

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

**SUCUKTAN İZOLE EDİLEN KOAGÜLAZ-NEGATİF *STAPHYLOCOCCUS* VE
MACROCOCCUS CASEOLYTICUS SUŞLARINDA ENTEROTOKSİN
GENLERİNİN BELİRLENMESİ**

Hasan ÇETİN

**Danışman
Doç. Dr. Yasin TUNCER**

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

© 2015 [Hasan ÇETİN]

TEZ ONAYI

Hasan ÇETİN tarafından hazırlanan “Sucuktan İzole Edilen Koagülaz-Negatif *Stapylococcus* ve *Macrooccus caseolyticus* Suşlarında Enterotoksin Genlerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman	Doç. Dr. Yasin TUNCER	
	Süleyman Demirel Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN	
	Süleyman Demirel Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr. Hidayet SAĞLAM	
	Kilis 7 Aralık Üniversitesi	

Enstitü Müdür 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.

Hasan ÇETİN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Sucuk	3
2.1.1. Sucuk üretimi	5
2.1.1.1. Hammadde seçimi ve ön hazırlık.....	5
2.1.1.2. Üretim	5
2.1.1.3. Fermentasyon ve olgunlaştırma	7
2.1.2. Türk sucuğunun kalite özellikleri	7
2.1.3. Sucukta kullanılan katkı maddeleri	9
2.1.3.1. Şeker	9
2.1.3.2. Tuz.....	9
2.1.3.3. Nitrat ve nitrit	9
2.1.3.4. Kuter yardımcı maddeleri	10
2.1.3.4.1. Fosfatlar	10
2.1.3.4.2. Karboksilli asitler ve tuzları	10
2.1.3.5. Stabilizörler	11
2.1.3.5.1. Glukona delta lakton	11
2.1.3.6. Baharatlar	11
2.1.3.7. Starter kültürler	12
2.2. Fermente Sucukların Mikroflorası	12
2.2.1. Laktik asit bakterileri.....	14
2.2.2. Koagülaz-negatif stafilocoklar	15
2.2.3. <i>Macrococcus caseolyticus</i>	19
2.3. Stafilocoklar Tarafından Üretilen Enterotoksinler	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Mikroorganizmalar	25
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu	27
3.2.1.1. Genomik DNA örneklerinin elektroforezi	28
3.2.2. Koagülaz-negatif <i>Staphylococcus</i> ve <i>M. caseolyticus</i> suşlarında enterotoksin genlerinin multipleks-PZR ile araştırılması.....	29
3.2.3. Koagülaz-negatif <i>Staphylococcus</i> ve <i>M. caseolyticus</i> suşlarında enterotoksin genlerinin PZR ile araştırılması.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Genomik DNA İzolasyonu	33

4.2. Koagülaz-Negatif <i>Staphylococcus</i> ve <i>M. caseolyticus</i> Suşlarında	
Enterotoksin Genlerinin PZR ile Araştırılması	34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	55

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SUCUKTAN İZOLE EDİLEN KOAGÜLAZ-NEGATİF *STAPHYLOCOCCUS* VE *MACROCOCCUS CASEOLYTICUS* SUŞLARINDA ENTEROTOKSİN GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Hasan ÇETİN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Yasin TUNCER

Bu çalışmanın amacı starter kültür kullanılmadan üretilen geleneksel fermente Türk sucuklarından izole edilen 51 adet koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve 10 adet *Macrococcus caseolyticus* suşlarında enterotoksin yapısal genlerinin varlığının tespit edilmesidir. Bu amaçla, toplam 61 adet sucuk izolatında 18 adet enterotoksin yapısal geninin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr* ve *tst1*) varlığı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (multipleks-PZR) ile araştırıldı. PZR denemeleri sonucu izolatların hiçbirinin enterotoksin yapısal geni içermediği tespit edildi. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar sucuktan izole edilen koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *Macrococcus caseolyticus* suşlarının enterotoksin üretimi bakımından güvenilir olduklarını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Enterotoksin genleri, Koagülaz-negatif *Staphylococcus*, *Macrococcus caseolyticus*, Multipleks-PZR, Sucuk.

2015, 55 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETECTION OF ENTEROTOXIN GENES IN COAGULASE-NEGATIVE *STAPHYLOCOCCUS* AND *MACROCOCCUS CASEOLYTICUS* STRAINS ISOLATED FROM TURKISH DRY FERMENTED SAUSAGE (SUCUK)

Hasan ÇETİN

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yasin TUNCER

The aim of this study was to detect the presence of enterotoxin structural genes in 51 coagulase-negative *Staphylococcus* and 10 *Macroccus caseolyticus* strains isolated from traditional fermented Turkish sausages produced without using starter culture. For this purpose, the presence of 18 enterotoxin structural genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *she*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr* and *tst1*) were researched by multiplex polymerase chain reaction (multiplex-PCR) in a total of 61 sucuk isolates. The PCR results showed that none of the isolates contain enterotoxin structural gene. The results of this study showed that coagulase-negative *Staphylococcus* and *Macroccus caseolyticus* strains isolated from sucuk were safe in terms of enterotoxin production.

Keywords: Enterotoxin gens, Coagulase-negative *Staphylococcus*, *Macroccus caseolyticus*, Multiplex-PCR, Turkish fermented sausage (Sucuk).

2015, 55 pages

TEŞEKKÜR

Başta bana bu konuda çalışma imkanı veren ve çalışmamın her aşamasında bilgi, yardım ve önerilerini esirgemeyen, bilimsel çalışma disiplini öğrenmemde ve akademik gelişimimde büyük emeği olan değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Yasin TUNCER olmak üzere;

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Banu ÖZDEN TUNCER'e;

Laboratuvar günlerini birlikte geçirdiğim çalışma arkadaşlarım Gıda Mühendisi Betül ASLAN'a, Gıda Mühendisi Gaye Asuman YERLİ'ye ve Gıda Mühendisi Nazife YILDIRIM'a;

Tez konumun belirlenmesine ışık tutan, bakteri suşlarının izolasyonunu yapıp bölümümüz kültür koleksiyonuna kazandıran Gıda Yüksek Mühendisi Burak GENİŞ'e;

Tezimin her aşamasında maddi-manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme;

4148-YL1-14 no'lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Hasan ÇETİN
ISPARTA, 2015

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Fermente et ürünlerinde meydana gelen lipoliz ve oksidasyon reaksiyonları	4
Şekil 2.2. Fermentasyon şekline göre geleneksel ve ısıt işlem uygulanmış Türk sucuğu üretimi	6
Şekil 2.3. Stafilocokların mikroskop altındaki görüntüsü	16
Şekil 4.1. Koagülaz-negatif <i>Staphylococcus</i> ve <i>M. caseolyticus</i> suşlarının genomik DNA örnekleri.....	33
Şekil 4.2. Koagülaz-negatif <i>Staphylococcus</i> ve <i>M. caseolyticus</i> suşlarında takım 2 (<i>seg, seh, sei, selj, selp</i>) primer karışımı kullanılarak yapılan multi-pleks-PZR denemesi.....	35
Şekil 4.3. Multipleks-PZR ile zayıf bant veren bazı koagülaz-negatif suşlarında <i>seg Staphylococcus</i> geninin PZR ile kontrolü.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Geleneksel ve ısıtıl işlem görmüş Türk sucuğunun Türk Gıda Kodeksi'ndeki bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri	7
Çizelge 2.2. Sucuğun mikrobiyolojik sınır değerleri.	8
Çizelge 2.3. Stafilokok tür ve alt türleri	18
Çizelge 2.4. Bazı ülkelerde yaşanmış stafilokok gıda zehirlenmeleri	22
Çizelge 2.5. Bazı stafilokokal enterotoksin genlerinin genetik desteği	24
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan koagülaz-negatif <i>Staphylococcus</i> ve <i>M. caseolyticus</i> suşları ve benzerlik oranları.....	25
Çizelge 3.2. Multipleks-PZR denemelerinde kullanılan PZR karışımı.....	30
Çizelge 3.3. Enterotoksin genlerinin tespitinde kullanılan primer ve ürün Büyüklikleri.....	31
Çizelge 3.4. Tekli-PZR'da kullanılan PZR karışımı	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a _w	Su aktivitesi
BN	Bağıl nem
bp	Base pairs
bç	Baz çifti
C	Sitozin
Da	Dalton ağırlık birimi
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
egc	Enteroksin gen kümesi
G	Guanin
g	Gram
kg	Kilogram
KNS	Koagülaz-negatif stafilokok
kob	Koloni oluşturan birim
KPS	Koagülaz-pozitif stafilokok
LAB	Laktik asit bakterileri
m	Metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mol	Avagadro sayısı (6,02x10 ²³) kadar atom ya da molekül içeren madde
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Asitlik veya bazlık derecesi ölçü birimi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ppm	Milyonda bir birim (1/1000000)
rpm	Dakikada dönüş sayısı
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SE	Stafilokokal enterotoksin
SFP	Stafilokokal gıda zehirlenmesi
sn	Saniye
Tris	Hidroksimetil aminometan
TSST-1	Toksik şok sendromu toksini
UV	Ultra viyole
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Celcius sıcaklık birimi

1. GİRİŞ

Mikrobiyal kaynaklı gıda zehirlenmeleri arasında stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmeleri önemli bir yer tutmaktadır. Dünya genelinde her yıl birçok insan stafilokokal gıda zehirlenmelerinden dolayı hastanelere başvurmaktadır. Sağlıklı insanların % 40'ı burun-ağız boşluğunda stafilokok taşımaktadır. Burun içinde bulunan suşlar eller vasıtasıyla yüze ve deriye kontamine olabilmekte ve çeşitli gıdalara taşınabilmektedir. Stafilokoklar, klinik açıdan koagülaz-pozitif stafilokoklar (KPS) ve koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS) olarak ikiye ayrılırlar. KNS'lerin sebep olduğu gıda zehirlenmelerinin kaynağının saptanmasının zor olmasına rağmen birincil kaynak, gıda işleyicileri olarak kabul edilmektedir.

Tüm gıdaların üretim ve muhafazasında olduğu gibi fermente gıdaların üretiminde de gerekli hijyenik koşullar sağlanmalıdır. Aksi takdirde gıda zehirlenmelerinin meydana gelmesi hatta salgın haline dönüşmesi mümkün olabilmektedir. Dünya çapında gıda zehirlenmelerinin büyük bir kısmına stafilokoklar neden olmaktadır. Stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmelerine *Staphylococcus* cinsi bakterilerin üretmiş olduğu enterotoksinler neden olmaktadır. Stafilokokal enterotoksinler (SEs) antijenik özellikleri dikkate alınarak SEA, SEB, SEC, SED ve SEE olmak üzere beş serolojik tipe ayrılmıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar ile SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER ve SEU olmak üzere yeni enterotoksin tipleri de bildirilmiştir. Stafilokokal intoksikasyonlar genellikle kontamine gıdaların tüketilmesinden 1-6 saat sonra, bulantı, kusma, karın ağrısı ve diyare şeklinde belirti gösterirler. Kontaminasyonun en önemli sebebi insanlardır ve bunun % 30-50'si deri ve mukozanın stafilokok taşıyıcısı olmasıyla ilişkilidir.

KNS'ler doğal fermente et ürünlerinden sıklıkla izole edilmektedirler. Koagülaz-negatif stafilokoklar fermente et ürünlerinde starter olarak kullanılmakta ve bu ürünlere has karakteristik özelliklerin oluşmasını sağlamaktadırlar. Nitrat redüktaz aktiviteleri ile kırmızı rengin gelişmesinde ve stabilitesinde etkili rol oynamaktadırlar. *Staphylococcus xylosus* ve *Staphylococcus carnosus* en sık kullanılan KNS et starter kültürleridir.

Koagülaz-negatif stafilokokların doğal fermente et ürünlerinin aroma oluşumunda, karakteristik yapısının ve son ürün kalitesinin iyileştirilmesinde olumlu yönde etkili olmalarının yanında enterotoksin üretebilme kabiliyetlerinden dolayı da tüketici sağlığı açısından risk teşkil edebilmektedirler. Literatürde koagülaz-pozitif stafilokokların enterotoksin üretme potansiyelinin daha yüksek olduğu belirtilse de koagülaz-negatif stafilokokların da enterotoksin ürettiğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Enterotoksin üreten stafilokok suşları daha çok et, süt, yumurta, tavuk, balık gibi protein bakımından zengin hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunur. Ülkemizde sucuğun yoğun olarak tüketiliyor olmasına rağmen starter kültür kullanılmadan üretilen sucuk örneklerinden izole edilen koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *Macroccus caseolyticus* suşlarında enterotoksin genlerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu alandaki mevcut bilgi birikimine katkı sağlamak amacıyla tasarlanan bu tez çalışmasında, Afyonkarahisar ilinden temin edilen starter kültür kullanılmadan üretilen doğal fermente sucuk örneklerinden Geniş (2015) tarafından izole edilen ve 16S rDNA dizi analizi ile moleküler düzeyde tanımlanan 51 adet koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve 10 adet *Macroccus caseolyticus* suşlarında 18 adet enterotoksin yapısal geninin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr* ve *tst1*) varlığı multiplex-PZR ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Sucuk

Sucuk kelimesinin nereden geldiği tam olarak bilinmemektedir. Sucuk, Orta Doğu ve Avrupa ülkelerinde yaygın olarak tüketilmektedir ve Türkiye’de en çok tüketilen fermente et ürünüdür. Sucuk, baharatlanmış et kıymasının temizlenmiş bağırsağa veya yapay kılıflara doldurulması ve fermente edilmesi sonucu elde edilen bir gıda maddesidir.

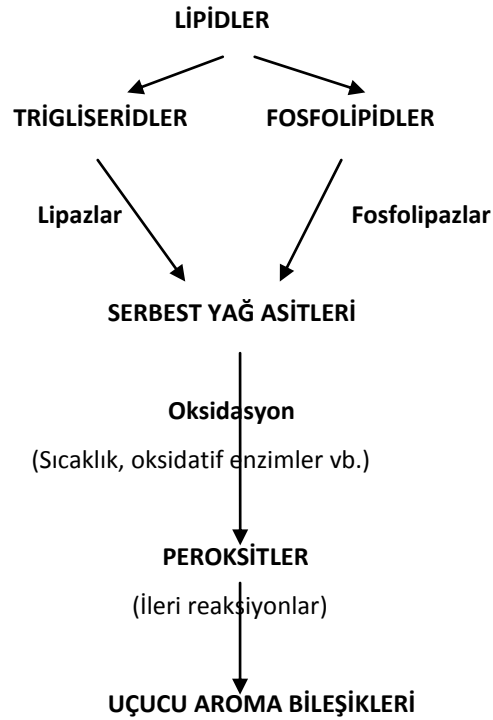
Türk Gıda Kodeksi’ne göre fermente sucuk, “büyükbaş ve küçükbaş hayvan etlerinin ve yağlarının kıyılarak lezzet vericiler ile karıştırıldıktan sonra doğal veya yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda fermentasyon ve kurutma işlemleri uygulanarak nem oranı % 40 ve altına düşürülmüş, kesit yüzeyi mozaik görünümünde olan ısıtma işlemi uygulanmamış fermente et ürünüdür.” Isıtma işlemi görmüş sucuk ise “büyükbaş ve/veya küçükbaş hayvan etlerinin ve yağlarının veya kanatlı hayvan etleri ve yağlarının kıyılarak lezzet vericiler ile karıştırıldıktan sonra doğal veya yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda fermentasyon ve kurutma işlemleri uygulanarak nem oranı % 50’nin altına düşürülmüş, kesit yüzeyi mozaik görünümünde olan ısıtma işlemi uygulanmış et ürünüdür” (Anonim, 2012).

Türkiye’de sucuk, geleneksel sucuk ve ısıtma işlemi görmüş sucuk olmak üzere iki şekilde üretilmektedir. Geleneksel yöntemle sucuk üretmek uzun zaman almaktadır ve ekonomik değildir. Bu nedenle ticari olarak geleneksel sucuk üretimi nadiren yapılmaktadır. Ticari işletmeler genelde daha kısa süren, firesi daha az olan ısıtma işlemi görmüş sucuk üretimi yapmaktadır. Isıtma işlemi bu gibi avantajları sağlarken, fermentasyon süresinin çok kısa tutulması sebebiyle Türk sucuğuna özgü lezzet ve aromanın tam olarak oluşmaması dezavantajdır. Isıtma işlemi uygulanmasıyla fermentasyon reaksiyonları durmaktadır. Buna bağlı olarak asitlik gelişimi durmakta ya da hiç başlayamamaktadır. Sucuğun kendine has tat, koku, renk gibi özellikleri glikoliz, proteoliz ve lipoliz gibi biyokimyasal reaksiyonlar sonucu gelişmektedir. Isıtma

işlemlerle kurutma sırasında aroma bileşenleri de kurutma yöntemine göre belirli bir miktar buharlaşarak kaybolmaktadır (Gökalp, 1986; Ordóñez vd., 1999).

