

ABSTRACT

Ms Thesis

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A BACTERIOCINOGENIC BACTERIUM ISOLATED FROM A FERMENTED MILK PRODUCT

Harun BILGİN

**Gaziosmanpaşa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering**

Supervisor: Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

In this study, a bacterium isolated from a traditional produced white cheese was identified and the physico-chemical properties of the inhibitory compound produced by this bacteria were characterized. The isolated bacterium was identified using general microbiological analysis, carbohydrate fermentation and fatty acid profile identification systems. The effects of enzymes, pH, heat treatment, storage conditions, some organic solvents, detergents and chemicals on the inhibitory activity of the compound were determined. Also, antimicrobial spectrum of the inhibitor compound, factors affecting its production and its molecular weight were determined. The isolated bacterium was identified as *Enterococcus faecium*. It was found that the antimicrobial compound was sensitive to papain, tyripsin and pancreatine, but resistant to pepsin, catalase, amylase and lipase enzymes, and organic solvents, detergents, β -mercaptoethanol, and EDTA. These results show that this compound is a bacteriocin and named as enterocin HZ. Enterocin has inhibitor activity against some lactic acid bacteria and *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. Enterocin HZ maintained its activity after high heat treatment applied at 90°C for 30 min, wide pH range (2,0-9,0), and after storage at (-80)°C for 3 months. It was determined that enterocin HZ was produced maximum level when MRS, especially M17 broth is used as a medium, and inoculum amount 0,1-0,5 %, initial pH of medium 6,0-7,0 and incubation temperature 32-37°C. Bacteriocin began to produce during the aerly logarithmic phase and its production reached maximum level at the middle of logarithmic phase. It was found that its molecular weight was about 4500 Da.

2008, 53 pages

Key Words: *Enterococcus faecium*, enterocin, physico-chemical properties, antimicrobial spectrum

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FERMENTE SÜT ÜRÜNÜNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİYOSİNOJENİK BİR BAKTERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

Harun BİLGİN

Gazi Osman Paşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

Bu çalışmada yöresel beyaz peynirden izole edilen bakterinin tanısı yapılmış ve bu bakterinin ürettiği antimikrobiyal bileşiğin fiziko-kimyasal özellikleri belirlenmiştir. İzole edilen bakteri genel mikrobiyolojik analizler, karbonhidrat fermantasyon ve yağ asidi profili testleri kullanılarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyal bileşiğin inhibitör aktivitesi üzerine enzimlerin, pH'nın, ısıtma işleminin, depolama koşullarının, bazı organik çözücülerin, deterjanların ve kimyasalların etkisi belirlenmiştir. Ayrıca, inhibitör maddenin antimikrobiyal spektrumu, üretimini etkileyen faktörler ile molekül ağırlığı saptanmıştır. İzole edilen bakterinin *Enterococcus faecium* olduğu belirlenmiştir. İnhibitör maddenin papain, tripsin, ve pankreatine karşı duyarlı, ancak pepsin, katalaz, amilaz ve lipaz enzimlerine, organik çözücülere, deterjanlara, β -merkaptöetanol ve EDTA'ya karşı dayanıklı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar bileşiğin bir bakteriyosin olduğunu ortaya koymuş ve enterosin HZ olarak adlandırılmıştır. Enterosin HZ'nin bazı laktik asit bakterileri ile *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Enterosin HZ'nin 90°C'de 30 dk uygulanan ısıtma işleme dayanıklı, geniş pH aralığında (2,0-9,0) ve -80°C'de 3 ay depolama sürecinde aktivitesini koruduğu saptanmıştır. Besiyeri MRS, özellikle M17, inokülüm miktarı % 0,1-0,5, besiyeri başlangıç pH'sı 6,0-7,0 ve inkübasyon sıcaklığı 32-37°C olduğu zaman enterosin HZ'nin maksimum düzeyde üretildiği belirlenmiştir. Bakteriyosinin logaritmik gelişme fazının başında üretilmeye başlandığı ve logaritmik fazın ortasında üretiminin maksimum düzeye ulaştığı gözlenmiştir. Molekül ağırlığının ise yaklaşık 4500 Da olduğu belirlenmiştir.

