İzolatlarının Tanısı

Bakteriyosin üreticisi enterokok suşlarının genetik tanısında, 16S rDNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyonu için enterokok suşları MRS broth ortamında 37 °C'de 18-24 s geliştirilmiş ve aktif kültürlerden genomik DNA örnekleri Cancilla vd. (1992) tarafından önerilen yöntemle göre izole edilmiştir.

Bakteriyosin üreticisi enterokok suşlarında 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması genel bakteriyel primerler kullanılarak termal döngü cihazında yapılmıştır. Çoğaltılan PZR fragmentinin elektroforezi % 1 agaroz oranı ile hazırlanan jelde yapılmış ve büyüklüğü 900 bp olarak bulunmuştur (Şekil 4.3).

İzolatların PZR ile çoğaltılan 16S rDNA bölgelerinin dizi analizleri BLAST programı kullanılarak gen bankasındaki veriler ile karşılaştırılmıştır. İzolatların farklı *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları ile % 97 ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Tezin bundan sonraki aşamalarında izolatlar MBE koduyla ifade edilmiştir. (Çizelge 4.4).



Şekil 4.3. PZR ile çoğaltılan enterokok izolatlarının 16S rDNA bölgeleri

1	Negatif Kontrol	: -
2	1-9	: 900 bç
3	12-3	: 900 bç
4	15-2	: 900 bç
5	16-5	: 900 bç
6	20-5	: 900 bç
7	22-2	: 900 bç
8	27-2	: 900 bç
M	O'GeneRuler DNA Marker (Fermentas)	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç
9	27-3	: 900 bç
10	29-1	: 900 bç
11	29-3	: 900 bç
12	31-4	: 900 bç

Çizelge 4.4. İzolatların 16S rDNA PZR fragmentlerinin dizi analizi sonucu saptanan genotipik tanısı

İzolat No	Sonuçlar	% Benzerlik
MBE 1-9	<i>E. faecalis</i>	98
MBE 12-3	<i>E. faecium</i>	98
MBE 15-2	<i>E. faecium</i>	98
MBE 16-5	<i>E. faecium</i>	99
MBE 20-5	<i>E. faecalis</i>	99
MBE 22-2	<i>E. faecium</i>	98
MBE 27-2	<i>E. faecium</i>	98
MBE 27-3	<i>E. faecium</i>	98
MBE 29-1	<i>E. faecalis</i>	98
MBE 29-3	<i>E. faecalis</i>	98
MBE 31-4	<i>E. faecalis</i>	97

Enterokoklar yüksek tuz ve asit toleransları sayesinde çeşitli gıda sistemlerine kolaylıkla adapte olmaktadır. Söz konusu bakterilerin bazı Avrupa ve Akdeniz peynirlerinde ürüne has aroma oluşumundan sorumlu olduğu bildirilmektedir. *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans* türleri geleneksel peynirlerden en sık izole edilen enterokok türleridir (Giraffa 2002; 2003; Martin-Platero vd., 2009; Yoğurtçu ve Tuncer, 2013; Furlaneto-Maia vd., 2014).

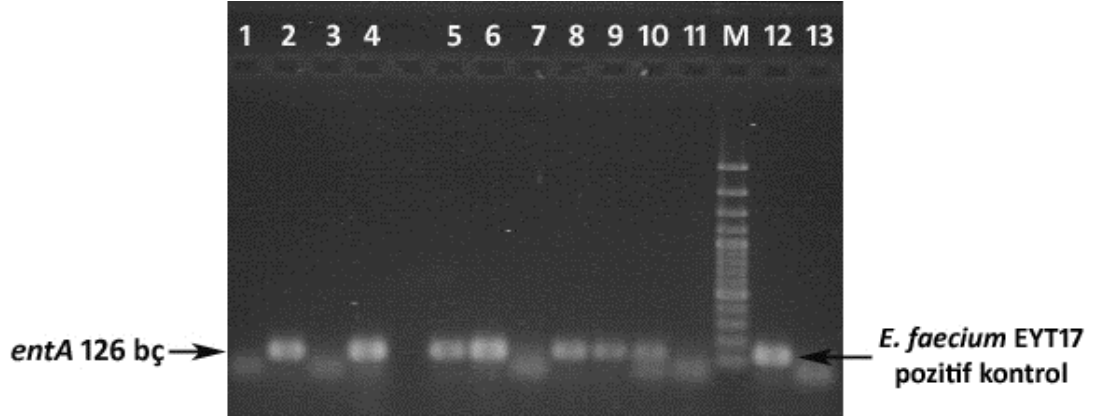
Tez çalışması kapsamında izole edilen 100 adet enterokok izolatının 11 adedi bakteriyosin üreticisi olarak belirlenmiş ve bu 11 adet suşun 6 adedi *E. faecium* kalan 5 adedi ise *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Peynirlerden izole edilen enterokok türlerinin çeşitlilik göstermesinin sebebi farklı ekolojik nişlerden gelmeleri olarak gösterilmektedir (Rivas vd., 2012). Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda tez çalışmasında elde edilen bulgular ile benzer olarak geleneksel Türk peynirlerinden en çok izole edilen enterokok türlerinin *E. faecium* ve *E. faecalis* olduğu bildirilmiştir (Tuncer 2009; Yoğurtçu ve Tuncer, 2013).

4.6. Enterokok Suşlarının Ürettiği Bakteriyosinlerin Tanısı

Bilinen bakteriyosin primerleri kullanılarak yürütülen PZR uygulamaları sonucunda *E. faecalis* MBE29-1 ve *E. faecalis* MBE29-3 suşları sadece *entX* yapısal genine sahip iken; *E. faecium* MBE16-5 ve *E. faecalis* MBE31-4 suşları *entA* ve *entX* yapısal genlerine; *E. faecium* MBE15-2 ve *E. faecium* MBE27-3 suşları *entA*, *entB* ve *entX* yapısal genlerine; *E. faecium* MBE12-3 suşu *entA* ve *entB* yapısal genlerine; *E. faecium* MBE22-2 suşu *entA*, *entP*, ve *entX* yapısal genlerine sahip bulunmuştur. *E. faecium* MBE27-2 suşu ise 4 adet yapısal enterosin geni (*entA*, *entB*, *entP* ve *entX*) içeren tek üretici suş olarak tanımlanmıştır. *E. faecalis* MBE1-9 ve *E. faecalis* MBE20-5 suşları tarafından üretilen enterosinler ise tez kapsamında kullandığımız primerler ile PZR ürünü vermemiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). *E. faecium* EYT17 suşu *entA*, *entB* ve *entP* yapısal genlerinin tespitinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Özden-Tuncer vd., 2013).