Sucuk bileşimindeki ürünlerin kaliteli olması doğrudan sucuğun kalitesini etkilemektedir. Afyon ve Kayseri illeri ülkemizde sucuğuyla öne çıkmış şehirlerimizdir. Bunun nedeni, kullandıkları etin kalitesi, fermentasyon yöntemleri vb. faktörlerdir. Son yıllarda ülkemizde ekonomik nedenlerle ve mikrobiyolojik olarak daha stabil ürün elde etmek amacıyla sucuk üretiminde ısı işlem uygulanmaktadır. Her işletmenin, formülasyon ve uygulanan ısı işlem parametrelerinin farklılık göstermesi nedeniyle piyasada tat, koku, tekstür ve renkleri farklılık gösteren sucuklar mevcuttur (Kaban ve Kaya, 2009).

Sucuğun duyu özelliklerinin oluşması bazı lipolitik, preolitik ve fermentatif reaksiyonların meydana gelmesiyle de doğrudan ilgilidir. Şekil 2.1’ de fermente et ürünlerinde meydana gelen lipoliz ve oksidasyon reaksiyonları şematize edilmiştir (Toldra, 1998).



Şekil 2.1. Fermente et ürünlerinde meydana gelen lipoliz ve oksidasyon reaksiyonları (Toldra, 1998).

2.1.1.Sucuk üretimi

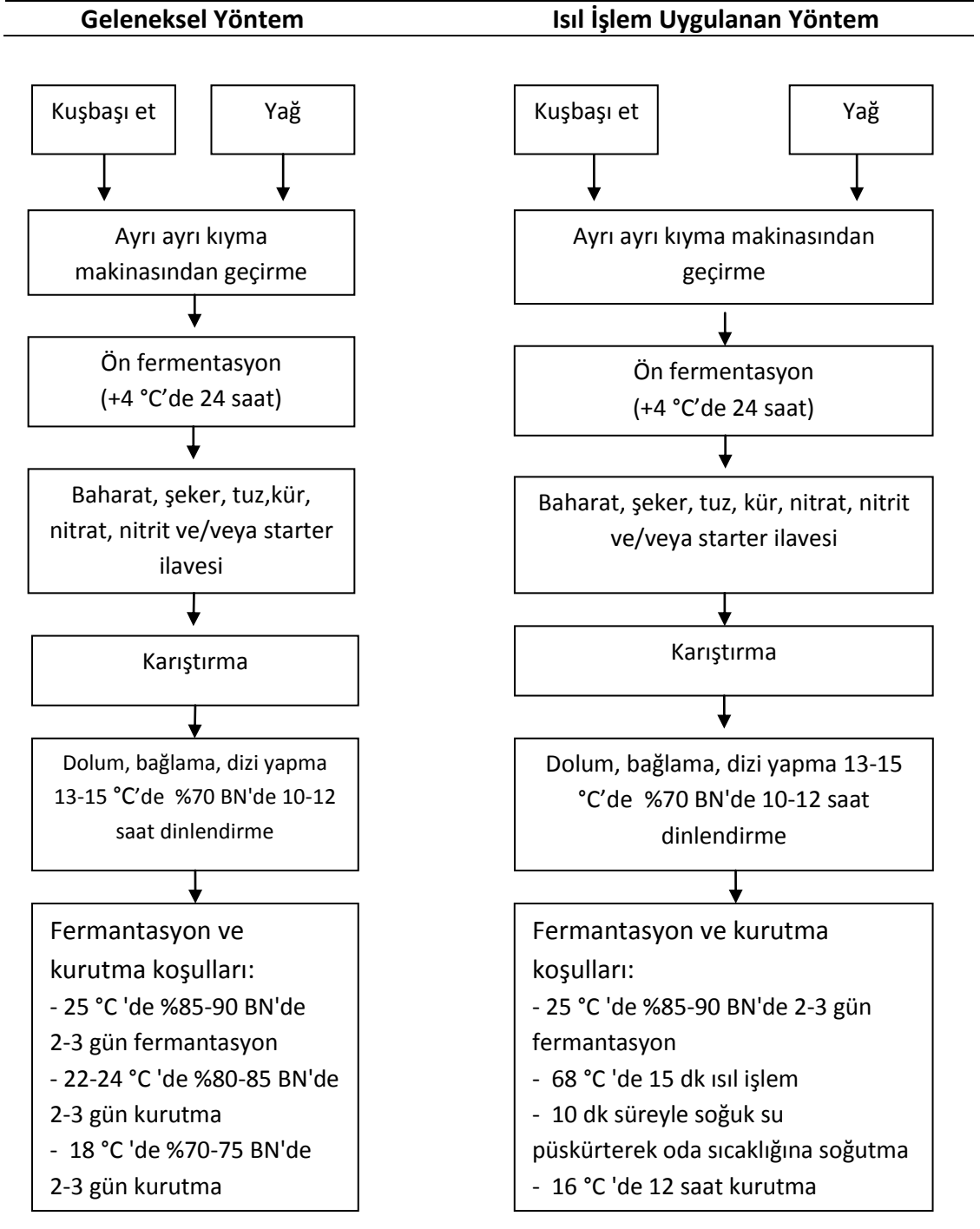
2.1.1.1. Hammadde seçimi ve ön hazırlık

Sucuk üretiminde kullanılacak etler kesimden sonra 1-2 gün dinlendirilmelidir. Kullanılacak olan etin pH'sı 5.4-5.8 olmalıdır. Sucuk hamuruna katılacak olan yağ sucuk hamurunun pH'sını yükselteceğinden etin pH'sı mümkün olduğunca düşük olmalıdır. Yağ olarak genellikle koyun kuyruk yağı kullanılmaktadır. Genç danalardan elde edilen sırt yağı ya da iç yağları da kullanılabilir. Sucuk üretiminde manda ve malak eti tercih edilse de daha çok dana eti ile üretim yapılmaktadır. Manda ve malak eti sucuk üretimine en uygun ettir ve düşük pH'lı olduğundan sucuk dışında değerlendirilmesi zordur (Öztan, 2011).

2.1.1.2. Üretim

Sucuk üretiminde et önce kuşbaşı şeklinde parçalara bölünür. Daha sonra 14'lük ayna ile kuşbaşı halindeki etler kıyma haline getirilir ve +4 °C'de 24 saat dinlendirilir. Kıyma ve yağ ayrı ayrı çekilir. Aksi takdirde yağ etin ısınmasına ve silik kesit yüzey oluşumuna neden olur. Yağ, kıymadan bir numara büyük, farklı bir aynayla çekilir ve böylece daha iyi kesit görünümü elde edilir. Kuterde kıyma, yağ, baharatlar ve diğer katkı maddeleri karıştırılarak sucuk hamuru hazırlanır. Sucuk hamuru karıştırılırken sıcaklığa dikkat edilmelidir. Sıcaklık +2 ile +4 °C arasında olmalıdır. Bunun için et ve yağ bir gün önceden +4 °C muhafaza edilmelidir. Ayrıca formülasyona göre miktarı ayarlanıp kuru buz da kullanılabilir. Daha sonra dolum, fermentasyon ve olgunlaştırma aşamaları gerçekleştirilir. Dolum için sığır ince bağırsağı veya kollajen kılıflar kullanılır. Dolumdan önce bağırsak soğuk suda yumuşatılır. Dolumdan sonra sucuklar 13-15 °C'de 10-12 saat dinlendirilir. Dinlendirme işlemi ile kılıf dışındaki suyun süzülmesi sağlanır ve buna bağlı olarak hamur genişleyerek kılıfı doldurur, böylece kılıf içinde boşluk kalması önlenir. Ayrıca dolumdan sonra 7-8 °C ısıya ulaşan sucuklar direkt fermentasyon odasına alınırsa ani sıcaklık değişimi nedeniyle üründe bozulmalar meydana gelebilmektedir. Şekil 2.2' de fermentasyon şekline göre

geleneksel ve ısıt işlem uygulanmış Türk sucuğu üretimi şematik olarak gösterilmiştir (Öztaş, 2011).



Şekil 2.2. Fermentasyon şekline göre geleneksel ve ısıt işlem uygulanmış Türk sucuğunun üretimi.

2.1.1.3. Fermentasyon ve olgunlaştırma

Fermentasyon işleminde sıcaklık ve nem çok önemlidir. Fermentasyon başlangıcında bağıl nem % 95 olmalı ve 7. ve 8. güne kadar kademeli olarak % 75-80'e kadar indirilmelidir. Fermentasyon sırasında sucuklar birbirine değmeyecek ve hava akımı engellenmeyecek şekilde asılmalıdır. Hava akımı hızı da başlangıçta 1.0 m/sn iken kademeli olarak 0.05 m/sn'ye kadar indirilmelidir. Üretim süresince ürünler düzenli olarak kontrol edilmelidir. Kurutma işlemine sucuğun nemi % 40'ın altına inene kadar devam edilmelidir. Gerekli tat, koku, renk, mikrobiyolojik ve kimyasal değerler elde edildikten sonra sucuklar paketlenerek soğuk hava odalarında depolanmalıdır. Endüstriyel sucuk üretiminde kullanılan etin su oranına bağlı olarak % 20-38 arası fire açığa çıkmaktadır (Öztan, 2011).

2.1.2. Türk sucuğunun kalite özellikleri

Geleneksel ve ısıtılmış Türk sucuğunun Türk Gıda Kodeksi'ndeki bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.1' de, sucuğun kimyasal ve mikrobiyolojik sınır değerleri de Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Geleneksel ve ısıtılmış Türk sucuğunun Türk Gıda Kodeksi'ne göre bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (Anonim, 2012).

Fermente Sucuk	Isıtılmış Görmüş Sucuk
Toplam et proteini değeri kütlece en az % 16	Toplam et proteini değeri kütlece en az % 14
Kollajen miktarı ≤ et proteinleri kütlece % 20'si	Kollajen miktarı ≤ et proteinleri kütlece % 25'i
Nem miktarı/toplam et proteini miktarı < 2,5	Nem miktarı/toplam et proteini miktarı < 3,6
Yağ miktarı/ toplam et proteini miktarı < 2,5	Yağ miktarı/ toplam et proteini miktarı < 2,5
pH ≤ 5.4	pH ≤ 5.6

Çizelge 2.2. Sucuğun kimyasal ve mikrobiyolojik sınır değerleri (Anonim, 2012).

Analiz	Sınır Değerler
Nem	En çok % 40
Kuru maddede tuz	En çok % 5
Yağ	En çok % 40
pH	En çok 5.4
Protein	En az % 20
Nitrat	250 mg/kg
Nitrit	50 mg/kg
Boya	Bulunmamalı
Kokuşma testi	Negatif
İç organ/sakadat	Bulunmamalı
Tek tırnaklı hayvan eti	Bulunmamalı
Toksikolojik muayene	Negatif
Patojen mikroorganizma	Bulunmamalı
<i>Escherichia coli</i> (kob/g)	Bulunmamalı
<i>Staphylococcus aureus</i> (kob/g)	5 numuneden 1 tanesinde en fazla 5×10^3
<i>Clostridium perfringens</i> (kob/g)	5 numuneden 2 tanesinde en fazla 10^2
<i>Salmonella</i> spb. (kob/g)	25 g'da bulunmamalı
Maya-küf (kob/g)	5 numuneden 2 tanesinde en fazla 10^2

Isıl işlem görmüş sucukta uygulanan ısıl işlemin; üretimde çiğ kırmızı et kullanılması durumunda merkezi sıcaklığın en az 68 °C, çiğ kanatlı eti kullanılması durumunda en az 72 °C olacak şekilde uygulanması gerekir. Fermente sucuğa, ısıl işlem görmüş sucuğa ve pastırmaya et kaynaklı olmayan proteinler, nişasta ve nişasta içeren maddeler ile soya ve soya ürünleri katılamaz. Baharat kaynaklı nişasta ve bitkisel protein miktarının toplamı kütlege % 1'i aşamaz. Isıl işlem görmemiş fermente et ürünleri ve ısıl işlem görmüş sucuk, starter kültür ilavesiyle üretilebilir (Anonim, 2012).

2.1.3.Sucukta kullanılan katkı maddeleri

Sucuk hamuruna, sucuğu koruması, sucuğa aroma ve lezzet vermesi için bazı baharat ve koruyucu maddeler konulmaktadır.

2.1.3.1. Şeker

Glikoz, laktoz, sakaroz ve maltoz sucuk üretiminde kullanılan şekerlerdir. Sucuk hamuruna şeker ilavesi ürünün kendine has tat ve aromasının oluşmasında önemli rol oynar. Çabuk olgunlaştırılan fermente sucuklara % 0,5-0,7 oranında, yavaş olgunlaştırılan fermente sucuklara ise % 0,2-1 oranında şeker katkısı yapılır. Sucuk hamurunda bulunan mikroorganizmalarda özellikle laktik asit bakterileri şekerleri fermente ederek pH'nın düşmesini sağlar. Böylece nitrat ve miyoglobinin birleşmesine katkıda bulunarak renk oluşmasını teşvik eder. Ayrıca pH'nın düşmesi sonucu kas proteinleri izoelektrik noktaya yaklaşır ve sucuğun dilimlenebilme özelliği artar (Ulusoy, 2007; Şimşek, 2010).

2.1.3.2. Tuz

Türk gıda kodeksi et ve et ürünleri tebliğinde, sucuğun kuru maddede tuz oranı en fazla % 5 olarak bildirilmiştir (Anonim, 2012). Tuz, sucuğa lezzet vermesinin yanında bakterisit etki de gösterir. Ete gevrek bir yapı kazandırır. Etin su tutma kapasitesini ve proteinlerin çözünürlüklerini artırır. Sucuk üretiminde kullanılacak tuzun kalsiyum, demir, bakır, magnezyum vb. metalleri içermemesi gerekir. İyotun nitrat ile kompleks oluşturarak nitratın nitrite indirgenmesini engellemesinden dolayı sucuk üretiminde iyotlu tuz kullanılmamaktadır (Gök, 2006; Danacıoğlu, 2013).

2.1.3.3. Nitrat ve nitrit

Sucuk üretiminde nitrat; amonyum nitrat, potasyum nitrat veya sodyum nitrat gibi bileşikler halinde katılabilmektedir. Türk Gıda Kodeksi'ne göre sodyum nitrit cinsinden ürüne katılan miktarının 150 mg/kg, son üründe bulunması gereken kalıntı

nitrit miktarının 50 mg/kg, sodyum nitrat olarak ürüne katılması gereken maksimum miktarın 300 mg/kg ve son üründe bulunması gereken kalıntı nitrit miktarının ise 250 mg/kg olması gerektiği belirtilmiştir. Nitritin fazla katılması sonucu üründe siyah lekeler halinde nitrit yanıkları meydana gelebilmektedir. Ayrıca fazla nitrit kullanımı kansorejen nitrozamin oluşumuna neden olmaktadır (Weiss vd., 2010).

Ete kırmızı rengini veren miyoglobin canlı dokuda oksimiyoglobin olarak bulunur. Sodyum nitrat, pH 5.5-6'da nitrat indirgeyen bakteriler tarafından sodyum nitrite indirgenir. Sodyum nitritte daha sonra nitrik oksite indirgenir. Nitrik oksit myoglobin ile birleşerek nitrozo-miyoglobini oluşturur. Nitrozo-miyoglobin fermente sucuğa renk kazandırır. Ayrıca nitrat ve nitrit, fermente et ürünlerinde tüketici sağlığı açısından risk teşkil eden anaerobik bakterilerden *Clostridium botulinum* gelişimini engelleyerek ürün güvenilirliğini artırır (Palamutoğlu ve Sarıçoban, 2012).

2.1.3.4. Kuter yardımcı maddeleri

2.1.3.4.1.Fosfatlar

Fosfatlar, sucuk hamuruna genellikle sodyum tripolifosfat şeklinde ilave edilir. Sodyum tripolifosfat ilavesi sucuk hamurunun pH'sını düşürür ve kas proteinlerinin şişme kabiliyetini artırır. Ayrıca fosfatlar antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterirler ve sucuk hamuruna 500 ppm olacak şekilde ilave edilirler (Url-1, 2013).

2.1.3.4.2.Karboksilli asitler ve tuzları

Karboksilli asitler ve tuzları; laktik, asetik, sitrik, tartarik ve oksalik asitlerin sodyum ve potasyum tuzları şeklinde kullanılabilir (Samelis ve Sofos, 2003c).

2.1.3.5.Stabilizörler

2.1.3.5.1.Glukona delta lakton

Glukona delta lakton, glukonik asitin sulu çözeltisinin doğrudan kristalizasyonu ile elde edilir. Beyaz renkli, kokusuz ve toz halinde bir kimyasaldır. Yavaş salınımlı bir asitlendirici olan glukona delta lakton sucuk hamurunda kademeli ve kararlı bir şekilde pH düşüşüne neden olur. Sitrik aside nazaran yaklaşık olarak üçte bir oranında bir burukluk meydana getirir. Sucuk üretiminde glukona delta lakton, olgunlaşma süresini kısaltma amacıyla kullanılır (Url-2).