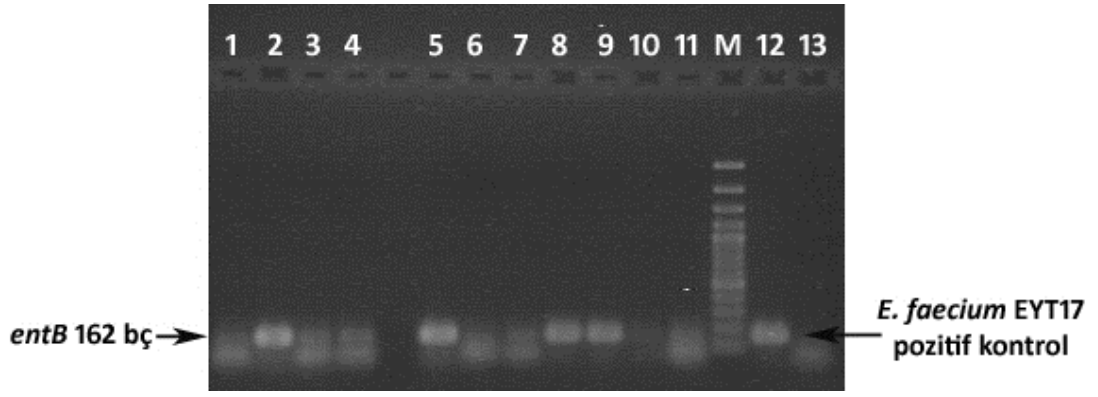
Çizelge 4.5. Enterokok suşlarında tespit edilen enterosin yapısal genleri

Suş No	İzolasyon Kaynağı	Enterosin Yapısal Genleri									
		<i>entA</i>	<i>entB</i>	<i>entP</i>	<i>ent1071</i>	<i>ent L50A/B</i>	<i>bac31</i>	<i>entAS-48</i>	<i>entQ</i>	<i>entX</i>	<i>cylL_{L/S}</i>
<i>E. faecalis</i> MBE1-9	Tulum peyniri (Koyun-Denizli)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> MBE12-3	Beyaz peynir (İnek-Denizli)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> MBE15-2	Beyaz peynir (Keçi-Denizli)	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecium</i> MBE16-5	Beyaz peynir (İnek-Denizli)	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> MBE20-5	Tulum peyniri (Koyun-Denizli)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> MBE22-2	Tulum peyniri (Koyun-Kayseri)	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecium</i> MBE27-2	Tulum peyniri (Koyun-Bolu)	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecium</i> MBE27-3	Tulum peyniri (Koyun-Bolu)	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> MBE29-1	Kelle peyniri (Koyun-İnek-Balıkesir)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> MBE29-3	Kelle peyniri (Koyun-İnek-Balıkesir)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> MBE31-4	Beyaz peynir (İnek-Denizli)	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-



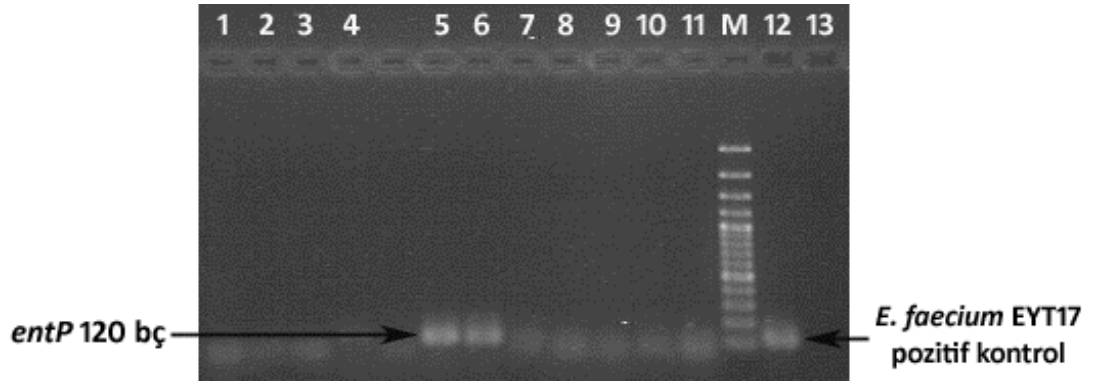
Şekil 4.4. Enterokok suşlarında *entA* yapısal genine ait PZR görüntüsü

1	<i>E. faecalis</i> MBE1-9		: -
2	<i>E. faecium</i> MBE15-2		: 126 bç
3	<i>E. faecalis</i> MBE20-5		: -
4	<i>E. faecium</i> MBE16-5		: 126 bç
6	<i>E. faecium</i> MBE27-2		: 126 bç
7	<i>E. faecium</i> MBE22-2		: 126 bç
8	<i>E. faecalis</i> MBE29-1		: -
9	<i>E. faecium</i> MBE27-3		: 126 bç
10	<i>E. faecium</i> MBE12-3		: 126 bç
11	<i>E. faecalis</i> MBE31-4		: 126 bç
12	<i>E. faecalis</i> MBE29-3		: -
M	100 bp DNA Marker (Fermentas)		: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç
13	<i>E. faecium</i> EYT17 (pozitif kontrol)		: 126 bç
14	Negatif kontrol (su)		: -



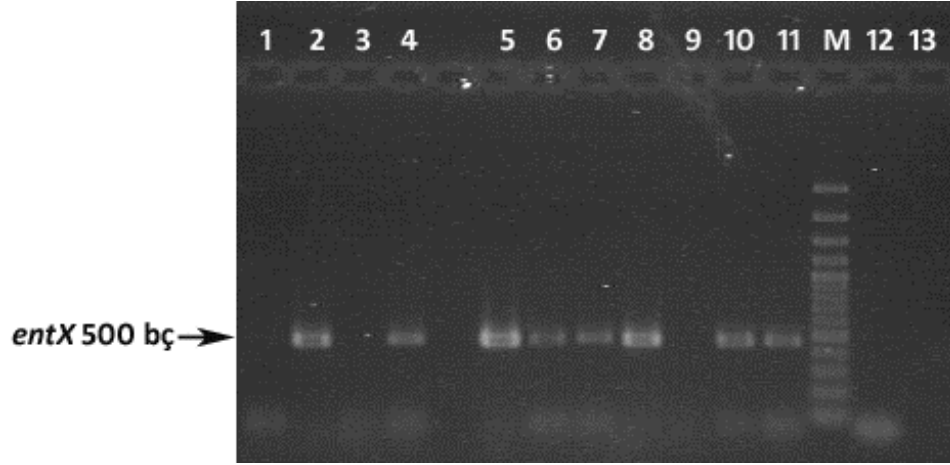
Şekil 4.5. Enterokok suslarında *entB* yapısal genine ait PZR görüntüsü

1	<i>E. faecalis</i> MBE1-9		: -
2	<i>E. faecium</i> MBE15-2		: 162 bç
3	<i>E. faecalis</i> MBE20-5		: -
4	<i>E. faecium</i> MBE16-5		: -
6	<i>E. faecium</i> MBE27-2		: 162 bç
7	<i>E. faecium</i> MBE22-2		: -
8	<i>E. faecalis</i> MBE29-1		: -
9	<i>E. faecium</i> MBE27-3		: 162 bç
10	<i>E. faecium</i> MBE12-3		: 162 bç
11	<i>E. faecalis</i> MBE31-4		: -
12	<i>E. faecalis</i> MBE29-3		: -
M	100 bp DNA Marker	(Fermentas)	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç
13	<i>E. faecium</i> EYT17 (pozitif kontrol)		: 162 bç
14	Negatif kontrol (su)		: -



Şekil 4.6. Enterokok suşlarında *entP* yapısal genine ait PZR görüntüsü

1	<i>E. faecalis</i> MBE1-9		: -
2	<i>E. faecium</i> MBE15-2		: -
3	<i>E. faecalis</i> MBE20-5		: -
4	<i>E. faecium</i> MBE16-5		: -
6	<i>E. faecium</i> MBE27-2		: 120 bç
7	<i>E. faecium</i> MBE22-2		: 120 bç
8	<i>E. faecalis</i> MBE29-1		: -
9	<i>E. faecium</i> MBE27-3		: -
10	<i>E. faecium</i> MBE12-3		: -
11	<i>E. faecalis</i> MBE31-4		: -
12	<i>E. faecalis</i> MBE29-3		: -
M	100 bp DNA Marker	(Fermentas)	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç
13	<i>E. faecium</i> EYT17	(pozitif kontrol)	: 120 bç
14	Negatif kontrol (su)		: -



Şekil 4.7. Enterokok suşlarında *entX* yapısal genine ait PZR görüntüsü

1	<i>E. faecalis</i> MBE1-9	: -
2	<i>E. faecium</i> MBE15-2	: 500 bç
3	<i>E. faecalis</i> MBE20-5	: -
4	<i>E. faecium</i> MBE16-5	: 500 bç
6	<i>E. faecium</i> MBE27-2	: 500 bç
7	<i>E. faecium</i> MBE22-2	: 500 bç
8	<i>E. faecalis</i> MBE29-1	: 500 bç
9	<i>E. faecium</i> MBE27-3	: 500 bç
10	<i>E. faecium</i> MBE12-3	: -
11	<i>E. faecalis</i> MBE31-4	: 500 bç
12	<i>E. faecalis</i> MBE29-3	: 500 bç
M	100 bp DNA (Fermentas)	Marker : 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç
13	Negatif kontrol (su)	: -

Bir enterokok suşunda birden fazla enterosin yapısal geninin bulunması, enterokok suşlarında oldukça sık rastlanan bir durumdur. Özden- Tuncer vd. (2013) Tulum peyniri izolatu olan *E. faecium* EYT39 suşunun *entA* ve *entB* yapısal genlerini içerdiğini diğer taraftan *E. faecium* EYT17 ve EYT31 suşlarının ise *entA* ve *entB* ile birlikte bir de *entP* yapısal genine sahip olduğunu göstermiştir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çeşitli çalışmalarda, yapılan tez çalışmasına benzer olarak, farklı kaynaklardan izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının çoklu enterosin üreticisi olduğu belirlenmiştir (Edalatian vd., 2012; Rehaieem vd., 2014).

Tez çalışması kapsamında koyun sütünden üretilen Tulum peynirlerinden izole edilmiş *E. faecalis* MBE1-9 ve *E. faecalis* MBE20-5 suşlarının, kullanılan hiçbir primer ile PZR ürünü vermemesi, bu suşlar tarafından üretilen enterosinlerin yeni bakteriyosinler olabileceğini düşündürmektedir. Bu enterosinlerin farklı enzim, sıcaklık ve pH uygulamaları ile aktivite değişimlerinin tespiti, saflaştırılarak amino asit sekansının yapılması gibi ileri teknikler ile tanımlanması gerekmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında 33 adet peynir örneğinden KAA ortamlarında tipik koloni morfolojisi veren toplam 100 adet izolat seçilmiştir. Seçilen izolatların tümü Gram pozitif, kok morfolojisine sahip, katalaz negatif, 10 °C ve 45 °C sıcaklıkta, pH 9,6'ya ayarlanmış ve % 6,5 NaCl içeren MRS broth ortamlarında gelişme göstererek fenotipik olarak *Enterococcus* cinsi üyesi olarak tanımlanmış ve çalışmaya bunlarla devam edilmiştir. 100 adet muhtemel enterokok suşunun 23 adet indikatör bakteri ile yürütülen antimikrobiyel aktivite denemelerinde 70 adedinin çeşitli indikatör bakterilere karşı inhibisyon zonu verdiği tespit edilmiştir. 70 adet suş arasından ise farklı aktivite spektrumuna sahip 11 adet enterokok izolatı seçilmiş ve Proteinaz-K enzim uygulaması ile bu suşlar tarafından üretilen antimikrobiyel maddenin bakteriyosin olduğu kanısına varılmıştır. 16S rDNA analizi ile bu 11 adet suşun 6 adedi *E. faecium* kalan 5 adedi ise *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. 11 adet enterokok suşu tarafından üretilen bakteriyosinlerin moleküler düzeyde tanımlanması için bilinen enterosin primerleri kullanılarak PZR denemeleri yapılmıştır. PZR denemeleri sonucunda *E. faecalis* MBE29-1 ve *E. faecalis* MBE29-3 suşları sadece *entX* yapısal genine sahip iken; *E. faecium* MBE16-5 ve *E. faecalis* MBE31-4 suşları *entA* ve *entX* yapısal genlerine; *E. faecium* MBE15-2 ve *E. faecium* MBE27-3 suşları *entA*, *entB* ve *entX* yapısal genlerine; *E. faecium* MBE12-3 suşu *entA* ve *entB* yapısal genlerine; *E. faecium* MBE22-2 suşu *entA*, *entP*, ve *entX* yapısal genlerine sahip bulunmuştur. *E. faecium* MBE27-2 suşu ise 4 adet yapısal enterosin geni (*entA*, *entB*, *entP* ve *entX*) içeren tek üretici suş olarak tanımlanmıştır. Çoklu enterosin üreticisi suşların sinerjetik olarak daha geniş bir aktivite spektrumu gösterdiği düşünülmektedir. Bu nedenle tez çalışmasında belirlenen çoklu enterosin üreticisi suşlar, gıda denemelerinde patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların inhibisyonu için bir kullanım potansiyeli taşımaktadır. Ayrıca çalışma kapsamında çarpıcı bir bulgu da beklenilenden farklı olarak üretilen enterosinlerin Gram negatif bakteriler olan *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Typhimurium* 3085 ve *E. coli* 3085 suşlarına karşı