2.1.3.6. Baharatlar

Sucuk üretiminde başlıca kullanılan baharatlar sarımsak, karabiber, kırmızı toz biber, kimyon, yenibahar, tarçın, karanfil ve zencefildir. Sarımsak, isteğe bağlı olarak sucuk hamuruna % 0.25-2 oranında ilave edilir. Sarımsak stafilokoklar gibi bazı bakteriler üzerinde bakterisidal ve/veya bakteriyostatik etki gösterir. Sucuk üretiminde kullanılan bir başka baharat karabiberdir. Karabiber sucuk hamuruna % 0.25-0.5 oranında ilave edilir. Sucuk üretiminde kırmızı toz biber, acılık derecesine göre % 0.25-1 oranında kullanılır. Kullanılan kırmızı toz biberde küf kokusu olmamalıdır. Kimyon, sucuk hamuruna % 1 oranında katılır. Yenibahar, isteğe bağlı olarak sucuğa % 0.25 oranında katılmaktadır. Tarçın ve karanfil sucuk hamuruna % 0.25 oranında ilave edilir. Sucuğa lezzet vermelerinin yanı sıra bakterisidal ve/veya bakteriyostatik etki göstererek ürünün raf ömrüne olumlu katkıda bulunurlar. Tarçın ve karanfile benzer olarak zencefil de sucuğa lezzet ve aroma verirken bakterisidal ve/veya bakteriyostatik etki de gösterir. Zencefil sucuk hamuruna % 0.1 oranında katılır. Sucuk hamuruna % 0.5-1 oranında katılan zeytinyağı sucuğa lezzet verir, aynı zamanda sucuk hamurunun karışımını kolaylaştırır ve sucuk kılıfının soyulmasını kolaylaştırır (Url-3).

2.1.3.7. Starter kültürler

Starter kültürler, fermente et ürünlerinde olgunlaşma süresini kısaltmak ve kontrol altına almak için kullanılır. Starter kültür kullanılmasıyla istenmeyen patojen ve saprofitlerin gelişimi önlenir. Asitlik gelişimine bağlı olarak ürünün raf ömrü uzar. Ürünün dilimlenebilme özelliği iyileşir ve fermente et ürününe has renk, lezzet ve aroma kazandırılmış olur (Coşansu ve Ayhan, 1998).

Sucuk üretiminde kullanılacak starter kültürler halofilik olmalı ve nitrit toleransları bulunmalıdır ve çalışma sıcaklıkları 15-43 °C arasında olmalıdır (Hutkins 2006).

Lactobacillus plantarum, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermenti*, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. brevis*, *Streptococcus lactis*, *S. acidilactici*, *Micrococcus varians*, *S.carnosus* ve *S. xylosus* sucuk üretiminde starter kültür olarak kullanılan başlıca bakterilerdir (Hammes ve Knauf 1994, Anar 1997, Alperden ve Nazlı 1998).

2.2. Fermente Sucukların Mikroflorası

Starter kültür dünyada ticari olarak 1961 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Ticari starter kültürün gıda sanayinde kullanılmaya başlanmasıyla daha kaliteli ürünler üreilmeye başlanmış ve üretimde standardizasyon sağlanmıştır. Sucuk üretiminde starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri (LAB), nihai ürünün kalitesini ve güvenliğini artırırken üretimin sürekliliği bakımından ürünün standardizasyonunu da sağlamış olur. Bununla birlikte, bazı küçük işletmeler ve evde sucuk üretimi yapan insanlar starter kültür kullanmadan fermentasyonun kendiliğinden gerçekleştiği geleneksel yöntemi kullanmaya devam etmektedir. Bu yöntemde fermentasyon için gerekli olan mikroorganizmalar etin kendisinden ve ortam florasından sağlanmaktadır (Santos vd., 1998). Endüstriyel üretim yapan işletmeler bu şekilde fermente sucuk üreten esnaf veya kişilere göre, kullandıkları ham maddelerin özellikleri, kullanılan teknolojik malzemeler ve ev florasının spesifik bileşimine bağlı olarak genellikle daha üstün kalitede farklı niteliklere sahip ürün elde etmişlerdir (Moretti vd., 2004). Kuzey Avrupa ülkelerinde ev ortamında üretilen starter kültürler

duyusal özelliklerin kaybına neden oldukları için Güney Avrupa et tesislerinde üretilen starter kültürlerle rekabet edememiştir (Samelis vd., 1998). Starter kültür olarak, spesifik formülasyona göre çevresel faktörler ve ortama hakim olan rakip suşların etkileşimine göre en uygun türler seçilmelidir (Rebecchi vd., 1998). Starter kültürler kaliteli sucuk üretiminde çok önemli bir role sahiptir. Çünkü starter kültürlerin aktivitesiyle oluşan asitlik (pH), arzu edilen tat gelişiminin oluşmasını sağlar ve ürünün bozulmasını önler. Bu nedenle, tüketici için güvenli ve yüksek kaliteli sucuk imal etmek için kullanılacak olan starter kültür kombinasyonlarını belirlemek önemlidir. Gönülalan vd. (2004)'ne göre, starter kültür kombinasyonlarının (*S. xylosum*, *S. carnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* ve *Lb. alimentarius*) sucuğun kalite özelliklerinin iyileştirilmesi ve kimyasal-mikrobiyolojik özellikleri üzerinde olumlu etkileri vardır.

Geleneksel sucuk üretiminde, temel arzu edilen duyuşsal özelliklerin geliştirilmesi ve son ürünün hijyenik stabilitesini sağlamak için doğal flora tarafından kontrol edilen bir fermentasyon gerçekleşir (Gökalp, 1995; Bozkurt ve Erkmen, 2004). Bu doğal floraya ev florası da denilmektedir (Garcia-Varona vd., 2000). Ancak doğal florada gerçekleşen fermentasyon sonucu sucukta istenmeyen duyuşsal özellikler oluşabilmektedir. Bu durum, ortam florasında fermentasyonu gerçekleştirecek olan mikroorganizmaların rekabetçi suşlara yenik düşmesinden kaynaklanmaktadır (Leroy vd., 2006; Talon vd., 2007). Fermente sucukların duyuşsal ve mikrobiyolojik özelliklerinin oluşması floraya, florayı oluşturan mikroorganizmaların sayısına, ortam sıcaklığına, bağıl neme, su aktivitesine, pH'ya, sucuk hamurunun bileşimine, kullanılan ekipmanların ve ortamın hijyen koşullarına bağılıdır (Erdoğrul ve Ergün, 2005; Hampikyan, 2006).

Yapılan çalışmalar fermente et ürünlerinin kendilerine has karakteristik tat, aroma ve tekstürün oluşmasında rol oynayan iki bakteri grubunun laktik asit bakterileri ve koagülaz-negatif stafilokoklar olduğunu göstermiştir (Talon ve Leroy, 2011).

2.2.1. Laktik asit bakterileri

LAB; Gram-pozitif, katalaz negatif, aside dayanıklı, karbonhidrat fermentasyonu sonucunda son ürün olarak laktik asit oluşturan mikroorganizma grubudur. Mikroskopta incelendiklerinde kok veya çubuk şeklinde görülürler. Birkaç istisna üye dışında hepsi hareketsizdir. *Sporolactobacillus imilinus* dışında hiçbir spor oluşturmaz (Ludwig, 1993). LAB; fermentasyon sonucu oluşan ürünlerin çeşidine ve miktarına göre sınıflandırıldıklarında homofermantatif ve heterofermantatif olmak üzere ikiye ayrılırlar. Glukozu, fruktoz di fosfat yoluyla parçalayıp fermentasyon sonucu % 95-100 oranında laktik asit üretenler homofermantatif LAB olarak adlandırılırlar. Glukozu, hegzos mono fosfat yoluyla parçalayıp fermentasyon sonucu % 50 oranında laktik asit üretirken, aynı zamanda etanol, gliserol, mannitol, fruktoz ve asetik asit gibi yan ürün oluşturanlar ise heterofermantatif LAB olarak adlandırılırlar (Drinan, 1976).

Lactobacillus, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinsleri LAB'nin temel tanımlanmış cinsleridir. Bu cinslerin taksonomik düzeltmelerinden sonra yeni cinsler tanımlanmış ve bu yeni sınıflandırma ile *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* cinsleri LAB'ne dahil edilmiştir (Axelsson, 1998). Gıda endüstrisi açısından LAB'nin en önemli cinsleri; *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Lactobasillus*' tur (Cogan, 1996).

Doğal fermente sucuklarda, baskın florayı LAB oluşturur ve olgunlaşma sonunda izole edilen en yaygın laktik asit grubunu; *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* ve *Lb. plantarum* gibi *Lactobacillus* üyeleri oluşturur (Özdemir, 1999; Kaban, 2007).

LAB, sucuk florasında kendiliğinden gelişebildiği gibi sucuk üretiminde starter kültür olarak da kullanılırlar. LAB, renk, tat ve kokuyu geliştirir. Sucuk fermentasyonunda, karbonhidratlardan organik asitlerin üretiminde LAB'nin önemi büyüktür. LAB, sucuk hamurunda asitliği düşürürken kas proteinlerini koagüle ederek nihai ürünün kesit

kararlılığını, sıklığını ve bütünlüğünü sağlarlar (Hughes ve Monfort, 1997; Ordóñez vd., 1999). LAB dolaylı olarak sucuğun kırmızımsı renginin oluşmasına yardımcı olurken, istenilen yüzey özelliklerini de verirler. Ayrıca LAB antagonistik aktiviteleri sayesinde sucuk karışımına kontamine olan ve gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalara karşı bakterisidal veya bakteriyostatik etkisiyle sucuğun hijyenik kalitesini korurlar (Gökalp, 1982; Schillinger ve Lücke 1989; Çon, 1995).

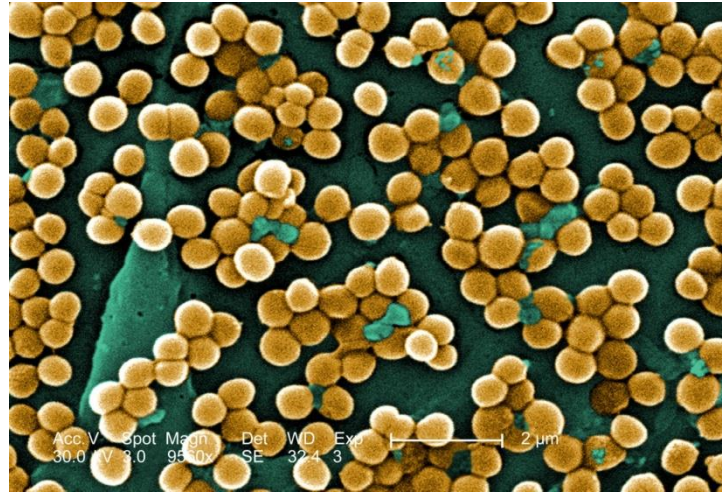
LAB ürettikleri laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler (Schillinger ve Lücke, 1989; Spelhaug ve Harlander 1989; Schillinger ve Lücke, 1990; Lewus vd., 1991; Okereke ve Montville, 1991; Juven vd., 1992; Barefoot ve Nettles, 1993), hidrojen peroksit (Barefoot ve Klaenhammer, 1983; Schillinger ve Lücke, 1990; Juven vd., 1991; Lewus vd., 1991; Mortvedt vd., 1991; Juven vd., 1992;), diasetil (Juven vd., 1991; Lewus vd., 1991; Okereke ve Montville, 1991), asidolin, reuterin (Juven vd., 1991; Weber, 1994) ve CO₂ benzeri metabolitler (Weber, 1994) sayesinde antimikrobiyal aktivite gösterirler.

Lb. curvatus ve *Lb. plantarum*'un fermente sucuktan yaygın bir şekilde izole edilmelerine rağmen, *Lb. sakei* Güney Avrupa sucuklarında baskın LAB türüdür (Montel, 1999; Rantsiou ve Kokolin, 2006). *Lb. sakei*, fermente sucukta uygun koşullar altında, diğer LAB'ne göre daha kısa bir asitlenme aşaması, daha hızlı gelişme ve son üründe yüksek hücre yoğunluğu gösterir (Dossmann vd., 1996). *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. casei*, *P. pentosaceus* ve *P. acidilactici* en çok kullanılan ticari et LAB starter kültürleridir (Hammes ve Hertel, 1998; Hugas ve Monfort, 1997).

2.2.2. Koagülaz-negatif stafilokoklar

Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesi içerisinde yer alan, doğada yaygın olarak bulunan ve bazı ekolojik nişler tarafından yayılan Gram pozitif koklardır. Stafilokoklar doğal yaşamda, sıcakkanlı hayvanların ve insanların cilt ve mukoza membranları üzerinden; et, süt, peynir gibi gıda maddelerinden ve toprak, kum, hava, su gibi çevre kaynaklarından izole edilebilirler (Kloos ve Schleifer, 1986).

Stafilokoklar mikroskop altında yuvarlak üzüm taneleri gibi görünürler (Şekil 2.3). Hareketsiz, aerobik ortamı tercih eden fakat fakültatif anaerob gibi de davranabilen organizmalardır (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* zorunlu anaerob bakterilerdir). Stafilokok türlerinin büyük bir kısmı zararlı olmazken, vücuda dışarıdan alınmaları sonucu patojen olabilmektedirler (Bannerman, 2003).



Şekil 2.3. Stafilokokların mikroskop altındaki görüntüsü (Biology News, 2011).

Staphylococcus (üzüm salkımı) adı, 1883 yılında Ogston tarafından patojeniteye neden olan *Micrococcus* grubuna verilmiştir. Ogston mikroskopik morfolojilerine göre bu kokları ikiye ayırmış ve kitleler halinde bulunan, üzüm salkımı şeklinde görünenlere "*Staphylococcus*", zincir halinde görünenlere ise "*Billroth Streptococcus*" adını vermiştir. *Staphylococcus* cinsinin resmi açıklaması 1884 yılında Rosenbach tarafından yapılmıştır. Rosenbach bu cinsi *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus albus* olarak iki türe ayırmıştır. *Staphylococcus* 1886 yılında Flügge tarafından *Micrococcus* cinsinden ayrılmıştır. Flügge, bu iki cinsi jelatin oluşturma ve konaklama ilişkisi bakımından ikiye ayırmıştır. Stafilokokların sıvılaştırılmış jelatin üzerinde parazit ya da patojenik olduğunu, mikrokokların ise hem jelatin hem de saprofitler üzerindeki aktivitelerinin değişken olduğunu belirtmiştir. Daha sonraki yıllarda ise Gram-pozitif ve katalaz pozitif kok morfolojisine sahip olan *Staphylococcus*, *Micrococcus* ve *Planococcus* cinsleri, *Micrococcaceae* familyasına dahil edilmiştir (Götz vd., 2006).

Evans vd. (1995), mikrokok ve stafilokok cinslerini oksijen isteklerine göre ayırmayı önermiştir. Fakültatif anaerobik koklar *Staphylococcus* cinsine, zorunlu aerobik koklar ise *Micrococcus* cinsine dahil edilmiştir. *Staphylococcus* ve *Micrococcus* arasında net bir ayırım 1960'ların ortalarında DNA baz bileşimi temelinde yapılmıştır (Silvestri ve Hill, 1965). *Micrococcus* cinsinin üyelerinin DNA'ları yaklaşık olarak % 70 mol gibi yüksek bir G+C oranına sahipken, *Staphylococcus* cinsinin üyelerinin DNA'ları % 33-40 mol G+C oranına sahiptir. Daha sonraki çalışmalar stafilokokların, hücre duvarı bileşimine dayalı olarak mikrokoklardan ve diğer katalaz pozitif koklardan ayırt edilebileceğini göstermiştir (Schleifer ve Kandler, 1972; Endl vd., 1983). Katalazlar üzerindeki immünokimyasal çalışmalar (Schleifer, 1986), DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları, DNA-rRNA hibridizasyon çalışmaları (Schleifer vd., 1979; Kilpper vd., 1980) ve 16S rRNA sekans analizleri (Ludwig vd., 1981) sonucu stafilokok ve mikrokokların epigenetik ve genetik olarak farklılık gösterdiğini açıkça ortaya koymuştur. 1970'lere kadar *Staphylococcus* cinsi üç türden oluşmaktaydı. Bunlar; koagülaz-pozitif tür *S. aureus* ve koagülaz-negatif tür *S. epidermidis* ile *S. saprophyticus*'tur. Ancak daha sonraki yıllarda kemotaksonomik ve genotipik özellikleri ile birçok yeni stafilokok türü tanımlanmıştır. *Staphylococcus* cinsi içinde 2006 yılına kadar 36 tür bulunmaktaydı (Çizelge 2.3) (Götz vd., 2006). Ancak günümüzde 41 *Staphylococcus* türü olduğu belirtilmektedir (Leibniz Enstitüsü-DSMZ, 2015).

Çizelge 2.3. Stafilokok tür ve alt türleri (Götz vd., 2006).

Tür	Alt tür	Referans
<i>S. arlettae</i>		Schleifer vd., 1984
<i>S. aureus</i>	<i>anaerobius</i>	De la Fuente vd., 1985
<i>S. aureus</i>	<i>aureus</i>	Rosenbach, 1884
<i>S. auricularis</i>		Kloos ve Schleifer, 1983
<i>S. capitis</i>	<i>capitis</i>	Kloos ve Schleifer, 1975
<i>S. capitis</i>	<i>ureolyticus</i>	Bannerman ve Kloos, 1991
<i>S. caprae</i>		Devriese vd., 1983
<i>S. carnosus</i>	<i>carnosus</i>	Schleifer ve Fischer, 1982
<i>S. carnosus</i>	<i>utilis</i>	Probst vd., 1998
<i>S. chromogenes</i>		Devriese vd., 1978; Hajek vd., 1986
<i>S. cohnii</i>	<i>cohnii</i>	Schleifer ve Kloos, 1975
<i>S. cohnii</i>	<i>urealyticum</i>	Kloos ve Wolfshohl, 1991
<i>S. condimentii</i>		Probst vd., 1998
<i>S. delphini</i>		Varaldo vd., 1988
<i>S. epidermidis</i>		Winslow ve Winslow, 1908; Evans, 1916
<i>S. equorum</i>	<i>equorum</i>	Schleifer vd., 1984
<i>S. equorum</i>	<i>linens</i>	Place vd., 2003
<i>S. felis</i>		Igimi vd., 1989
<i>S. şeurettii</i>		Vernozy-Rozve vd., 2000
<i>S. gallinarum</i>		Devriese vd., 1978
<i>S. haemolyticus</i>		Schleifer ve Kloos, 1975
<i>S. hominis</i>	<i>hominis</i>	Kloos ve Schleifer, 1975
<i>S. hominis</i>	<i>novobiosepticus</i>	Kloos vd., 1998
<i>S. hyicus</i>		Sompolinski, 1953; Devriese vd., 1978
<i>S. hyicus</i>	<i>chromogenes</i>	Devriese vd., 1978
<i>S. intermedius</i>		Hajek, 1976
<i>S. kloosii</i>		Schleifer vd., 1984
<i>S. lentus</i>		Kloos vd., 1976; Schleifer vd., 1983
<i>S. lutrae</i>		Foster vd., 1997
<i>S. muscae</i>		Hajek vd., 1992
<i>S. pasteurii</i>		Chesneau vd., 1993
<i>S. piscifermentans</i>		Tanasupawat vd., 1992
<i>S. saccharolyticus</i>		Kilpper-Balz ve Schleifer, 1981
<i>S. saprophyticus</i>	<i>bovis</i>	Hajek vd., 1996
<i>S. saprophyticus</i>	<i>saprophyticus</i>	Shaw vd., 1951
<i>S. schleiferi</i>	<i>coagulans</i>	Igimi vd., 1990
<i>S. schleiferi</i>	<i>schleiferi</i>	Freney vd., 1988
<i>S. sciuri</i>	<i>carnaticus</i>	Kloos vd., 1997
<i>S. sciuri</i>	<i>lentus</i>	Kloos vd., 1976
<i>S. sciuri</i>	<i>rodentium</i>	Kloos vd., 1997
<i>S. sciuri</i>	<i>sciuri</i>	Kloos vd., 1976
<i>S. simulans</i>		Kloos ve Schleifer, 1975
<i>S. succinus</i>	<i>casei</i>	Place vd., 2003
<i>S. succinus</i>	<i>succinus</i>	Lambert vd., 1998
<i>S. vitulinus</i>		Webster vd., 1994
<i>S. warneri</i>		Kloos ve Schleifer, 1975
<i>S. xylosus</i>		Kloos ve Schleifer, 1975
<i>S. lugdunensis</i>		Freney vd., 1988

Stafilokok türlerinin çoğu zararsızdır ve enfeksiyonla herhangi bir ilişkisi yoktur. Bununla birlikte, bu cinsin bazı türleri enzim, toksin, konakçı hücreler ile bir dizi üretim ve bağışıklık sisteminden kaçma kabiliyetleri ile çeşitli hastalıklara neden olur (Zell vd., 2008).

Stafilokok türlerinin üreme ve gelişmeleri için optimum sıcaklık 30-37 °C, optimum pH ise 7-7.5'tir. Trypton Soy Broth (TSB) Agar, Brain Heart Agar, kanlı agar ve nutrient agar besiyerlerinden izole edilebilirler. Ayrıca % 7.5-10 NaCl içeren basit besiyerinde üreyebilirler. Glikozu fermente ederek laktik asit oluştururlar. Stafilokoklar laktoz, maltoz, mannoz, sükroz, trehaloz ve mannitolu fermente etme (Mannitolu fermente etme yeteneğine sadece *S. aureus* sahiptir.), nitratı nitrite indirgeme yeteneğine sahiptirler (Moreillon vd., 2005; At, 1999).

Çoğu stafilokok, koagülaz-negatiftir. Ancak, *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. lutrae* ve bazı *S. hyicus* suşları gibi istisnalar vardır (Kloos ve Bannerman, 1995). Koagülaz-negatif türler, özellikle *S. xylosus*, *S. equorum* ve *S. carnosus*, teknolojik önemi olan ve fermente gıdalarda, özellikle de sucuk olgunlaşması sırasında arzu edilen lezzet ve aroma oluşumunu sağlayan türlerdir. Örneğin; *S. saprophyticus* sucuk aromasının oluşumuna yardım eder (Samelis vd., 1998) ve olgunlaşma sırasında kötü koku oluşumunu önler (Mauriello vd., 2004).

2.2.3. *Macrococcus caseolyticus*

Macrococcus caseolyticus 1998 yılına kadar *Staphylococcus caseolyticus* olarak adlandırılmaktaydı (Schliefer vd., 1982) ancak 1998 yılında *Macrococcus* cinsine dahil edilmiştir (Kloos vd., 1998). Bugüne kadar *M. caseolyticus* suşunun insanlardan izole edildiğine dair bir rapor bulunmamaktadır (Tsubakishita, 2010). *M. caseolyticus* et ve süt gibi proteince zengin hayvansal gıdalardan ve hayvanların derilerinden izole edilmektedir (Schliefer vd., 1982; Kloos vd., 1998; Baba vd., 2009). Yapılan çeşitli çalışmalar ile fermente sosislerden *Macrococcus caseolyticus* suşlarının izole edildiği bildirilmiştir (Blaiotta vd., 2004; Lacumin vd., 2012; Busconi vd., 2014; Kesmen vd., 2014).

2.3. Stafilokoklar Tarafından Üretilen Enterotoksinler

Enterotoksinler, Barber (1914)'ın stafilokok kaynaklı mastitisli ineğin sütünden içmesiyle ortaya çıkmış ve Dack vd. (1930) tarafından tanımlanmıştır. Toksinler endotoksin ve ekzotoksin olmak üzere ikiye ayrılırlar. Enterotoksinler, ekzotoksindir ve sindirim sistemine etki ettikleri için bu isimle anılırlar (Marth ve Halpindohnalek, 1989).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, *Staphylococcus aureus*' un emetik aktivite gösteren stafilokokal enterotoksinler (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) ve primat modellerde emetik aktivite göstermeyen (SEIL ve SEIQ) veya henüz primat modellerde test edilmeyen (SEIJ, SEIK, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIU, SEIU2 ve SEIV) stafilokokal benzeri proteinler gibi çeşitli toksinler ürettiğini göstermiştir. Ayrıca, *S. aureus*' un başlangıçta SEF olarak dizayn edilen emetik aktivite göstermeyen toksik şok stafilokokal toksini (TSST-1) de ürettiği tespit edilmiştir (Argudin vd., 2010).

Stafilokok enterotoksinler (SE) lizin, aspartik asit, glutamik asit ve disülfid köprü oluşturan sistein açısından zengin, 26000-29000 Da molekül ağırlığına sahip, monomerik, küresel, suda çözünür proteinlerdir (Bergdoll, 1971). Enterotoksinlerin inaktivasyonları ortamın sıcaklığına, saflığına, kompozisyon ve pH değerine bağlı olarak değişir (Notermans vd., 1988). Enterotoksinlerin en önemli özelliği ısıya karşı dirençli olmalarıdır. Milci ve Yaygın (2006) yaptıkları çalışmada SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED ve SEE'nin 100 °C' de 10 dakika ısı işlem uygulamasıyla aktivitelerinin yarı yarıya düştüğünü, 121 °C'de 1-2 dakikalık ısı işlem uygulanmasıyla da inaktif olduklarını tespit etmişlerdir.

Staphylococcus cinsi bakterilerin ürettikleri enterotoksinlerin 10⁶ kob/g veya üzeri miktarda vücuda alınmaları stafilokokal gıda zehirlenmelerine (SFP' ye) neden olmaktadır. Stafilokok enterotoksini alımından sonra 1-6 saat içinde bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı, baş ağrısı ve kas krampları gibi belirtiler meydana gelir. Klinik koşullarda nispeten daha hafif atlatılabilir. Bu nedenle şiddetli belirtiler hastaneye

yatış gerektirebilir. Nadirde olsa SFP' ye baēlı zehirlenmelerde çocuk ve yaşılı ölümleri görölmüştür (Bennet vd., 1999). Gıda zehirlenmesine neden olan sorumlu enterotoksinin gerekli miktarı kişinin baēışıklık sistemine baēlı olarak deēişmekle birlikte, gönüllü insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada sadece 1-5 µg/70 kg olduēu tahmin edilmektedir (Bergdoll vd., 1991). Çocuklarda görülen çikolatalı süt kaynaklı bir stafilokok zehirlenmesinde salgına neden olan enterotoksin (SEA) konsantrasyonu 0,5 ng/mL olarak tespit edilmiştir (Evenson vd., 1988).

Hu vd.'nin yaptığı bir çalışmada, ev misk farelerinde SEI kusmaya neden olmuştur (Hu vd., 2003; Hu vd., 2007). Uluslararası İsimlendirme Komitesi, stafilokok kaynaklı süperantijen adlandırması için, kusmaya neden olan bu enterotoksin benzeri süperantijenlerin (SEI) test edilmesini tavsiye etmiş ve kobay maymunlardaki oral denemeden sonra bu süperantijenlerin SE olduēu belirlenmiştir (Lina vd., 2004). McCormick vd. (2001) kusturucu etkinin, SE içinde bulunan eşsiz bir disülfid köprüsü varlığına baēlı olabileceğini belirtmektedir.

SFP salgınları ile ilgili literatürde birçok örnek vardır. SFP sıklığı ölkeler arasında deēişmektedir. Gustafson vd. (2005)' nin yapmış olduēu derlemeye göre bazı ölkelerde yaşanan stafilokokal gıda zehirlenmeleri Çizelge 2.4'te gösterilmiştir. Greig vd. (2007)'nin yapmış olduēu büyük bir araştırmada da SFP'ye % 6,5 (53/816) oran ile gıda işleyicilerinin neden olduēu bildirilmiştir.

Çizelge 2.4. Bazı ülkelerde yaşanmış stafilokok gıda zehirlenmeleri (Gustafson vd., 2005).

Gıda ürünü	Etken toksin tipi	Ülke	Referans
Süt ürünleri	SEA	Amerika	Evenson vd., 1988
Çikolatalı süt	SEA, SEB, SEC, SED	İngiltere	Wieneke vd., 1993
Süt ürünleri	SEA	Japonya	Asao vd., 2003; Ministry of Health and Welfare, Osaka City., 2001
		Norveç	Kvellestad vd., 1988
Peynir ve tereyağı		Brezilya	Do Carmo vd., 2004
		Tayvan	Thaikruea vd., 1995
Et ürünleri		Amerika	Jones vd., 2002
Jambon		İngiltere	Wieneke vd., 1993
Diğer domuz ürünleri		Tayvan	Chen vd., 2004
Sığır eti		Brezilya	Do Carmo vd., 2004
Kümes hayvanları	SEA, SEB, SEC, SED	İngiltere	Wieneke vd., 1993
Kabuklu deniz ürünleri /balık	SEA, SEB, SEC, SED	İngiltere	Wieneke vd., 1993
Fırın ürünleri	SEA, SEC	Amerika	Corpening ve Foxhall, 1935
Muhallebi dolgulu kek		Japonya	Kitamoto vd., 2009
Karışık salatalar		Hindistan	Nema vd., 2007
Yumurta/patates salatası		Norveç	Jorgensen vd., 2005
		Japonya	Miwa vd., 2001
Diğer salatalar		İngiltere	Wieneke vd., 1993
		Amerika	Genigeorgis, 1989
Meyve/sebze		Amerika	Bennett, 1992

Önceleri, koagülaz-negatif stafilokok suşlarının, saprofit veya nadiren patojenik özellik gösterebileceği düşünülmekte ve *S. aureus*'un, stafilokok cinsinin tek patojeni olduğuna inanılmaktaydı (Kloos ve Bannerman, 1994). Koagülaz pozitif olan *Staphylococcus aureus* çok sayıda toksin üretir ve en iyi bilinen patojen stafilokoktur. Ancak yapılan çalışmalara göre; *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. chromogenes* ve *S. lentus* gibi koagülaz-negatif stafilokokların da enterotoksin üretebildiği bildirilmiştir (Valle, 1991; Marin, 1992; Udo vd., 1999).

S. carnosus ve *S. xylosus* suşları gibi KNS suşları geleneksel et fermentasyonunda kullanılmaktadır. *S. condimenti*, *S. piscifermentans*, *S. equorum* ve *S. succinus* genellikle fermente gıdalardan izole edilmekte (Hoppe-Seyler vd., 2004) ve bu

nedenle starter ya da koruyucu kültür olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Place vd., 2002, 2003; Probst vd., 1998; Tanasupawat vd., 1992). Son raporlar, jambondan izole edilen *S. xylosus* türünün enterotoksin üreten suşlarının olduğunu belirtmektedir. Vernozy-Rozve vd. (1996) *S. xylosus* ve gıdadan elde edilen *S. equorum*'un en sık ürettiği enterotoksinin enterotoksin E (SEE) olduğunu bildirmiştir. Even vd. (2009) de yaptıkları çalışmada *S. saprophyticus* suşunun enterotoksin C (SEC) ürettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, bazı KNS türlerinin sadece TSST-1 veya bunun yanında başka enterotoksinleri de üretmelerinin mümkün olduğunu vurgulayan raporlar bulunmaktadır (Crass ve Bergdoll, 1986; Kahler vd., 1986). Valle vd. (1991)'nin çalışmasında koagülaz-negatif suşlarının % 16'sının TSST-1 üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler gıda üretiminde kullanılan KNS türlerinin patojenik potansiyelini karakterize etme gereğinin ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Hastalık oluşturma faktörlerinden sorumlu genlerin birçoğu için suşa özel genetik elemanlar bulunur. SE genleri kromozom, plazmidler veya transpozonlar ve faj genomları içinde yer almaktadır (Le Loir vd., 2003). Çizelge 2.5' te *S. aureus* için bazı stafilokokokal enterotoksin genlerinin yardımcı elemanları/patojenite adaları gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Bazı stafilokokal enterotoksin genlerinin genetik desteği (Loir vd., 2003).

Gen	Genetik lokasyon	Referans
<i>sea</i>	profaj	Betley ve Makalanos, 1985; Betley,1994
<i>seb</i>	kromozom, plazmid, transpozon	Shafer ve Iveolo, 1978; Shalita vd.,1977
<i>sec</i>	patojenite adaları	Fitzgerald vd., 2001
<i>sed</i>	plazmid (pib485)	Bayles ve Iveolo,1989
<i>see</i>	hatalı faj	Couch vd., 1988
<i>seq</i>	egc, kromozom	Jarraud vd., 2001
<i>sei</i>	egc, kromozom	Jarraud vd., 2001
<i>sej</i>	plazmid (pib485)	Zhang vd., 1998
<i>sek</i>	patojenite adaları	Orwin vd., 2001
<i>sel</i>	patojenite adaları	Fitzgerald vd., 2001
<i>sem</i>	egc, kromozom	Jarraud vd., 2001
<i>sen</i>	egc, kromozom	Jarraud vd., 2001
<i>seo</i>	egc, kromozom	Jarraud vd., 2001

Yardımcı gen düzenleyiciler (*agr*) *S. aureus* virulans belirlenmesinde toksin represörü olarak kullanılmaktadır (Peng vd., 1988; Cheung vd., 1992; McNamara vd., 2000). *agr*, lokus üzerinde zıt yönlerde iki promotor P2 ve P3; sırasıyla iki transkript, RNAII ve RNAIII üretmektedir. RNAIII, *S. aureus* içinde hücre dışı toksin, enzim ve hücre yüzey proteinleri vb. hastalık oluşturma faktörleri gibi çok sayıda genin transkripsiyonundan sorumlu 510 nükleotitten oluşmaktadır (Hui vd., 1994).