da inhibisyon aktivitesi göstermesidir. Bu da söz konusu enterosinlerin önemli patojenlere karşı kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Diğer taraftan tez çalışması kapsamında kullanılan enterosin primerleri ile PZR ürünü vermeyen *E. faecalis* MBE1-9 ve *E. faecalis* MBE20-5 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin yeni enterosinler olma ihtimali bulunmaktadır. Bu öngörünün kanıtlanması için bu suşlar tarafından üretilen enterosinlerin ileri teknikler ile (farklı enzim, pH, ve sıcaklık uygulamaları ile aktivitedeki değişimin tespiti, saflaştırılan bakteriyosinin amino asit sekansının yapılması, kütle spektrofotometresi ile moleküler büyüklüğünün saptanması vb.) tanımlanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abee, T., Krockel, L., Hill, C., 1995. Bacteriocins: Modes of Action and Potentials In Food Preservation and Control of Food Poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 28 (2), 169-185.
- Abriouel, H., Valdivia, E., Galvez, A., Maqueda, M., 1998. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 Spheroplasts and Permeabilized Cells to the Bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4623-4626.
- Altuntaş, E., Ayhan, K., 2010. Süt ve Süt Ürünlerinde Bakteriyosinlerin Kullanımı. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 113-120.
- Altuntaş, E.G., Ayhan, K., Okçu, G., Erkanlı, K., Balcı, M.H., Sonakın, Ş.S., 2010. Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Aktiviteleri. *Gıda Dergisi*, 35(3), 197-203.
- Alvarez-Cisneros Y.M., Sáinz Espuñes, T.R., Wachter, C., Fernandez, F.C., Ponce-Alquicira E., 2011. Enterocins: Bacteriocins with Applications In the Food Industry. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 1330-1341.
- Ambadoyiannis, G., Hatzikaramari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., 2004. Probiotic and Technological Properties of Enterococci Isolated From Infants and Cheese. *Food Biotechnology*, 18 (3), 307-325.
- Anandani, J. H., Kahn, Z. H., 2014. Isolation, Partial Purification and Biochemical Characterization of Enterocin Producing Enterococci. *Indian Journal of Applied Research*, 4 (2), 18-20.
- Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Valdivia, E., 2005. Synergistic Effect of Enterocin AS-48 In Combination With Outer Membrane Permeabilizing Treatments Against *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1364–1372.
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M., Garde, S., 2014. Inhibitory Activity of Reuterin, Nisin, Lysozyme and Nitrite Against Vegetative Cells and Spores of Dairy-Related C. Species. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 70–75.
- Aymerich, T., Artigas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M, Hugas, M., 2000. Effect of Sausage Ingredients and Additives On the Production of Enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of In Vitro Production and Anti-L.l Effect In Dry Fermented Sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 686-694.
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M., Nes, I.F., 1996. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin A From

- Enterococcus faecium*, a New Anti-Lactococcal Bacteriocin In the Pediocin Family of Bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1676–1682.
- Badarinath, V., Halami, P.M., 2011. Molecular Characterization of Class IIa, Heat-stable Enterocin Produced by *Enterococcus faecium* MTCC 5153. *Indian Journal of Biotechnology*, 10, 307-315.
- Balla, E., Dicks, L.M.T, Du Toit, M., Van Der Merwe, M.J., 2000. Characterization and Cloning of the Genes Encoding Enterocin 1071A and Enterocin 1071B, Two Antimicrobial Peptides Produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1298-1304.
- Ben Belgacem, Z., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., Manai, M., 2010. Antimicrobial Activity, Safety Aspects, and Some Technological Properties of Bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* From Artisanal Tunisian Fermented Meat. *Food Control*, 21, 462-470.
- Bellei, B., Miguel, M., Mere Del Aguila, E. M., Silva, J. T., Paschoalin V. M. F., 2011. Purification of a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* and Its Effectiveness for Preservation of Fresh-Cut Lettuce. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(5), 119-125.
- Bennik, M.H.J., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L.G.M., 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*, 1373, 47-58.
- Bierbaum, G., Sahl, H.G., 2009. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 2–18.
- Bilgin, H., 2008. Fermente Süt Ürününden İzole Edilen Bakteriyosinolitik Bir Bakterinin Antimikrobiyel Aktivitesi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 53s, Tokat.
- Bostan K., Uğur M., Çiftçioğlu G., 1992. Tulum Peynirinde Laktik Asit Bakterileri ve Küf Florası. *İstanbul Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 17(2), 111-118.
- Boziaris, I.S., Adams, M.R., 1999. Effect of Chelators and Nisin Produced In Situ On Inhibition and Inactivation of Gram Negatives. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 105–113.
- Boziaris, I.S., Adams, M.R., 2000. Transient Sensitivity to Nisin In Coldshocked Gram Negatives. *Letters of Applied Microbiology*, 31, 233–237.