Bir çalışmada, *S. lugdunensis* türlerinde RNAIII tespit edilmiştir (Vandenesch vd., 1993). Başka araştırmacılar da *S. aureus agr* lokusu ile karşılaştırıldığında % 68 benzer olan *S. epidermidis agr* lokusunu tanımlamışlardır (Van Wamel vd., 1998). *S. epidermis* RNAII'si de *S. aureus*'unkine benzer olup, toksin üretiminden sorumlu genlerin düzenleme sistemi içinde yer alan A, B, C ve D *agr* proteinlerini kodlamaktadır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

Tez çalışması kapsamında kullanılan 51 adet koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve 10 adet *Macroccoccus caseolyticus* suşu Geniş (2015) tarafından Afyonkarahisar ilinden temin edilen starter kültür kullanılmadan üretilen fermente sucuk örneklerinden izole edilmiştir. İzolatların tür düzeyinde tanısı 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır. Araştırma kapsamında kullanılan koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarının GenBank veri bankasına kayıtlı referans suşlarla ile benzerlik oranları Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşları ve benzerlik oranları.

Bakteri Kodu	Bakteri Türü	Benzerlik Oranı (%)
BYS1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	97
BYS2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	97
BYS4	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS5	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	99
BYS7	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	97
BYS8	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98
BYS9	<i>Staphylococcus cohnii</i>	98
BYS10	<i>Staphylococcus sciuri</i>	97
BYS11	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS12	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	99
BYS13	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	97
BYS14	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99
BYS15	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS16	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	98
BYS17	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS18	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS19	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	99
BYS20	<i>Staphylococcus sciuri</i>	97
BYS21	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	98
BYS22	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	98
BYS23	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97
BYS24	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	95

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşları ve benzerlik oranları (Devam).

Bakteri Kodu	Bakteri Türü	Benzerlik Oranı (%)
BYS25	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS27	<i>Staphylococcus hominis</i>	98
BYS28	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	96
BYS29	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	99
BYS30	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS32	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS34	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS35	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99
BYS36	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99
BYS37	<i>Staphylococcus xylosus</i>	98
BYS39	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS40	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98
BYS41	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS42	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS43	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS44	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS45	<i>Staphylococcus sciuri</i>	100
BYS46	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS47	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS48	<i>Staphylococcus warneri</i>	99
BYS49	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS50	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98
BYS51	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98
BYS52	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	99
BYS53	<i>Staphylococcus warneri</i>	98
BYS54	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS55	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	97
BYS56	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS57	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS58	<i>Staphylococcus hominis</i>	99
BYS59	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS60	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS61	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
BYS62	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	98
BYS63	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	98
BYS64	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS65	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS66	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BYS67	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	99

Koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşları Triptone Soy Broth (TSB, Lab M, Ltd., Bury, Lancashire, İngiltere) besiyeri ortamlarında 37 °C'de 18 saat inkübe edilerek geliştirilmiştir. Stok kültürler TSB besiyeri ortamlarına % 20 (w/w) oranında steril gliserol (Riedel-de Haën, Seelze, Almanya) ilave edilerek -32 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışma materyalleri ise, gliserol ilave edilmemiş TSB ortamlarında +4 °C'de ve haftalık transferler yapılarak saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarından genomik DNA izolasyonu için, suşlar TSB broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat süreyle geliştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 0.5 mL alınarak steril Eppendorf tüplerine aktarılmış ve tüpler hücrelerin çöktürülmesi için 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi sonrası üst faz dökülmüş ve hücre peletlerinin üzerine 0.5 mL steril liziz çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra, hücre peletleri tüp karıştırıcıda çözülmüş ve tüpler 37 °C'ye ayarlı su banyosunda (DAIHAN Scientific Co., Ltd. WB-22, Kore) 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda, tüplere 30 µL % 10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS, Serva, Heidelberg, Almanya) çözeltisi ilave edilmiş ve 80 °C'ye ayarlı su banyosunda (Nüve NB9, Türkiye) 5 dakika tutulmuştur. İşlem sonrasında lize olmuş hücre süspansiyonlarının üzerine 0.7 mL fenol-kloroform (1:10, v/v) karışımı eklenmiş ve tüpler 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) edilmiştir. Daha sonra, mikropipet yardımıyla üst faz alınmış ve yeni steril Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Tüplere 0.7 mL 2-propanol (Merck KgaA, Darmstadt, Almanya) ilave edildikten sonra, tüpler tekrar 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) işlemine tabi tutulmuştur. İşlem sonrasında, üst faz dökülmüş ve genomik DNA çöktürülmesi 50 µL steril Tris-EDTA tamponunda (pH 8.0) çözülmüştür. İzole edilen genomik DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Cancilla vd. 1992).

Liziz Çözeltisi

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

SDS (% 10)

SDS	10	g
Destile su	100	mL

Tris-EDTA

Tris	0.121	g
EDTA	0.037	g
Destile su	100	mL
pH 8.0 $\pm$ 0.02		

3.2.1.1. Genomik DNA örneklerinin elektroforezi

Koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarından izole edilen genomik DNA örneklerinin varlığı agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilmiştir. Elektroforez işleminde (Thermo OWL EASYCAST B2, Amerika Birleşik Devletleri) yatay jel sistemi kullanılmıştır. Agaroz jeller % 1 agaroz (w/v) olacak şekilde Tris-Asetat elektroforez tamponu içerisinde hazırlanmış ve mikrodalga fırında (Arçelik MD 565 S, Türkiye) çözülmüştür. Hazırlanan ortamın oda sıcaklığında 45 °C'ye kadar soğuması beklenmiş ve soğuyan ortam elektroforez plakasına dökülmüştür. Jel tarakları tanka yerleştirilmiştir. Jelin polimerizasyonu için tank oda sıcaklığında 30-45 dakika bekletilmiştir. Jelin polimerizasyonunu takiben, jel yüzeyini kapatacak biçimde Tris-Asetat elektroforez tamponu tanka ilave edilmiş ve jele zarar vermeden taraklar ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Her bir genomik DNA örneğinden 15 µL alınarak steril Eppendorf tüplerine aktarılmış ve üzerlerine 2'şer µL marker boya çözeltisi

(Çizelge 3.3) ilave edilmiştir. Daha sonra, hazırlanan örnekler mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 85 voltta 1.5-2.0 saat süreyle yapılmıştır. Süre sonunda güç kaynağı kapatılmış ve ortamdan alınan jel, kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış 0.2 µg/mL etidyum bromit (Amresco, Solon, Ohio, Amerika Birleşik Devletleri) içeren çözeltisinde 45 dakika boyanmıştır. Boyama işlemi sonunda jeller, ultraviyole ışık altında incelenmiş ve jel fotoğraflarının çekiminde Nikon D-5100 dijital fotoğraf makinası (Nikon Co., Japonya) kullanılmıştır.

Tris-Asetat Tamponu (1X)

Tris	4.84	g
Sodyum asetat	4.08	g
EDTA	0.37	g
Destile su	1000	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Marker Boya

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

3.2.2. Koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarında enterotoksin genlerinin multipleks-PZR ile araştırılması

Koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarında 18 adet enterotoksin geninin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *sels* ve *tst1*) varlığı Çizelge 3.2' de verilen PZR karışımı kullanılarak multipleks-PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Multipleks-PZR işlemi Techne TC3000 (Cambridge, İngiltere) termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Multipleks-PZR denemelerinde kullanılan PZR karışımı

Madde adı	Hacim
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo #F-548L, Litvanya)	10 µL
Primer takımı	5 µL
Genomik DNA	1.5 µL
Nükleaz içermeyen H ₂ O	3.5 µL
Toplam hacim	20 µL

Enterotoksin genlerinin varlığının tespitinde kullanılan spesifik primerler ve ürün büyüklükleri Çizelge 3.3' te verilmiştir. Multipleks-PZR denemelerinde 4 takım primer (Takım 1: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*; Takım 2: *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selp*; Takım 3: *selk*, *selm*, *selo*, *tst-1*; Takım 4: *sell*, *seln*, *selq*, *selr*) karışımı kullanılmıştır. Primer takımları her bir primerden 2 µM konsantrasyon içerecek şekilde 10X konsantrasyonda hazırlanmıştır (Omeo vd., 2005). PZR koşulları enterotoksin *seg* ve *sei* geni içeren *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak optimize edilmiştir. Denemelerde; 1 döngü 95 °C' de 120 saniye başlangıç denatürasyonu, 35 döngü 95 °C' de 30 saniye / 57 °C' de 90 saniye / 72 °C' de 90 saniye çoğaltma ve 1 döngü 72 °C' de 10 dakika son uzama aşamalarından oluşan PZR protokolü uygulanmıştır. Denemelerde *S. aureus* ATCC 25923 suşu (*seg*⁺ ve *sei*⁺) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Enterotoksin genlerinin tespitinde kullanılan primerler ve PZR ürün büyüklükleri (Omeo vd., 2005).

Gen	Primer	Oligonükleotid sekansı (5' - 3')	PZR Ürünü (bp)
<i>sea</i>	SEA-3	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG	127
	SEA-4	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	
<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAACGACAAACG	477
	SEB-4	GCAGGTACTCTATAAAGTGCCTGC	
<i>sec</i>	SEC-3	CTCAAGAACTAGACATAAAAGCTAGG	271
	SEC-4	TCAAAATCGGATTAACATTATCC	
<i>sed</i>	SED-3	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG	319
	SED-4	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC	
<i>see</i>	SEE-3	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	178
	SEE-2	TAACCTACCGTGGACCCTTC	
<i>seg</i>	SEG-1	AAGTAGACATTTTTGGCGTTCC	287
	SEG-2	AGAACCATCAAACCTCGTATAGC	
<i>seh</i>	SEH-1	GTCTATATGGAGGTACAACACT	213
	SEH-2	GACCTTTACTTATTTGCTGTC	
<i>sei</i>	SEI-1	GGTGATATTGGTGTAGGTAAC	454
	SEI-2	ATCCATATTCTTTGCCTTTACCAG	
<i>selj</i>	SEJ-1	ATAGCATCAGAACTGTTGTTCCG	152
	SEJ-2	CTTTCTGAATTTTACCACCAAAGG	
<i>selk</i>	SEK-1	TAGGTGTCTCTAATAATGCCA	293
	SEK-2	TAGATATTGTTAGTAGCTG	
<i>sell</i>	SEL-1	TAACGGCGATGTAGGTCCAGG	383
	SEL-2	CATCTATTTCTTGTCGGTAAC	
<i>selm</i>	SEM-1	GGATAATTCGACAGTAACAG	379
	SEM-2	TCCTGCATTAAATCCAGAAC	
<i>seln</i>	SEN-1	TATGTTAATGCTGAAGTAGAC	282
	SEN-2	ATTTCCAAAATACAGTCCATA	
<i>selo</i>	SEO-1	TGTGTAAGAAGTCAAGTGTAG	214
	SEO-2	TCTTTAGAAATCGCTGATGA	
<i>selp</i>	SEP-3	TGATTTATTAGTAGACCTTGG	396
	SEP-4	ATAACCAACCGAATCACCAG	
<i>selq</i>	SEQ-1	AATCTCTGGGTCAATGGTAAGC	122
	SEQ-2	TTGTATTCGTTTTGTAGGTATTTTCG	
<i>selr</i>	SER-1	GGATAAAGCGGTAATAGCAG	166
	SER-4	GTATTCCAAACACATCTAAC	
<i>tst1</i>	TST-3	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	447
	TST-6	ATCGAACTTTGGCCCATACTTT	

Çoğaltılan enterotoksin genlerinin PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi Thermo OWL EASYCAST B2 cihazında % 2 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Multipleks-PZR ürünlerine 2'şer µL yükleme boyası (Orange DNA Loading

Dye, Thermo #R0631, Litvanya) ilave edilmiştir. Daha sonra, hazırlanan örneklerden 15'er µL mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 85 voltta 1.5-2.0 saat süreyle yapılmıştır. Jeller kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış etidyum bromit (0.2 µg/mL) içeren çözeltisinde 45 dakika boyanmıştır. Fragment büyüklükleri O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Fermentas #SM1153, Litvanya) kullanılarak hesaplanmıştır. Jel fotoğraflarının çekiminde Nikon D-5100 dijital fotoğraf makinası (Nikon Co., Japonya) kullanılmıştır.

3.2.3. Koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarında enterotoksin genlerinin PZR ile araştırılması

Multipleks-PZR denemeleri sonucu zayıf PZR bandı verdiği tespit edilen örneklerle kontrol amacıyla aynı primerler kullanılarak tekli PZR uygulanmıştır. Enterotoksin genlerinin tekli PZR ile çoğaltılması için kullanılan PZR karışımı Çizelge 3.4' te verilmiştir. PZR denemelerinde; Omeo vd. (2005) tarafından önerilen protokolde kısmi değişiklikler yapılarak 1 döngü 94 °C' de 120 saniye başlangıç denatürasyonu, 30 döngü 94 °C' de 30 saniye / 55 °C' de 30 saniye / 72 °C' de 60 saniye çoğaltma ve 1 döngü 72 °C' de 10 dakika son uzama aşamalarından oluşan protokol uygulanmıştır. Çoğaltılan enterotoksin PZR fragmentlerinin elektroforezi Thermo OWL EASYCAST B2 tankında % 2 agaroz (w/v) oranı ile hazırlanan jellerde yapılmış ve fragmentlerin büyüklüğü O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Fermentas #SM1153, Litvanya) kullanılarak hesaplanmıştır.

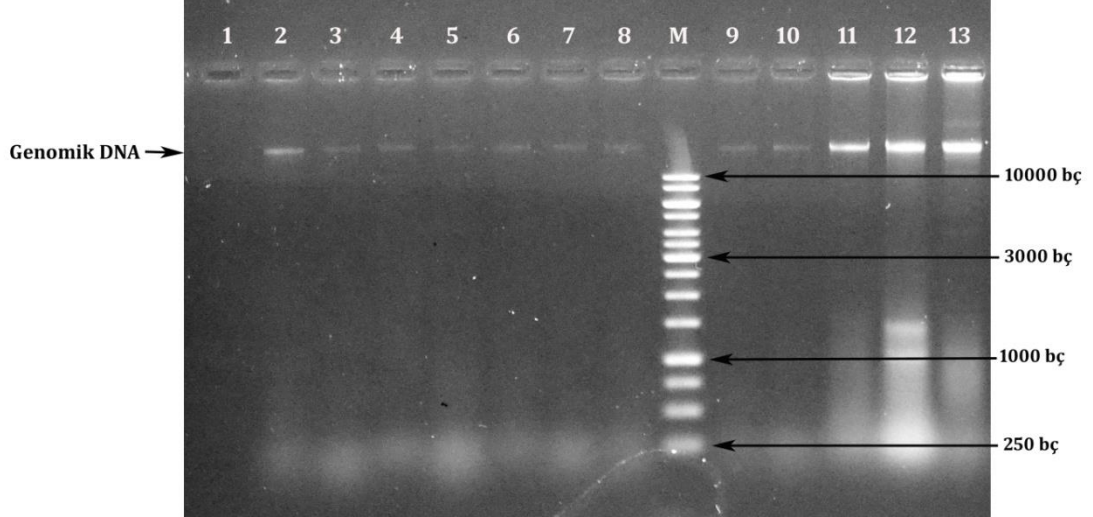
Çizelge 3.4. Tekli-PZR'da kullanılan PZR karışımı.

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

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Genomik DNA İzolasyonu

Yapılan tez çalışmasında, doğal fermente sucuk örneklerinden Geniş (2015) tarafından izole edilen ve 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanısı yapılan 51 adet koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve 10 adet *M. caseolyticus* suşu kullanılmıştır. 61 adet suştan genomik DNA izolasyonu Cancilla vd. (1992) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA örneklerinin elektroforezi % 1 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde tris-asetat tampon içerisinde yapılmıştır. Elektroforez işlemi sonrası jeller etidyum bromit ile boyanmış ve UV ışık altında incelenmiştir. Jel fotoğraflarının çekiminde Nikon D-5100 dijital fotoğraf makinesi kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyonu yapılan koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarının genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarının genomik DNA örnekleri.