- Boziaris, I.S., Adams, M.R., 2001. Temperature Shock, Injury and Transient Sensitivity to Nisin In Gram Negatives. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 715-724.
- 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, 1772-1775.
- Casaus, F., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Herndndez, P.E., Holo, H., 1997. Enterocin B, a New Bacteriocin From *Enterococcus faecium* TI36 Which Can Act Synergistically with Enterocin A. *Journal of Microbiology*, 143, 2287-2294.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz,, H., Havarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., 2000. Biochemical and Genetic Evidence That *Enterococcus faecium* L50 Produces Enterocins L50A and L50B, The *Sec*-Dependent Enterocin P, and a Novel Bacteriocin Secreted Without an N-Terminal Extension Termed Enterocin Q. *Journal of Bacteriology*, 182(23), 6806-6814.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., 1998. Enterocins L50A and L50B, Two Novel Bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are Related to Staphylococcal Hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180(8), 1988-1994.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernandez, P.E., Nes, I.F., 1997. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, A Novel *Sec*-Dependent Bacteriocin From *Enterococcus faecium* P13 with a Broad Antimicrobial Spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4321-4330.
- 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, 1-20.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R. P., 2005. Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.
- Criado, R., Diep, D.B., Cintas, L.M., 2006. Complete Sequence of the Enterocin Q- Encoding Plasmid pCIZ2 From the Multiple Bacteriocin Producer *Enterococcus faecium* L50 and Genetic Characterization of Enterocin Q Production and Immunity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6653-6666.
- Çıtak, S., Yücel, N., Orhan, S., 2004. Antibiotic Resistance and Incidence of *Enterococcus* Species In Turkish White Cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57 (1), 27-31.

- De Martinis, E. C. P., Alves, V. F., Franco, B. D. G. M., 2002. Fundamentals and Perspectives for the Use of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria In Meat Products. *Food Reviews International*, 18(2-3), 191-208.
- De vuyst, L., Vandamme, E.J., 1991. Microbial Manipulation of Nisin Biosynthesis and Fermentation. *Nisin and Novel Lanthibiotics*. Jung, G., Sahl, H.G.(Ed.), ESCOM Science Publishers, 397-409, Leiden , The Netherland.
- De vuyst, L., Vandamme, E.J., 1994. Influence of the Carbon Source On Nisin Production In *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* Batch Fermentations. *Journal of General Microbiology*, 138, 571-578.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological Tools for Bio-Preservation and Shelf-Life Extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.
- Delves-Broughton, J., 2005. Nisin is a Food Preservative. *Food Australia*, 57 (12), 525-527.
- Dinçer, E., Kivanç, M., Karaca, H., 2009. Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler. *Gıda Dergisi*, Basımda.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M., Prevost, H., 2006. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 564-582.
- Edalatian, M. R., Najafi, M. B. H., Mortazavi, S. A., Alegría, Á., Delgado, S., Bassami, M. R., Mayo, B., 2012. Production of Bacteriocins by *Enterococcus Spp.* Isolated From Traditional, Iranian, Raw Milk Cheeses, and Detection of Their Encoding Genes. *European Food Research and Technology*, 234, 789-796.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Bottger, E.C., 1989. Isolation and Direct Complete Nucleotide Determination of Entire Genes. Characterization of a Gene Coding for 16S Ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17, 7843-7853.
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O., Hasselman, C., 1998. Anti-L Activity of Enterocin 81, a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 Isolated From Cheese. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 85, 521-526.
- Ennahar, S., Deschamps, N., 2000. Anti-L. Effect of Enterocin A, Produced by Cheese Isolated *Enterococcus faecium* EFM01, Relative to Other Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 449-457.

- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A., 2000. Class IIa Bacteriocins: Biosynthesis, Structure and Activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 85-106.
- Erginkaya, Z., Yurdakul, N.E., Karakaş, A., 2007. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*'in Starter ve Probiyotik Kültür Özellikleri. *Gıda Dergisi*, 32(3), 137-142.
- Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X., Franco, B.D.G. de M., Todorov, S. D., 2014. Bacteriocinogenic Potential and Safety Evaluation of Non-Starter *Enterococcus faecium* Strains Isolated From Home Made White Brine Cheese. *Food Microbiology*, 38, 228-239.
- Ferreira, A.E., Canal, N., Morales, D., Fuentesfria, D.B., Corçao, G., 2007. Characterization of Enterocins Produced by *Enterococcus mundtii* Isolated From Human Feces. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(2), 249-258.
- 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 Bacteriocins Not Belonging to the Pediocin Family of Plasmid Encoded Bacteriocin Which Does Not Encode 6t1a, a Novel Anti-L1 of Enterocin I From *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4883-4890.
- Foulquié-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The Role and Application of Enterococci In Food and Health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Worobo, R.W., Quadri, L.E.N., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., Vederas, J.C., Stiles, M.E., 1999. Atypical Genetic Locus Associated with Constitutive Production of Enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2170-2178.
- Franz, C.M.A.P., Grube, A., Holzapfel, W.H., 2002. Biochemical and Genetic Characterization of the Two-Peptide Bacteriocin Enterocin 1071 Produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2550-2554.
- Freitas, A.C., Paris, C., Malcata, F.X., Hogg, T.A., 1995. Microbiological Characterization of Picante da Beira Baixa Cheese. *Journal of Food Protection*, 59, 155-160.
- Furlaneto-Maia, L., Rocha, K.R., Henrique, F.C., Giazzi, A., Furlaneto, M.C., 2014. Antimicrobial Resistance In *Enterococcus spp.* Isolated From Soft Cheese In Southern Brazil. *Advances In Microbiology*, 4, 175-181.

- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Maqueda, M., Valdivia, E., 1989. Purification and Amino Acid Composition of Peptide Antibiotic AS-48 Produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. *Liquefaciens* AS-48. *Antimicrobial Agents Chemother*, 33, 437–441.
- Galvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., 1991. Permeation of Bacterial Cells, Permeation of Cytoplasmic and Artificial Membrane Vesicles, and Channel Formation On Lipid Bilayers by Peptide Antibiotic AS-48. *Journal of Bacteriology*, 173, 886–892.
- Galvez, A.A., Dubois-Dauphin, R., Ghalfi, H., Campos, D., Thonart, P., 2009. Description of Two Enterococcus Strains Isolated From Traditional Peruvian Artisanal-Produced Cheeses with a Bacteriocin-Like Inhibitory Activity. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 13(3), 349-356.
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C. E., Olvera- García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., Quirasco, M., 2014. Antibacterial Activity Produced by *Enterococcus spp.* Isolated From an Artisanal Mexican Dairy Product, Cotija Cheese. *LWT Food Science and Technology*, 59, 26-34.
- Garcia-Garcera, M.J., Elferink, M.G.L., Driessen, A.J.M., Konnings, W.N., 1993. In Vitro Pore-Forming Activity of the Lantibiotic Nisin: Role of Protonmotive-Force and Lipid Composition. *European Journal of Biochemistry*, 212, 417-422.
- Garde, S., Gómez-Torres, N., Hernández, M., Ávil, M., 2014. Susceptibility of *C. perfringens* to Antimicrobials Produced by Lactic Acid Bacteria: Reuterin and Nisin. *Food Control*, 44, 22-25.
- Gillor, O., Nigro, L.M., Riley, M.A., 2005. Genetically Engineered Bacteriocins and Their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 1-9.
- Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R., Clewell, D.B., 1994. Genetic Structure of the *Enterococcus faecalis* Plasmid pad1-encoded Cytolytic Toxin System and Its Relationship to Lantibiotic Determinants. *Journal of Bacteriology*, 176, 7335–7344.
- Giori, G. S., Valdez, G. F., Ruíz Holgado, A. P., Oliver, G., 1983. Microflora of Tafi Cheese: Changes During Manufacture and Maturation. *Journal of Food Protection*, 46, 518-521.
- Giraffa, G., 2002. Enterococci From Foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 163-171.

- Giraffa, G. 2003. Functionality of Enterococci In Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.
- Grande Burgos, M.J., Lucas López, R., López Aguayo, M.C., Pérez Pulido, R., Gálvez A., 2012. Inhibition of Planktonic and Sessile *Salmonella enterica* Cells by Combinations of Enterocin AS-48, Polymyxin B and Biocides. *Food Control*, 30, 214–221.
- Gürsoy, O., Kınık, Ö., 2006. Peynir Teknolojisinde Enterokoklar –II: Koruyucu ve Probiyotik Kültür Olarak Kullanımları. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 43(3), 91-100.
- Haas, W., Gilmore, M.S., 1999. Molecular Nature of a Novel Bacterial Toxin: The Cytolysin of *Enterococcus faecalis*. *Medical Microbiology and Immunology*, 187(4), 183-190.
- Hampikyan, H., Çolak, H., 2007. Nisin ve Gıdalardaki Antimikrobiyel Etkisi. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6(2), 142-147.
- Hyun-Jung Chung, M.S., 2003. Control of Foodborne Pathogens by Bacteriocin-Like Substances From *Lactobacillus spp.* In Combination with High Pressure Processing. The Ohio State University, Doctoral Thesis. 195p, Ohio.
- Izquierdo, E., Bednarczyk, A., Schaeffer, C., Cai, Y., Marchioni, E., Van Dorsselaer, A., Ennahar, S., 2008. Production of Enterocins L50A, L50B, and IT, a New Enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a Strain Isolated from Italian Ryegrass in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(6), 1917- 1923.
- Izquierdo, E., Marchioni, E., Aoude-Werner, D., Hasselmann, C., Ennahar, S., 2009. Smearing of Soft Cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a Multi-Bacteriocin Producer, Against *L. monocytogenes*. *Food Microbiology*, 26, 16–20.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., 2008. Yöresel Peynirde Antimikrobiyel Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu ve Tanısı. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(1), 1-6.(a)
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Demirpençe, Y., Yıldırım, M., 2008. Enterokoklar: Biyokimyasal, Fizyolojik ve Fonksiyonel Özellikleri ile Patojenitesi. *Akademik Gıda Dergisi*, 6(3), 16-26.(b)
- İşleyici, Ö., Akyüz, N., 2009. Van İlinde Satışa Sunulan Otlı Peynirlerde Mikrofloranın ve Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2), 59-64.

- Jeevaratnam, K., Jamuna, M., Bawa, A.S., 2004. Biological Preservation of Foods-Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*, 4,446-454.
- Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S., 1994. Virulence of Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 462-478.
- Joosten, H.M., Rodriguez, E., Nunez, M., 1997. PCR Detection of Sequences Similar to the AS-48 Structural Gene In Bacteriocin-Producing Enterococci. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 40-42.
- Jung, G. 1991. Nisin and Novel Lantibiotics. ESCOM Science Publishers, 1-34 p, Leiden, the Netherlands.
- Jurkovič, D., Križkova', L., Dušinsky', R., Belicova', A., Sojka, M., Krajčovič, J., Ebringer, L., 2006. Identification and Characterization of Enterococci From Bryndza Cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 553-559.
- Karakuş, M., Borçaklı, M., Alperden, I., 1992. Beyaz peynirin olgunlaşması sürecinde laktik asit bakterileri. *Gıda*, 17, 363- 369.
- Kavas, G., Kavas, N., 2012. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Aktiviteleri. *Gıda Dergisi*, 17(9), 91-94.
- Kellner, R., Jung, G., 1989. Sequencing of Peptide Antibiotics Containing Unusual Amino Acids. *Biosystems Euro News*, 7, 2-3.
- Kıran, F., Önlü, H., Osmanağaoğlu, Ö., 2013. Genetiği Modifiye Edilmiş Bakteriyosinler. *Journal of Cell and Moleculer Biology*, 11(1-2), 1-11.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews*, 12, 39-86.
- Klein, G., 2003. Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of Enterococci From Food and the Gastro-intestinal Tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 123-131.
- Koponen, O., 2004. Studies of Producer Self-Protection and Nisin Biosynthesis of *Lactococcus lactis*. University of Helsinki, Institute of Biotechnology, Doctoral Thesis, 67p, Helsinki.
- Koral, G., Tuncer, Y., 2014. Nisin Z-Producing *Lactococcus Lactis* subsp. *lactis* Gyl32 Isolated From Boza. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38 (3), 1044-1053.
- Kurt, Ş., Zorba, Ö., 2005. Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16(1), 77-83.

- Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Von Wright, A., 2012. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. CRC Press, 761p, Boca Raton.
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2010. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria to Combat Undesirable Bacteria In Dairy Products. The Australian Journal of Dairy Technology, 65(3), 143-149.
- Litopoulou-Tzenetaki, E., 1990. Changes In Numbers and Kinds of Lactic Acid Bacteria During Ripening of Kefalotyri Cheese. Journal of Food Science, 55, 111-113.
- Liu, L., O' Conner, P., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2008. Controlling *L. monocytogenes* In Cottage Cheese Through Heterologous Production of Enterocin A by *Lactococcus lactis*. Journal of Applied Microbiology, 104, 1059-1066.
- Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G.N., Kuipers, O.P., 2008. Biosynthesis, Immunity, Regulation, Mode of Action and Engineering of the Model Lantibiotic Nisin. Cellular and Molecular Life Sciences, 65, 455-476.
- Maldonado, A., Jiménez, E., Caballero-Guerrero, B., Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Rodríguez, J.M., 2010. Enterocin C, a Class IIb Bacteriocin Produced by *E. faecalis* C901, a Strain Isolated From Human Colostrum. International Journal of Food Microbiology, 133(1-2), 105-112.
- 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 'Domiaty'. International Journal of Food Microbiology, 153(3), 314-322.
- 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, 153-161.
- Manero, A., Blanch, A.R., 1999. Identification of *Enterococcus spp.* with a Biochemical Key. Applied and Environmental Microbiology, 65, 4425-4430.
- Martin-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., 2009. Characterization and Safety Evaluation of Enterococci Isolated From Spanish Goats' Milk Cheeses. International Journal of Food Microbiology, 132, 24-32.
- Masias, E., Picariello, G., Acuna, L., Chalon, M., Sesma, F., Morero, R., Saavedra, L., Minahk, C., 2014. Co-Expression and Characterization of Enterocin CRL35 and Its Mutant In *Escherichia coli* Rosetta. Peptidomics, 1, 30-42.