- | | |
|------|---|
| 1 | Negatif kontrol (su) |
| 2-13 | Koagülaz-negatif <i>Staphylococcus</i> ve <i>M. caseolyticus</i> suşlarının genomik DNA örnekleri |
| M | O'GeneRuler DNA Marker (bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 |

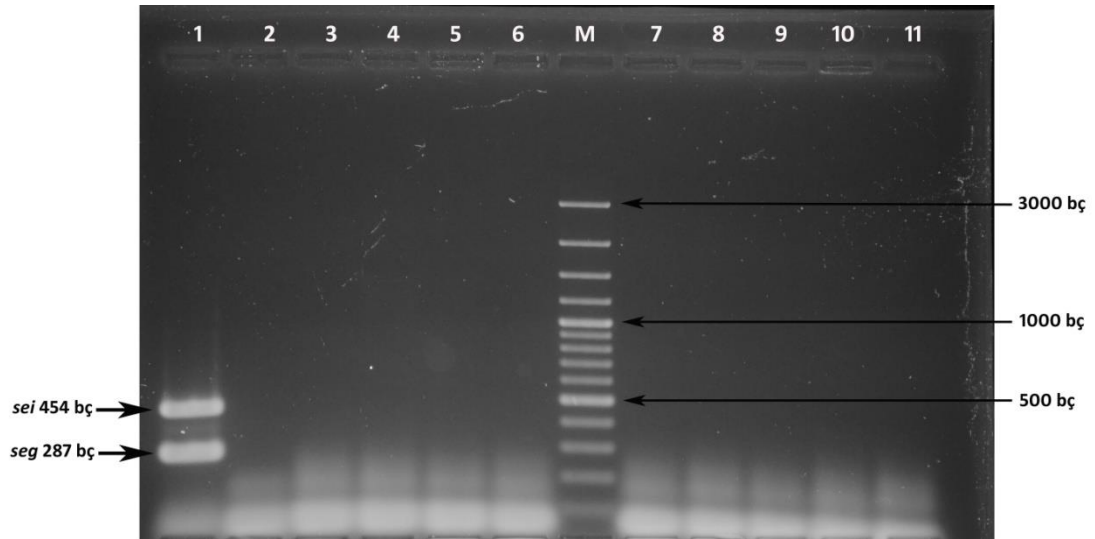
4.2. Koagülaz-Negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* Suşlarında Enterotoksin Genlerinin PZR ile Araştırılması

Gram-pozitif, katalaz-pozitif, koagülaz-negatif koklar geleneksel yöntemlerle üretilen doğal fermente et ürünlerinden sıklıkla izole edilmektedirler. Geçmiş yıllarda yapılan çeşitli çalışmalar ile fermente sosislerden koagülaz-negatif *Staphylococcus* (Mauriello vd., 2004; Kaban ve Kaya, 2008b; Kozačinski vd., 2008; Resch vd., 2008; Bonomo vd., 2009; Coton vd., 2010; Marty vd., 2012a, b; Cachaldora vd., 2013; Landeta vd., 2013; Zdolec vd., 2013; Kesmen vd., 2014) ve *Macroccoccus caseolyticus* (Blaiotta vd., 2004; Lacumin vd., 2012; Busconi vd., 2014; Kesmen vd., 2014) suşlarının izole edildiği bildirilmiştir.

Gram-pozitif, katalaz pozitif, koagülaz-negatif koklar nitratı nitrite indirgeyerek renk oluşumunda ve stabilizasyonunda görev almalarının yanı sıra lipolitik ve proteolitik aktiviteleri sonucu peptit, aminoasit, aldehit, amin ve serbest yağ asitleri gibi düşük molekül ağırlıklı bileşenleri oluşturarak ürüne has tekstür ve karakteristik tat ve aromanın oluşmasında da etkin rol oynamaktadırlar. Bunların yanı sıra, et fermentasyonlarında aktif rol oynayan bir diğer bakteri grubu olan LAB'nin ürettiği bir metabolit ve okside edici ajan olan hidrojen peroksiti, Gram-pozitif, katalaz pozitif, koagülaz-negatif koklar ürettikleri katalaz enzimi ile parçalayarak ürünün aroma, renk ve raf ömrünün korunmasını da sağlamaktadırlar (Hammes ve Knauf, 1994; Rantsiou ve Cocolin, 2006; Kurt, 2009). Gram-pozitif, katalaz pozitif, koagülaz-negatif kokların fermente et ürünlerinde oynadıkları bu önemli rolün yanı sıra, çeşitli kaynaklardan izole edilen bazı üyelerinin enterotoksin üreterek tüketici sağlığı açısından risk oluşturdukları da yapılan çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Carmo vd. 2004; Veras vd. 2008; Zell vd. 2008).

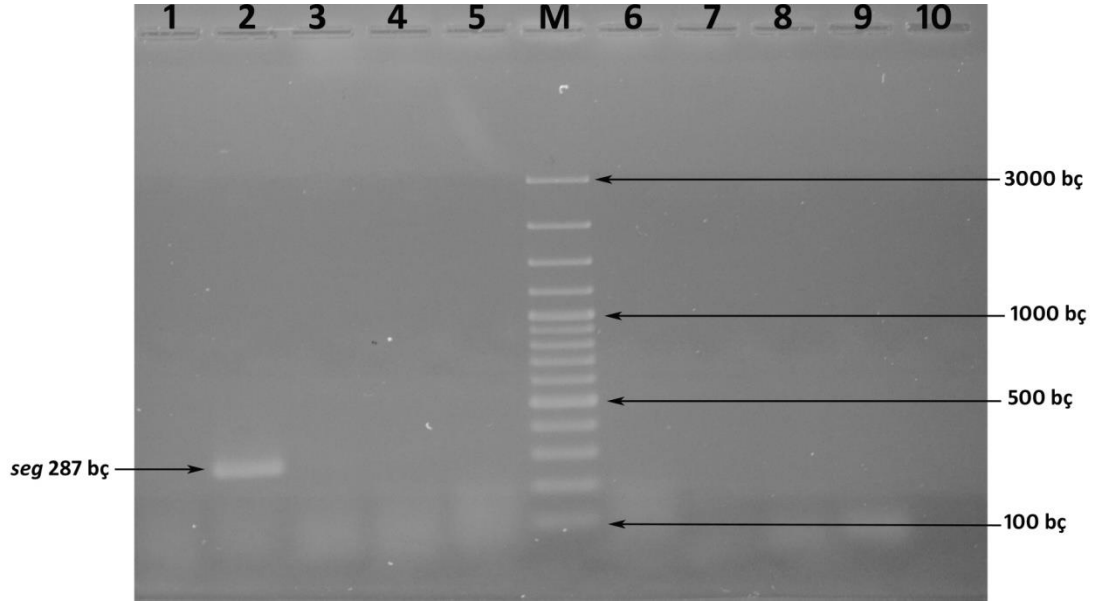
Tez çalışması kapsamında, starter kültür kullanılmadan üretilen doğal fermente sucuk örneklerinden izole edilen 51 adet koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve 10 adet *M. caseolyticus* suşunda 18 adet enterotoksin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr* ve *tst1*) yapısal geninin varlığı 4 takım primer karışımı kullanılarak multipleks-PZR yöntemi ile ve araştırılmıştır. Multipleks-

PZR denemeleri sonucu zayıf PZR bandı verdiği tespit edilen örneklere kontrol amacıyla aynı primerler kullanılarak tekli PZR uygulanmıştır. Multipleks-PZR ve tekli PZR denemeleri sonucu koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarından hiçbirinde enterotoksin yapısal geninin varlığı tespit edilmemiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarında takım 2 (*seg, seh, sei, selj, selp*) primer karışımı kullanılarak yapılan multipleks-PZR denemesi.

1	<i>S. aureus</i> ATCC25923 (pozitif kontrol)	: 287 kb ve 454 kb
2	Negatif kontrol (su)	: -
3	<i>S. saprophyticus</i> BYS1	: -
4	<i>S. saprophyticus</i> BYS2	: -
5	<i>S. saprophyticus</i> BYS3	: -
6	<i>M. caseolyticus</i> BYS4	: -
M	O'GeneRuler DNA Marker (bç)	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100
7	<i>S. saprophyticus</i> BYS5	: -
8	<i>S. saprophyticus</i> BYS6	: -
9	<i>S. cohnii</i> BYS7	: -
10	<i>S. sciuri</i> BYS8	: -
11	<i>S. saprophyticus</i> BYS9	: -



Şekil 4.3. Multipleks-PZR ile zayıf bant veren bazı koagülaz-negatif *Staphylococcus* suşlarında *seg* geninin PZR ile kontrolü.

1	Negatif kontrol (su)	: -
2	<i>S. aureus</i> ATCC25923 (pozitif kontrol)	: 287 kb
3	<i>S. hominis</i> BYS27	: -
4	<i>S. xylosus</i> BYS35	: -
5	<i>S. xylosus</i> BYS36	: -
M	O'GeneRuler DNA Marker (bç)	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100
7	<i>S. saprophyticus</i> BYS42	: -
8	<i>S. epidermidis</i> BYS43	: -
9	<i>S. epidermidis</i> BYS44	: -
10	<i>S. sciuri</i> BYS45	: -

Enterotoksijenik stafilokoklara en fazla kırmızı et, kanatlı eti, balık eti ve ürünleri ile süt ve ürünleri gibi proteince zengin hayvansal kaynaklı gıdalarda rastlanılmaktadır (Erol ve İşeri 2004). Son yıllarda hem PZR hem de PZR ve/veya DNA mikroarray teknolojisi kullanılarak yapılan bu çalışmalarda da et ürünleri, süt ve peynirlerden izole edilen koagülaz-negatif stafilokoklarda stafilokokal enterotoksinlerin nadiren bulunduğu gösterilmiştir (Rosec vd., 1997; Blaiotta vd., 2004; Even vd., 2010; Seitter vd., 2011; Dobranić vd., 2013; Piechote vd., 2014; Aye vd., 2014; Bertelloni vd.,

2015). Farklı araştırmacılar tarafından gıda kaynaklı koagülaz-negatif stafilocokların stafilocokal enterotoksin üretim özelliklerinin araştırıldığı bu çalışmalar tez bulgularını desteklenmektedir. Rosec vd. (1997), farklı gıdalardan izole ettikleri 51 adet koagülaz-negatif stafilocok suşunun hiçbirinin SEA, SEB, SEC, SED ve SEE üretmediğini bildirmişlerdir. Blaiotta vd. (2004) et ve süt ürünlerinden izole ettikleri koagülaz-negatif *Staphylococcus* (84 adet) ve *M. caseolyticus* (2 adet) suşlarının hiçbirinin *seA*, *seB*, *seC*, *seD*, *seE*, *seG*, *seH*, *seI*, *seJ*, *seM*, *seN*, *seO* ve *tst1* genlerini içermediğini rapor etmişlerdir. Even vd. (2010), peynir ve kuru fermente sosislerden izole ettikleri 129 adet koagülaz-negatif *Staphylococcus* suşundan sadece 1 adedinin (*S. saprophyticus*) *sec* geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda gıda kaynaklı koagülaz-negatif *Staphylococcus* suşlarının stafilocokal enterotoksin üretimi açısından düşük risk içerdiğini bildirmişlerdir. Seitter vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada *S. equorum*, *S. xylosus* ve *S. carnosus* türlerini içeren 32 adet koagülaz-negatif stafilocok suşunun hiçbirinin stafilocokal enterotoksin geni içermediği tespit edilmiştir. Benzer olarak, iki farklı geleneksel Hırvat fermente sosisinden izole edilen 39 adet koagülaz-negatif *Staphylococcus* suşunda 13 adet enterotoksin geninin (*sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *sei*, *tst1*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, *sem*, *sen* ve *seo*) varlığının PZR ile araştırıldığı bir çalışmada suşların hiçbirinin enterotoksin geni içermediği tespit edilmiştir (Dobranić vd., 2013).

Tezde elde edilen bulguların aksine, farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda çeşitli gıdalardan ve gıda üretiminde çalışan işçilerin ellerinden izole edilen bazı koagülaz-negatif stafilocok türlerinin stafilocokal enterotoksin genlerine sahip olduğu gösterilmiştir (Vernozy-Rozand vd., 1996; Rodriguez vd., 1996; Udo vd., 1999; Cunha vd., 2006; Rall vd., 2010; Guimarães vd., 2013). Vernozy-Rozand vd. (1996), süt ürünlerinden izole ettikleri *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. capitis*, *S. lentus* ve *S. gallinarum* türlerinin, Rodriguez vd. (1996) de etten izole ettikleri *S. xylosus* ve *S. cohnii* türlerinin enterotoksin geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Udo vd. (1999), gıda üretiminde çalışan işçilerin ellerinden stafilocokal enterotoksin ve/veya *tst1* geni içeren *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. warneri* ve *S. schleiferi* gibi koagülaz-negatif stafilocok suşları izole ettiklerini bildirmişlerdir. Cunha vd. (2006), Brezilya'nın Botucatu şehrinde bulunan market ve

şarküterilerden topladıkları farklı gıda örneklerinden izole edip biyokimyasal yöntemlerle tür düzeyinde tanısını yaptıkları 20 adet koagülaz-negatif stafilokok suşunda enterotoksin genlerinin varlığını araştırdıkları çalışmalarında, izole ettikleri suşlardan 4 adedinin enterotoksin geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar 3 adet suşun *sea* geni, 1 adet suşun ise *sec* geni içerdiğini bildirmişlerdir. Ters pasif lateks aglutinasyon yöntemi ile enterotoksin üretimi araştırılmış ancak enterotoksin geni içerdiği tespit edilen 4 adet suştan hiçbirinin enterotoksin üretmediği belirlenmiştir. Rall vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, Brezilya'da üretilen Minas peynirinden izole edilen 65 adet koagülaz-negatif stafilokok suşunun % 26.2'sinin enterotoksin geni içerdiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, % 18.5 ile en sık rastlanan genin *sea* geni olduğu tespit edilmiştir. *sea* genini sırasıyla % 4.6 bulunma sıklığı ile *sec* ve % 3.1 ile *seb* genleri izlemektedir. Ancak, enterotoksin geni içerdiği tespit edilen suşların hiçbirinin *in vitro* koşullarda enterotoksin üretmediği belirlenmiştir. Guimarães vd. (2013), mastitis test sonuçları pozitif olan sütlerden izole ettikleri 128 adet koagülaz-negatif stafilokok suşundan 85 adedinin (% 66) enterotoksin geni içerdiğini rapor etmişlerdir. İzolatlarda *sea*, *seb* ve *sec* genlerinin daha yüksek sıklıkla bulunduğu saptanmıştır. Piechota vd. (2014), mastitisli, mastitissiz inek sütlerinden ve ahır ortamından izole ettikleri 185 *Staphylococcus* izolatının 22 adedinin (% 13) KNS olduğunu ve bu KNS izolatlarının % 68 *sec*, % 18 *seb* ve *sed*, % 13.6 *see* ve % 4.5 *sea* geni bulunduğunu bildirmişlerdir. Aye vd. (2014), 385 gıda örneğinden 62 adet (% 16) *Staphylococcus* suşu izole etmişlerdir. İzole edilen bu 62 suşun 49'u (% 79) KNS olarak bulunmuş ve sadece çilekten izole edilen *Staphylococcus lugdunensis* suşuna ait pozitif *sec* geni tespit edilmiş ve hiçbir KNS suşunun TSST-1 üreticisi olmadığı bildirilmiştir. Bertelloni vd. (2015), Tuscan, İtalya'da bulunan 3 çiftlikten süt toplama tanklarından tedarik ettikleri 120 süt örneğinden izole ettikleri 74 adet koagülaz-negatif stafilokok izolatında *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* ve *tst-1* genlerinin varlığını araştırdıkları çalışmalarında, izolatların 40 (% 54.1) adedinin en az bir enterotoksin geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar 25 izolatın sadece bir enterotoksin geni, 15 adet izolatın ise 2 veya daha fazla sayıda enterotoksin geni içerdiğinin rapor etmişlerdir. *seb* ve *sed* genlerinin hiçbir izolatta tespit edilmediği bildirilmiştir. Enterotoksin genleri arasında en sık rastlanan genin *sea* geni olduğu bunu *sec-1* geninin izlediği

belirlenmiştir. 74 adet izolattan 31 adedinin *sea* geni, 19 adedinin ise *sec-1* geni içerdiğini saptamışlardır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Proteince zengin bir gıda olan sucuktan izole edilen koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarının enterotoksin üretim yeteneklerinin araştırılması tüketici sağlığı açısından mevcut riskin ortaya konulması adına önem arz etmektedir. Bu nedenle tez çalışması kapsamında 18 adet enterotoksin geninin varlığının araştırıldığı koagülaz-negatif *Staphylococcus* (51 adet) ve *M. caseolyticus* (10 adet) suşlarının hiçbirinde enterotoksin yapısal geninin tespit edilmemiş olması bir avantajdır. Araştırmalar sonucu elde edilen sonuçlar doğrultusunda gıda kaynaklı koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *M. caseolyticus* suşlarının stafilokokal enterotoksin üretimi açısından düşük risk içerdiği tespit edilmiştir.