- Mendoza, F., Maqueda, M., Galvez, A., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., 1999. Anti-L Activity of Peptide AS-48 and Study of Changes Induced In the Cell Envelope Properties of an AS-48-Adapted Strain of *L. monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 618–625.
- Mertinez-Viedma, P., Abriouel, H., Ben Omar, N., Valdivia, E., Lopez, R.L., Galvez, A., 2008. Inactivation of Exopolysaccharide and 3-Hydroxy propionaldehyde- Producing Lactic Acid Bacteria In Apple Juice and Apple Cider by Enterocin AS-48. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3), 1143-1151.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., 2001. Lantibiotics: Structure, Biosynthesis and Mode of Action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 285-308.
- Minahk, C.J., Farias, M.E., Sesma, F., Morero, R.D., 2000. Effect of Enterocin CRL35 on *L. monocytogenes* cell membrane. *FEMS Microbiology Letters*, 192, 79-83.
- Montalbán-López, M., Spolaore, B., Pinato, O., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., Fontana, A., 2008. Characterization of Linear Forms of the Circular Enterocin AS-48 Obtained by Limited Proteolysis. *FEBS Letters*, 582, 3237–3242.
- Nes, I.F., Tagg, J.R., 1996. Novel Lantibiotics and Their Prepeptides. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69, 89–97.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H., 1996. Biosynthesis of Bacteriocins in Lactic Acid Bacteria. *Anton Leeuw*, 70, 113-128.
- Nes, I.F., Holo, H., 2000. Class II Antimicrobial Peptides From Lactic Acid Bacteria. *Biopolymers*, 55, 50-61.
- Nes, I.F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J., 2002. Unmodified Peptide-Bacteriocins (ClassII) Produced By Lactic Acid Bacteria. In: C.J., Haxell, M.A., McArthur, H.A. I., Wax, R.G. (Ed.), *Peptide Antibiotics; Discovery, Modes of Action, and Applications*. Dutton (81-115), Marcel Dekker Inc., New York.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Holo, H., 2007. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1189-1198.
- Nes, I. F., Yoon, S.S., Diep, D.B., 2007. Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) In Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Science and Biotechnology*, 16, 675–690.

- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H.S., Kristiansen, P.E., 2009. Structure-Function Relationships of the Non-Lanthionine-Containing Peptide (Class II) Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 19–37.
- O’Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C., 2002. Potential of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria for Improvements In Food Safety and Quality. *Biochimie*, 84, 593-604.
- O’Keeffe, T., Hill, C., Ross, R.P., 1999. Characterization and Heterologous Expression of the Genes Encoding Enterocin A Production, Immunity, and Regulation In *Enterococcus faecium* DPC1146. *Journal of Applied Microbiology*, 65(4), 1506–1515.
- Osmanağaoğlu, Ö., 2005. Sensitivity of Sublethally Injured Gram Negative Bacteria to Pediocin P. *Journal of Food Safety* 25, 266–275.
- Özbaş, K., 2014. Gıda Endüstrisinde Bakteriyosinlerin Önemi. *Gıda ve Yem Analiz Dergisi*, 6(21), 28-33.
- 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, 443-449.
- Park, S.H., Itoh, K., Fujisawa, T., 2003. Characteristics and Identification of Enterocins Produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 294–300.
- Poeta, P., Costa, D., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Klibi, N., Rodrigues, J., Torres, C., 2007. Detection of Antimicrobial Activities and Bacteriocin Structural Genes In Faecal Enterococci of Wild Animals. *Microbiological Research*, 162, 257-263.
- Powell, J.E., 2006. Bacteriocins and Bacteriocin Producers Present In Kefir and Kefir Grains. Stellenbosch University, M. Sc. Thesis, 115p, Stellenbosch.
- Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B., Saravanakumar, A., 2010. Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(2), 138-144.
- Rehaiem, A., Ben Belgacem, Z., Edalatian, M. R., Martínez, B., Rodríguez, A., Manafí, M., Guerra, N. P., 2014. Assessment of Potential Probiotic Properties and Multiple Bacteriocin Encoding-Genes of the Technological Performing Strain *Enterococcus faecium* MMRA. *Food Control*, 37, 343-350.

- Reunanen, J., 2007. Lantibiotic Nisin and Its Detection Methods. Viikki Graduate School In Biosciences University of Helsinki, M. Sc. Thesis, 42p, Helsinki.
- Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. Annual Review of Microbiology, 56, 117-137.
- Riley, M. A., Chavan, M. A. (Ed.), 2007. The Diversity of Bacteriocins In Gram Positive Bacteria. Springer, 45-92p, New York.
- Rilla, N., Martí'nez, B., Delgado, T., Rodríguez, A., 2003. Inhibition of *C. tyrobutyricum* in Vidiago Cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a Nisin Z Producer. International Journal of Food Microbiology, 85, 23-33.
- Rivas, F.P., Castro, M.P., Vallejo, M., Marguet, E., Campos, C.A., 2012. Antibacterial Potential of *Enterococcus faecium* Strains Isolated From Ewes' Milk and Cheese. LWT - Food Science and Technology, 46, 428-436.
- Rogers, L. A., 1928. The inhibiting Effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Bacteriology, 16, 321-325.
- Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C., Ross, R.P., 1996. An Application In Cheddar Cheese Manufacture for a Strain of *Lactococcus lactis* Producing a Novel Broad Spectrum Bacteriocin Lacticin 3147. Applied and Environmental Microbiology, 62, 612-619.
- Saavedra, L., Minahk, C., Holgado, A.P.R., 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.
- Saavedra, L., Taranto, M.P., Sesmaa, F., de Valdeza, G. F., 2003. Homemade Traditional Cheeses for the Isolation of Probiotic *Enterococcus faecium* Strains. International Journal of Food Microbiology, 88, 241 - 245.
- Sahl, H-G., Jack, R. W., Bierbaum, G., 1995. Biosynthesis and Biological Activities of Lantibiotics With Unique Post-Translational Modifications. European Journal of Biochemistry, 230, 827-853.
- Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A., 2005. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, 633p, New York.
- Savadogo, A., Ouattara, A.T.C., Bassole, H.N.I., Traore, S.A., 2006. Bacteriocins and Lactic Acid Bacteria- A Minireview. African Journal of Biotechnology, 5(9), 678-683.
- Schleifer, K. H., Kilpper-Bälz, R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* Nom. Rev. As

Enterococcus faecalis Comb. Nov. and *Enterococcus faecium* Comb. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 34, 31–34.

- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D., Fischer, W., 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and Related Streptococci to the Genus Lactococcus Gen. Nov. Systematic and Applied Microbiology, 6, 183–195.
- Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R., 1987. Molecular and Chemotaxonomic Approaches to the Classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci. Systematic and Applied Microbiology, 10, 1–19.
- Schnell, N., Entian, K-D., Götz, F., Hörner, T., Kellner, R., Jung, G., 1988. Prepeptide Sequence of Epidermin, a Ribosomally Synthesized Antibiotic with Four Sulphide-Rings. Nature (London), 333, 276-278.
- Settanni, L., and Corsetti, A., 2008. Application of Bacteriocins In Vegetable Food Biopreservation. International Journal of Food Microbiology, 121, 123–138.
- 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, 1–10.
- Siegers, K., Entian, K.D., 1995. Gene Involved In Immunity to the Lantibiotic Nisin Produced by *Lactococcus lactis* 6F3. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1082-1089.
- Simova, E.D., Beshkova, D.B., Dimitrov, Z.P., 2009. Characterization and Antimicrobial Spectrum of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Bulgarian Dairy Products. Journal of Applied Microbiology, 106, 692–701.
- Sparo, M.D., Corso, A., Galletti, P., Delpesch, G., Ceci, M., Confalonieri, A., Urbizu, L., Sanchez Bruni, S.F., 2012. *Enterococcus faecalis* Cect712: Biopreservation of Crafted Goat Cheese. International Journal of Probiotics and Prebiotics, 7(3-4), 145-152.
- Suzzi, G., Caruso, M., Gadrini, F., Lombardi, A., Vanni, 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, 267-274.
- Tatlı, D., 2009. Geleneksel Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 82s, Adana.

- Thomas, L.V., Wimpenny, J.W., 1996. Investigation of the Effect of Combined Variations in Temperature, pH, and NaCl Concentration On Nisin Inhibition of *L. monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 2006- 2012.
- Todorov, S. D., Franco, B. D., Wiid, I. J., 2014. In Vitro Study of Beneficial Properties and Safety of Lactic Acid Bacteria Isolated From Portuguese Fermented Meat Products. *Beneficial Microbes*, 24, 1–16.
- Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y., 1996. Cloning and Genetic Organization of the Bacteriocin 31 Determinant Encoded On the *Enterococcus faecalis* Pheromone-Responsive Conjugative Plasmid Pyl17. *Journal of Bacteriology*, 178(12), 3585–3593.
- Tulini, F.L., Gomes, B.C., De Martinis, E.C.P., 2009. Partial Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* 130 Isolated From Mozzarella Cheese. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(1), 155-159.
- 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. *Gıda*, 9 (5), 275-282.
- Tuncer, Y. 2009. Some Technological Properties of Phenotypically Identified Enterococci Strains Isolated From Turkish Tulum Cheese. *African Journal of Biotechnology*, 8 (24), 7008-7016.
- Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B., Hill, C. 2002. Lantibiotics Produced by Lactic Acid Bacteria: Structure, Function and Applications. Sizezen, R.J., Kok, J., Abee, T. And Schaafsma, G., Kluwer (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (165-185). Academic Publishers, Dordrecht.
- Udompijitkul, P., Paredes-Sabja, D., Sarker, M.R., 2012. Inhibitory Effects of Nisin Against *C. perfringens* Food Poisoning and Nonfood-Borne Isolates. *Journal of Food Science*, 71, 51-56.
- Van Belkum, B.J., Hayema,, B.J., Geis,A., Kok, J., Venema, G., 1989. Cloning of Two Bacteriocin Genes From a Lactococcal Bacteriocin Plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(5), 1187-1191.

- Van Kraaij, C., De Vos, M.W., Siezen, R.J., Kuipers, O.P., 1999. Lantibiotics: Biosynthesis, Mode of Action and Applications. *Natural Product Reports*, 16, 575-587.
- Van Tyne, D., Martin, M.J., Gilmore, M.S., 2013. Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. *Toxins*, 5, 895-911.
- Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., 1999. Catalogue of Enterococci of the FAIR-E Collection. Published for the EU-project FAIR-CT-3078 by the BCCM/LMG Bacteria Collection, Ghent, Belgium.
- Vlkova, B., Szemes, T., Minarik, G., Tothova, L., Drahovska, H., Turna, J., Celec, P., 2011. Food-Borne Enterococci and Their Resistance to Oxidative Stress. *Journal of Microbiology*, 49(4), 657-662.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., 2009. The Firmicutes. George M. Garrity (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 3* (2nd ed.), Springer, 1450 p, New York.
- 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(4), 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, 17-24.
- 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, 349-352.
- Xiuyuan Hu, Mao, R., Zhang, Y., Teng, D., Wang, X., Xi, D., Huang, J., Wang, J., 2014. Biotechnical Paving of Recombinant Enterocin A as the Candidate of Anti-*L.* Agent. *BMC Microbiology*, 14(220), 1-11.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., and Fillmore, S., 2012. Antimicrobial Activity of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria Isolated From Cheeses and Yogurts. *AMB Express*, 2, 48.
- Yiğit, T., 2009. Süt ve Süt Ürünlerinden Probiyotik Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 160s, Eskişehir.
- Yoğurtçu, N.N., Tuncer, Y., 2013. Antibiotic Susceptibility Patterns 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*, 96, 216-228.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mine AVCI
Doğum Yeri ve Yılı : Çal/DENİZLİ, 1988
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : avci_mine@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Denizli Cumhuriyet Lisesi, 2002-2005
Lisans : Pamukkale Üniversitesi, 2006-2011

Mesleki Deneyim

Mango Gıda Sanayi 2011-2012
Türkiye Lokomotif ve Motor Sanayii A.Ş. 2015-