Stafilokok kontaminasyonun en önemli nedeni insanlardır. Bunun sebebi deri ve mukozanın stafilokok taşıyıcısı olmasıdır. Stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmelerini önlemek için öncelikli olarak, üretim ortamlarının temizlik ve hijyenlerine dikkat etmek, üreticileri bu konuda bilgilendirmek ve personel hijyenini sağlamak gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Alperden, İ., Nazlı, B., 1998. Gıda Teknolojisinde Starter Kültürlerin Önemi. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15, 97-108.
- Anar, Ş., 1997. Fermente Et Ürünlerinde Kullanılan Starter Kültürler ve Başlıca Fonksiyonları. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1, 155-164.
- Anonim, 2012. Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği, Ek Et ve Et Ürünleri Tebliği.
- Argudin, M.A., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. Toxins, 2(7), 1751-1773.
- At, C., 1999. Staphylococcus. Ustaçelebi, Ş. (Ed.), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji İçinde (339-346), Güneş Kitabevi, 1339s, Ankara.
- Axelsson, L., 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Salminen, S. and von Wright, A. (Eds.), Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects. Second Edition. Revised and Expanded (1-72). Marcel Dekker, INC, 617p, New York.
- Aye, R., Gautam, A., Reyaz, A., Vinson, H., Gibbs, P.S., Barigye, R., 2014. Evaluation of Selected Toxigenic Genes and Antimicrobial Agent Susceptibility in *Staphylococcus* spp. Isolated from Foods Purchased from North Dakota Grocery Stores. Journal of Food & Nutritional Disorders, 3(3), 5.
- Baba, T., Kuwahara-Arai, K., Uchiyama, I., Takeuchi, F., Ito, T., Hiramatsu, K., 2009. Complete Genome Sequence of *Micrococcus caseolyticus* Strain JCS5402, Reflecting the Ancestral Genome of the Human-Pathogenic Staphylococci. Journal of Bacteriology, 191, 1180-1190.
- Bannerman TL., 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and Other Catalase-Positive Cocci that Grow Aerobically. In Murray, PR., Baron, EJ., Jorgensen, JH., Tenover, FC., Tenover, R.H. (Eds.), Manual of Clinical Microbiology (384-404). American Society for Microbiology, 2113p, Washington.
- Barber, B.M., 1914. Milk Poisoning due to a Type of *Staphylococcus albus* Occurring in the Udder of a Healthy Cow. The Philippine Journal of Science, 9, 515-519.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R., 1983. Detection and Activity of Lactacin B, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology, 45, 1808-1815.
- Barefoot, S.F., Nettles, C. G., 1993. Antibiosis Revisited: Bacteriocins Produced by Dairy Starter Cultures. Journal of Dairy Science, 76, 2366-2379.

- Bennett, R.W., Notermans, S., Tatini, S.R., 1999. In Vanderzant, C., Splittstoessa, D.F., (Eds.), *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods* (551-592). American Public Health Association, 1250, Washington.
- Bergdoll, M.S., 1971. Identification of Enterotoxin E. *Infection and Immunity*, 4, 5593-5595.
- Bergdoll, M.S., Chesney, P.J., 1991. *Toxic Shock Syndrome*. CRC Press, 234, Boca Raton.
- Bertelloni, F., Fratini, F., Ebani, V.V., Galiero, A., Turchi, B., Cerri, D., 2015. Detection of Genes Encoding for Enterotoxins, TSST-1 and Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci from Bovine Bulk Tank Milk. *Dairy Science & Technology*, 95, 341-352.
- Biology News, 2011. Flu and MRSA, A Deadly Connection. Erişim Tarihi: 21.07.2015. http://www.macroevolution.net/flu-and-mrsa.html#.Va6toZAfz_V
- Blaiota, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R., Parente, E., 2004. Diversity and Dynamics of Communities of Coagulase-Negative Staphylococci in Traditional Fermented Sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 271-284.
- Bonomo, M.G., Ricciardi, A., Zotta, T., Sico, M.A., Salzano, G., 2009. Technological and safety Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci From Traditionally Fermented Sausages of basilicata Region (Southern Italy). *Meat Science*, 83(1), 15-23.
- Bozkurt, H., Erkmen, O., 2004. Effect of Temperature, Humidity and Additives on The Formation of Biogenic Amines in Sucuk During Ripening and Storage Periods. *Food Science and Technology International*, 10, 21–28.
- Busconi, M., Zacconi, C., Scolari, G., 2014. Bacterial Ecology of PDO Coppa and Pancetta Piacentina at the end of Ripening and After MAP Storage of Sliced Product. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 13-20.
- Carmo, L.S.D., Cummings, C., Linardi, V.R., Dias, R.S., Souza, J.M.D., Sena, M.J.D., Santos, D.A.D., Shupp, J.W., Pereira, S.R.K., Jett, M., 2004. A Case Study of Massive Staphylococcal Food Poisoning Incident. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1(4), 241-246.
- Cachaldora, A., Fonseca, S., Franco, I., Carballo, J., 2013. Technological and Safety Characterization of Staphylococcaceae Isolated from Spanish Traditional Dry-Cured Sausages. *Food Microbiology*, 33, 61-68.

- Cancilla, M.R., Powell, L.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.
- Cheung, A.L., Koomey, J.M., Butler, C.A., Projan, S.J., Fischetti, V.A., 1992. Regulation of Exoprotein Expression in *Staphylococcus aureus* by a Locus (sar) Distinct from agr. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 89, 6462-6466.
- Cogan, T.M., 1996. History and Taxonomy of Starter Cultures in Dairy Starter Cultures. Wiley-VCH, 1-25.
- Coşansu, S., Ayhan, K., 1998. Fermente Et Ürünlerinde Starter Kullanımı ile Patojenlerin İnhibisyonu. *Gıda*, 23(2), 99-103.
- Coton, E., Desmonts, M.-H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christeans, S., Donnio, P.-Y., Lebert, I., Talon, R., 2010. Biodiversity of Coagulase-Negative Staphylococci in French Cheeses, Dry Fermented Sausages, Processing Environments and Clinical Samples. *International Journal of Food Microbiology* 137, 221–229.
- Cunha, M.L.R.S., Peresi, E., Calsolari, R.A.O., Araújo J.P., Braz, Jr., 2006. Molecular Detection of Enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Clinical Samples of Newborns in Brazil. *Journal Microbiology*, 37, 64-69.
- Cunha, M.L.R.S., Calsolari, R.A.O., Júnior, J.P.A., 2006. Toxigenic Capacity of Oxacillin Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Newborns in Brazil. *Simposio Internacional S. aureus Meticilino Resistente Adquirido en la Comunidad, Un Problema Global. Simposio Satélite Infecciones por S. aureus Meticilino Resistente Hospitalario*, 17-18.
- Crass, B.A., Bergdoll, M.S., 1986. Involvement of Coagulase-Negative Staphylococci in Toxic Shock Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 23, 43-45.
- Çon, A.H., 1995. Sucuktan Bakteriosin Benzeri Antimikrobiyal Metabolit Üreten Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu ve Çeşitli Gıda Zararlısı ve/veya Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilere Karşı Antagonistik Aktivite Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 78s, Erzurum.
- Dack, G.M., Cary, W.E., Wollpert, O., Wiggins, H.J., 1930. An Outbreak of Food Poisoning Proved to be due to A Yellow Haemolytic *Staphylococcus*. *Journal Preventive Medicine*, 4, 167-175.

- Danacioğlu Ö., 2013. Fermente Et Ürünleri İşleme Teknolojisi. Erişim Tarihi: 26.03.2014. <http://gidamuhendisi.tripod.com/FERMENTE.HTM>.
- Dobranić, V., Zdolec, N., Račić, I., Vujnović, A., Zdelar-Tuk, M., Filipovi I., Grgurevi N., Špičić, S., 2013. Determination of Enterotoxin Genes in Coagulase-Negative Staphylococci from Autochthonous Croatian Fermented Sausages. *Veterinary Archives*, 83 (2), 145-152.
- Dobrogosz, W. J., Peacock, T. J., Hassan, H. M., 2010. Evolution of The Probiotic Concept from Conception to Validation and Acceptance in Medical Science. *Advances in Applied Microbiology*, 72, 1-41.
- Dossmann, M.U., Vogel, R.F., Hammes, W.P., 1996. Mathematical Description of the Growth of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus pentosus* under Conditions Prevailing in Fermented Sausages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 334–339.
- Drinan, D.F., Tobin, S., Cogan, T.M., 1976. Citric Acid Metabolism in Hetero and Homofermentative Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, 481-486.
- Endl, J., Seidl, H. P., Fiedler, F., Schleifer, K.-H., 1983. Chemical Composition And Structure of Cell Wall Teichoic Acids of Staphylococci. *Archives Microbiology* 135, 215–223.
- Erdoğan, Ö., Ergün, Ö., 2005. Kahramanmaraş Piyasasında Tüketilen Sucukların Bazı Fiziksel, Kimyasal, Duyusal ve Mikrobiyolojik Özellikleri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 31 (1), 55-65.
- Erol, İ., İşeri, Ö., 2004. Stafilokokal Enterotoksinler. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 51, 239-245.
- Evans, J.B., Bradford, W.L.J., Niven, C.F., 1995. Comment Concerning The Taxonomy of the Genera *Micrococcus* and *Staphylococcus*. *International Bulletin Bacteriology Nomenclature Taxonomy*, 5, 61-66.
- Even, S., Leroy, S., Charlier, C., Nauaille, S., Zakour, N.L., Cretenet, M., Cousin, F.J., Gautier, M., Cocaing-Bousquet, M., Loubiere, P., Le Loir, Y., 2009. *Staphylococcus aureus* Virulence Expression is Impaired by *Lactococcus lactis* in Mixed Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4459-4472.
- Even, S., Leroy, S., Charlier, C., Zakour, N.B., Chacornac, J.P., Lebert, I., Jamet, E., Desmonts, M.H., Coton, E., Pochet, S., Donnio, P.Y., Gautier, M., Talon, R., Le Loir, Y., 2010. Low Occurrence of Safety Hazards in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Fermented Foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 87–95.

- Evenson, M.L., Hinds, M.W., Bernstein, R.S., Bergdoll, M.S., 1988. Estimation of Human Dose of Staphylococcal Enterotoksin A from a Large Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Involving Chocolate Milk. *International Journal Food Microbiology*, 7, 311.
- Garcia-Varona, M., Santos, E.M., Jaime, I., Rovira, J., 2000. Characterisation of Micrococcaceae Isolated from Different Varieties of Chorizo. *International Journal of Food Microbiology*, 54 (3), 189–195.
- Geniş, B., 2015. Fermente Sucuktan İzole Edilen Koagülaz-Negatif *Staphylococcus* ve *Macrococcus caseolyticus* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının ve Dekarboksilasyon Aktivitelerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 74s, Isparta.
- Gönülalan, Z., Arslan, A., Köse, A., 2004. Effects of Different Starter Culture Combinations on Fermented Sausages. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(1), 7–16.
- Gök, V., 2006. Antioksidan Kullanımının Fermente Sucukların Bazı Kalite Özellikleri Üzerine Etkileri, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Gökalp, H.Y., 1982. Değişik Olgunlaşma Sıcaklıklarında Farklı Starter Kültürleri Uygulayarak Türk Tipi Sucuk Üretimi. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Doçentlik Tezi, 178s, Erzurum.
- Gökalp, H.Y., 1986. Residual NO₃, NO₂, Carbonyl and TBA Values of Turkish Soudjouk Manufactured by Adding Different Starter Cultures and Using Different Ripening Temperatures. *Journal of Food Technology*, 21, 615-625.
- Gökalp, H.Y., 1995. Fermente Et Ürünleri, Sucuk Üretim Teknolojisi. Standart, Geleneksel Türk Et Ürünleri Özel Sayısı, Ağustos, 48–55.
- Götz, F., Bannerman, T., Schliefer, K.H., 2006. The Genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. *Prokaryotes*, 4, 5-75.
- Greig, J. D., Todd, E.C., Bartleson, C.A., Michaels, B.S., 2007. Outbreaks Where Food Workers Have Been Implicated in The Spread Of Foodborne Disease. Part 1. Description of The Problem, Methods, and Agents Involved. *Journal of Food Protection*, 70, 1752-1761.
- Guimarães, F.F., Nóbrega, D.B., Richini-Pereira, V.B., Marson, P.M., Pantoja, J.C.F., Langoni, H., 2013. Enterotoxin Genes in Coagulase-Negative and Coagulase-Positive Staphylococci Isolated from Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 96, 2866-2872.

- Gustafson, J.E., Wilkinson, B.J., 2005. *Staphylococcus aureus* as a Food Pathogen: The Staphylococcal Enterotoxins and Stress Response Systems. In Griffiths M. (Ed.), *Understanding Pathogen Behaviour in Food: Virulence, Stress Response and Resistance* (331-357). CRC Press, 611p, Boca Raton, USA.
- Hammes, W.P., Knauf, H.J., 1994. Starters in The Processing of Meat Products. *Meat Science*, 36, 155-168.
- Hammes, W.P., Hertel, C., 1998. New Developments in Meat Starter Cultures. *Meat Science*, 49, 125-138.
- Hampikyan, H., 2006. Fermente Sucuklarda Nisin Kullanımının *Listeria monocytogenes* Üzerine Etkileri. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 148s, İstanbul.
- Hoppe-Seyler, T.S., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W.H., Geis, A., Heller, K.J., 2004. Molecular Identification and Differentiation of *Staphylococcus* Species and Strains of Cheese Origin. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 211–218.
- Hu, D..L., Omoe, K., Shimoda, Y., Nakane, A., Shinagawa, K., 2003. Induction of Emetic response to Staphylococcal Enterotoxins in the House Musk Shrew (*Suncus murinus*). *Infection and Immunity*, 71, 567-570.
- Hu, D. L., Zhu, G., Mori, F., Omoe, K., Okada, M., Wakabayashi, K., 2007. Staphylococcal Enterotoxin Induces Emesis Through Increasing Serotonin Release in Intestine and It Is Downregulated by Cannabinoid Receptor 1. *Cellular Microbiology*, 9, 2267-2277.
- Hugas, M. And Monfort, J.M., 1997. Bacterial Starter Cultures for Meat Fermentation. *Food Chemistry*, 59, 4, 547-554.
- Hughes, M., Monfort, J.M., 1997. Bacterial Starter Cultures for Meat Fermentation. *Food Chemistry*, 59, 547–554.
- Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D., Cliver, D.O., 1994. *Foodborne Disease Handbook-Diseases Caused by Bacteria*. Marcel Dekker, 613p, New York.
- Hutkins, R.W., 2006. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, 488p, Nebraska-Lincoln.
- Juven, B. J., Meinersmann, R. J., Stern, N. J., 1991. Antagonistic Effects of Lactobacilli and Pediococci to Control Intestinal Colonization by Human Enteropathogens in Live Poultry. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 95-103.

- Juven, B. J., Schved, F., Lindner, P., 1992. Antagonistic Compounds Produced by a Chicken Intestinal Strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Protection*, 55, 157-161.
- Kaban, G., 2007. Geleneksel Olarak Üretilen Sucuklardan Laktik Asit Bakterileri ile Katalaz Pozitif Kokların İzolasyonu-İdentifikasyonu, Üretimde Kullanılabilme İmkanları ve Uçucu Bileşikler Üzerine Etkileri. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 116s, Erzurum.
- Kaban, G., Kaya, M., 2008b. Identification of Lactic Acid Bakteria and Gram-Positive Catalase-Positive Cocci Isolated from Naturally Fermented Sausage (Sucuk). *Journal of Food Science*, 73, 385-388.
- Kaban, G., Kaya, M., 2009. Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xylosus* on The Quality Characteristics of Dry Fermented Sausage "Sucuk". *Journal of Food Science*, 72, 1, 58-63.
- Kahler, R.C., Boyce, J.M., Bergdoll, M.S., Lockwood, W.R., Taylor, M.R., 1986. Toxic Shock Syndrome Associated with TSST-1 Producing Coagulase-Negative Staphylococci. *The American Journal of the Medical Sciences*, 292, 310-312.
- Kesmen, Z., Yarimcam, B., Aslan, H., Yetim, H., 2014. Application of Different Molecular Techniques for Characterization of Catalase-Positive Cocci Isolated from Sucuk. *Journal of Food Science*, 79 (2), 222-228.
- Kilpper, R., Buhl, U., Schleifer, K.-H., 1980. Nucleic Acid Homology Studies between *Peptococcus saccharolyticus* and various Anaerobic and Facultative Anaerobic Gram-positive Cocci. *FEMS Microbiology*, 8, 205-210.
- Kloos, W.E., Schleifer, K.H., 1986. Genus IV. *Staphylococcus*. In Sneath P.H., Mair, N.S., Sharpe M.E., Holt, J.G., (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, (1013-1035), Williams & Wilkins, 672p, Maryland.
- Kloos, W.E., Bannerman, T.L., 1994. Update on Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 117-140.
- Kloos, W.E., Bannerman, T.L., 1995. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In Murray, P.R., (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 6, (282-298), ASM Press, 1506p, Washington.
- Kloos, W.E., Ballard, D.N., George, C.G., Webster, J.A., Hubner, R.J., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Fiedler, F., Schubert, K., 1998. Delimiting the Genus *Staphylococcus* through Description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov. comb. nov. and *Macrococcus equipericus* sp. nov. and *Macrococcus bovicus* sp. nov. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. *International Journal Systematic Bacteriology*, 48(3), 859-877.

- Kozačinski, L., Drosinos, E., Čaklovica, F., Cocolin, L., Gasparik- Reichhardt, J., Vesković, S., 2008. Microflora in Traditionally Fermented Sausages. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 93–106.
- Kurt, E., 2009. Sucukta Organik Asit Kompozisyonuna Farklı Karbonhidrat Kaynaklarının Etkisi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 68s, Ankara.
- Lacumin, L., Manzano, M., Comi, G., 2012. Catalase-Positive Cocci in Fermented Sausage: Variability due to Different Pork Breeds, Breeding Systems and Sausage Production Technology. *Food Microbiology*, 29, 178-186.
- Landeta, G., Curiel, J.A., Carrascosa, A.V., Muñoz, R., De Las Rivas, B., 2013. Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From Spanish Dry Cured Meat Products. *Meat Science*, 93, 387-396.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and Food Poisoning. *Genetics ve Molecular Research*, 2, 63-76.
- Leibniz Enstitüsü - Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Alman Koleksiyonu. Erişim Tarihi: 07.05.2015. <http://www.dsmz.de/dsmz/>
- Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L., 2006. Functional Meat Starter Cultures for Improved Sausage Fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106 (3), 270–285.
- Lewus, C.B., Kaiser, A., Montville, T.J., 1991. Inhibition of Food-borne Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1683-1688.
- Lina, G., Bohach, G. A., Nair, S. P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., Mariuzza, R., 2004. Stveard Nomenclature for The Superantigens Expressed by *Staphylococcus*. *Journal of Infectious Disease*, 189, 2334-2336.
- Ludwig, W., Schleifer K.-H., Fox, G.E., Seewaldt, E., Stackebrvet, E., 1981. A Phylogenetic Analysis of Staphylococci, *Peptococcus saccharolyticus* ve *Micrococcus mucilaginosus*. *Journal of General Microbiology*, 125, 357–366.
- Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbayer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludwigsen, A., Wallner, G., Bachleitner, M., Fischer, U., Scheleifer, K.H., 1993. Phylogenetic Relationships of Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64, 285-304.
- Marin, M.E., De La Rosa, M.C., Cornejo, I., 1992. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* Strains Isolated from Spanish Dry-Cured Hams. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 9-1067.

- Marth, E.H., Halpindohnalek, M.I., 1989. Growth and Production of Enterotoxin-A by *Staphylococcus aureus* in Cream. *Journal of Dairy Science*, 72, 2266-2275.
- Marty, E., Bodenmann, C., Buchs, J., Hadorn, R., Eugster-Meier, E., Lacroix, C., Meile, L., 2012a. Prevalence of Antibiotic Resistance in Coagulase-Negative *Staphylococcus* from Spontaneously Fermented Meat Products and Safety Assesment for New Starters. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 74-83.
- Marty, E., Buchs, J., Eugster-Meier, E., Lacroix, C., and Meile, L., 2012b. Identification of *Staphylococci* and Dominant Lactic Acid Bacteria in Spontaneously Fermented Swiss Meat Products Using PCR-RFLP. *Food Microbiology*, 29, 157-166.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blainotta, G., Villani, F., 2004. Isolation and Technological Properties of Coagulase-Negative *Staphylococci* from Fermented Sausages of Southern Italy. *Meat Science*, 67, 149-158.
- McCormick, J. K., Yarwood, J. M., Schlievert, P. M., 2001. Toxic Shock Syndrome and Bacterial Superantigens: An Update. *Annual Reviews in Microbiology*, 55, 77-104.
- McNamara, P.J., Milligan-Monroe, K.C., Khalili, S., Proctor, R.A., 2000. Identification, Cloning and Initial Characterization of Rot, A Locus Encoding a Regulator of Virulence Factor Expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 182, 3197.
- Milci, S., Yaygın, H., 2006. Peynirlerden Kaynaklanan *Staphylococcus aureus* Zehirlenmesi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, Bolu, 97-98.
- Montel, M.C., 1999. Fermented Meat Products. In Batt, C.A., Patel, P.D., Robinson R.K. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (744–753). Academic Press, 2372p, London.
- Moreillon, P., Que, Y., Glauser, M.P., 2005. *Staphylococcus aureus* (Including *Staphylococcal Toxic Shock*) In Mandell, G.L., Bennett J.E., Dolin, R. (Eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases Volume 6* (2321-2351). Philadelphia, Churchill Livingstone.
- Moretti, V.A., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M.A., Panseri, S., Pirone, G., Gveini, G., 2004. Chemical and Microbiological Parameters and Sensory Attributes of a Typical Sicilian Salami Ripened in Different Conditions. *Meat Science*, 66, 845-854.

- Mortvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Nes, I.F., 1991. Purification and Amino Acid Sequence of Lactocin S, A Bacteriocin Produced by *Lactobacillus sake* L45. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1829-1834.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blainotta, G. And Villani, F., 2004. Isolation and Technological Properties of Coagulase Negative *Staphylococci* from Fermented Sausages of Southern Italy. *Meat Science*, 67, 149-158.
- Notermans, S., Heuvelman, K.J., Wernards, K., 1988. Synthetic Enterotoxin B DNA Probes for Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 531.
- Okereke, A., Montville, T.J., 1991. Bacteriocin Inhibition of *Clostridium botulinum* Spores by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection*, 54, 349-353.
- Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Shinagawa, K., 2005. Comprehensive Analysis of Classical and Newly Described Staphylococcal Superantigenic Toxin Genes In *Staphylococcus aureus* Isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 246, 191-198.
- Ordóñez, J.A., Hierro, E. M., Bruna, J., Hoz, L., 1999. Changes in The Components of Dry Fermented Sausages During Ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(4), 329-367.
- Özdemir, H., 1999. Türk Fermente Sucuğunun Florasındaki Dominant Laktobasil Türlerinin Sucuğun Organoleptik Nitelikleri ile İlişkisi. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 46, 189-198.
- Öztan, A., 2011. Et Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Mühendisleri Odası Yayınları, 526s, Ankara.
- Palamutoğlu, R., Sarıçoban, C., 2012ç Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrite Alternatif Doğal Kürlleme Maddeleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(3), 46-58.
- Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Schlievert, P., 1988. Cloning, Characterization and Sequencing of An Accessory Gene Regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *Journal Bacteriology*, 170, 43-65.
- Piechota, M., Kot, B., Zdunek, E., Mitrus, J., Wicha, J., Wolska, M.K., Sachanowicz, K., 2014. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(3), 407–411.
- Place, R.B., Hiestve, D., Burri, S., Teuber, M., 2002. *Staphylococcus succinus* subsp. *casei* subsp. nov., A Dominant Isolate from A Surface Ripened Cheese. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 353-359.

- Place, R.B., Hiestve, D., Gallmann, H.R., Teuber, M., 2003. *Staphylococcus equorum subsplinens* subsp. A Starter Culture Component for Surface Ripened Semi-Hard Cheeses. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 30–37.
- Probst, A.J., Hertel, C., Richter, L., Wassill, L., Ludwig, W., Hammes, W.P., 1998. *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from Soy Sauce Mash and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer, 1982) subsp. *utilis* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(3), 651–658.
- Rall, V.L.M., Sforcin, J.M., Augustini, V.C.M., Watanabe, M.T., Fernandes, A.J., Rall, R., Silva, M.G., Araujo, J.P.Jr., 2010. Detection of Enterotoxin Genes of *Staphylococcus* Sp. Isolated from Nasal Cavities and Hands of Food Handlers. *Brazil Journal of Microbiology*, 40, 1067–1073.
- Rantsiou, K., Cocolin, L., 2006. New Developments in The Study of The Microbiota of Naturally Fermented Sausages Determined by Molecular Methods: A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 123–128.
- Rantsiou, K., Cocolin, L., 2006. New Developments in The Study of the Microbiota of Naturally Fermented Sausages as Determined by Molecular Methods: A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 255–267.
- Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G., Cocconcelli, P.S., 1998. Physiological and Molecular Techniques for The Study of Bacterial Community Development in Sausage Fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1043–1049.
- Resch, M., Nagel, V., Hertel, C., 2008. Antibiotic Resistance of Coagulase-Negative *Staphylococci* Associated with Food and Used in Starter Cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 99–104.
- Rodriguez, M., Nunez, F., Córdoba, J.J., Bermudez, E., Asensio, M.A., 1996. Gram-Positive Catalase-Positive Cocci from Dry Cured Iberian Ham and Their Enterotoxigenic Potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1897–1902.
- Rosec, J.P., Gigaud, O., Dalet, C., Richard, N., 1997. Enterotoxin Production by *Staphylococci* from Foods in France. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 213–221.
- Samelis, J., Mataxopoulos, J., Vlassi, M., 1998a. Stability and Safety of Traditional Greek Salami—A Microbiology Ecology Study. *International Journal of Food Microbiology*, 44 (1–2), 101–117.
- Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M., Pappa, A., 1998b. Stability and Safety of Traditional Greek Salami-A Microbiological Ecology Study. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 69–82.

- Samelis, J., Sofos, J.N., 2003c. Organic acids. In Roller, S. (Ed.), Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods (98-132), Woodhead Publishing, 320p, Cambridge.
- Santos, E.M., González-Fernández, C., Jaime, I., Rovira, J., 1998. Comparative Study of Lactic Acid Bacteria House Flora Isolated in Different Varieties of Fchorizo. International Journal of Food Microbiology, 39, 123– 128.
- Schleifer, K.H., Kandler, O., 1972. Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and Their Taxonomic Implications. Bacteriological Reviews, 36, 407–477.
- Schleifer, K.H., Meyer, S.A., Rupprecht, M., 1979. Relatedness Among Coagulase-Negative Staphylococci: Deoxyribonucleic Acid Reassociation and Comparative Immunological Studies. Archives of Microbiology, 122, 93-101.
- Schleifer, K.H., Kilpper-Balz, R., Fischer, U., Faller, A., Endl, J., 1982. Identification of "*Micrococcus candidus*" ATCC 14852 as a Strain of *Staphylococcus epidermidis* and of "*Micrococcus caseolyticus*" ATCC 13548 and *Micrococcus varians* ATCC 29750 as Members of A New Species, *Staphylococcus caseolyticus*. International Journal Systematic Bacteriology, 32, 15-20.
- Schleifer, K.H., 1986. Taxonomy of Coagulase-Negative Staphylococci. In Mardh P.A., Schleifer, K.H. (Eds.), Coagulase-Negative Staphylococci. Almquist and Wiksell International (11–26), Stockholm, Sweden.
- Schillinger, U., Lücke, F.K., 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sakei* Isolated from Meat. Applied and Environmental Microbiology, 55, 1901-1906.
- Schillinger, U., Lücke, F.K., 1990. Lactic Acid Bacteria as Protective Cultures in Meat Products. Fleischwirtschaft, 70, 1296-1299.
- Seitter, M., Nerz, C., Rosenstein, R., Götz, F., Hertel, C., 2011. DNA Microarray Based Detection of Genes Involved in Safety and Technologically Relevant Properties of Food Associated Coagulase-Negative Staphylococci. International Journal of Food Microbiology, 145(2-3), 449-458.
- Silvestri, L.G., Hill, L.R., 1965. Agreement Between Deoxyribonucleic Acid Base Compotion and Taxonomic Classification of Gram-Positive Cocci. Journal of Bacteriology, 90, 136-40.
- Spelhaug, S. R., Harlander, S.K., 1989. Inhibition of Foodborne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. Journal of Food Protection, 52, 856-862.
- Şimşek, Z., 2010. Fermente Sucuk Üretiminde, Fermantasyon Mikroorganizmaları Kaynağı Olarak Turşu Suyunun Kullanılması, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 93s, Kayseri.

- Talon, R., Leroy, S., Lebert, I., 2007. Microbial Ecosystems of Traditional Fermented Meat Products: The Importance of Indigenous Starters. *Meat Science*, 77 (1), 55–62.
- Talon, R., Leroy, S., 2011. Diversity and Safety Hazards of Bacteria Involved in Meat Fermentations. *Meat Science*, 89, 303–309.
- Tanasupawat, S., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Kozaki, M., Komagata, K., 1992. *Staphylococcus piscifermentans* sp. nov., from Fermented Fish in Thailand. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 577–581.
- Toldrá, F., 1998. Proteolysis and Lipolysis in Flavour Development of Dry-Cured Meat Products. *Meat Science*, 49, 101–110.
- Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Baba, T., Hiramatsu, K., 2010. Staphylococcal Cassette Chromosome mec-Like Element in *Macroccoccus caseolyticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(4), 1469–1475.
- Udo, E.E., Al-Bustan, M.A., Jacob, L.E., Chugh, T.D., 1999. Enterotoxin Production by Coagulase-Negative Staphylococci in Restaurant Workers From Kuwait City may be A Potential Cause Of Food Poisoning. *Journal of Medical Microbiology*, 48, 819–823.
- Ulusoy, B.H., 2007. Kefir Kültürü ile Fermente Sucuk Üretimi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 116s, İstanbul.
- Url-1: Erişim Tarihi 22.07.2015. http://www.helalmarkalar.com/manset/sucuk-salam-sosis-ve-jambonlarda-kullanilan-kat_108.html
- Url-2: Erişim Tarihi 22.07.2015. <http://www.biokimkimya.com/content.asp?id=14&v=c&d=p&pid=1083&l=tr>
- Url-3: Erişim tarihi: 15.11.2014. <http://www.standartmerkezi.com/sm-gida-ve-kalite-forum/gida-sektoru-bazinda-bilgi-paylasimi-et-sut-meyve-sebze-yag-unlu-mamul-ambalaj-gida-katki/et-ve-et-urunleri/sucuk-uretim-akisi-semasi.html>
- Valle, J., Vadillo, S., Piriz, S., Gomez-Lucia, E., 1991. Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1) Production by Staphylococci Isolated from Goats and Presence of Specific Antibodies to TSST-1 in Serum and Milk. *Applied ve Environmental Microbiology*, 57, 889–891.
- Van Wamel, W.J., van Rossum, G., Verhoef, J., Veenbroucke-Grauls, C.M., Fluit, A.C., 1998. Cloning and Characterization of An Accessory Gene Regulator (agr)-Like Locus from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiology*, 163, 1–9.

- Vandenesch, F., Projan, S.J., Kreiswirth, B., Etienne, J., Novick, R.P., 1993. Synergistic Hemolytic Activity of *Staphylococcus lugdunensis* is Mediated By Three Peptides Encoded by A Non-agr Genetic Locus. *FEMS Microbiology*, 11, 111-115.
- Veras, J.F., Carmo, L.S., Tong, L.C., Shupp, J.W., Cummings, C., Santos, D.A., Cerqueira M.M.O.P., Cantini, A., Nicoli, J.R., Jett, M., 2008. A Study of The Enterotoxigenicity of Coagulase-Negative and Coagulase-Positive Staphylococcal Isolates from Food Poisoning Outbreaks in Minas Gerais Brazil. *Journal of Infection Diseases*, 12, 410–415.
- Vernozy-Rozve, C., Mazuy, C., Prevost, G., Lapeyre, C., Bes, M., Brun, Y., Fleurette, J., 1996. Enterotoxin Production by Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Goats' Milk and Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 271–280.
- Weber, H., 1994. Dry Sausage Manufacture, The Importance of Protective Cultures and Their Metabolic Products. *Fleischwirtschaft*, 74, 278-282.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V., Salminen, H., 2010. Advances in Ingredient and Processing Systems for Meat and Meat Products. *Meat Science*, 86, 196-213.
- Zdolec, N., Dobranić, V., Zdolec, G., Đuričić, D., 2013. Coagulase-Negative Staphylococci and Lactic Acid Bacteria, *Mljekarstvo*, 63(1), 30-35.
- Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., Götz, F., 2008. Characterization of Toxin Production of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Food and Starter Cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 246–251.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hasan ÇETİN
Doğum Yeri ve Yılı : Antalya, 1991
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : hsnctn07@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Antalya Lisesi, 2009
Lisans : SDÜ, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, 2013

Yayınları

Tuncer, Y., Çetin, H., 2015. Detection of Enterotoxin Genes In Coagulase-Negative *Staphylococcus* and *Micrococcus caseolyticus* Strains Isolated from Turkish Dry Fermented Sausage (Sucuk). 15th International & Diagnostic Conference, October 5-8, Prague, Czech Republic (Kabul edildi).