2008, 53 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus faecium*, enterosin, fiziko-kimyasal özellikler, antimikrobiyal spektrum

1. GİRİŞ

Günümüzde kaliteli, besin değeri yüksek, doğal ve az işlenmiş hazır gıdalara olan tüketici talepleri artmaktadır. Bundan dolayı geleneksel muhafaza teknikleri olan yüksek ısı işlem, tuzlama, asidifikasyon, kurutma ve kimyasal koruyucu yerine yeni muhafaza tekniklerine eğilim vardır. En çok araştırılan yeni muhafaza teknikleri termal olmayan inaktivasyon teknikleridir ki bunlar; yüksek hidrostatik basınç, vurgulu elektrik alanları, modifiye atmosferde paketlenme, doğal antimikrobiyal bileşikler ve biyokoruma (Soomra ve ark., 2002; Steffen, 2005; De Vuyst ve Leroy, 2007). Biyokoruma yöntemleriyle hem gıdanın depolama ömrü hem de güvenirliliği artmaktadır. Biyokoruma yöntemlerinden birisi de laktik asit bakterilerinin starter kültür, koruyucu kültür veya yardımcı kültür olarak kullanılmasıdır. Böylece hem gıdanın depolama ömrü iyileştirilmekte hem de gıda güvenliği artmaktadır (Steffen, 2005; De Vuyst ve Leroy, 2007).

Laktik asit bakterileri (LAB) “food-grade” organizmalar olarak kabul edilirler ve gıda endüstrisinde özellikle fermente gıdaların üretiminde önemli rol oynarlar. Fermente gıdaların tat, aroma, tekstür ve görünüşlerinde önemli katkılarda buldukları gibi depolama stabilitelelerinin de artmasına neden olmaktadır. LAB’leri; organik asitler, hidrojen peroksit, antimikrobiyal enzimler, alkol, diasetil, asetaldehit, hidrojen sülfür, reuterin, karbondioksit ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal metabolitlerden birini veya birkaçını üreterek diğer mikroorganizmalar üzerinde antagonistik etki göstermektedirler. Laktik antionisim, LAB’leri tarafından ortamda bulunan ve istenmeyen patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların inhibisyonu anlamına gelmektedir. Son yıllarda tüketicilerin doğal ve katkısız gıda ürünlerine yönelik tercihlerinin artmasından dolayı biyokoruyucu olarak LAB’leri tarafından üretilen bakteriyosinler önem kazanmıştır (Holtzel, 2000; Kazatelová, 2003; Yang ve Clausen, 2004; Røssland ve ark., 2005; Steffen, 2005; Gwen, 2006).

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen protein tabiatında antimikrobiyal bileşikler olup özellikle gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik etki göstermektedirler (Jack ve ark., 1995). İnsan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etme özellikleri ile bakteriyosinler özellikle son yıllarda üzerinde çok fazla çalışılan bir konu haline gelmiştir (Howard ve ark., 1993; Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

Yasal olarak gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilen ilk bakteriyosin *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisindir (FDA, 1988). Nisin ilk kez İngiltere’de bir gıda koruyucusu olarak kabul edilmiş ve krem peynirlerde kullanımına izin verilmiştir. Bugün yaklaşık 50’den fazla ülkede sağlık açısından güvenli bir gıda koruyucusu olarak kabul edilmiş ve birçok gıda çeşidinde kullanılmaktadır (Cheen ve Hoover, 2003).

Bu çalışmada Tokat’ta starter kültür kullanılmadan üretilen salamura beyaz peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip bir bakteri izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Ayrıca üretmiş olduğu antimikrobiyal bileşik karakterize edilmeye ve üretimine etki eden bazı faktörler belirlenmeye çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, çubuk ve koklar şeklinde, katalaz negatif, mikroaerofilik, aerotolerant, fakültatif anaerobik, aside dayanıklı, nitratı indirgemeyen, karbonhidratları ve yüksek alkollerini fermente ederek başlıca son ürün olarak laktik asit üreten doğal bir gruptur. LAB grubu içinde yer alan cinsler *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Vagococcus*, *Enterococcus* ve *Aerococcus*'dur (Axelsson, 1993; Stiles ve ark., 1997).

LAB'nin sınıflandırılması morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere dayanmaktadır. Ayrıca DNA'nın % Guanin+Sitosin miktarı, gen ürünlerinin elektroforetik özellikleri, DNA:DNA hibridizasyon çalışmaları, ribozomal RNA (rRNA)'nın sekansı gibi moleküler karakteristikler önemli taksonomik araçlar haline gelmiştir. Bu teknikler LAB'nin taksonomisinde değişikliklere neden olmuştur (Axelsson, 1993; Työppönen ve ark., 2003).

LAB güvenli organizmalar olarak kabul edilirler ve koruyucu kültürlerin özelliklerini taşırlar. Organik asitler, hidrojen peroksit, alkol, diasetil, karbondioksit, reuterin, antimikrobiyal enzimler ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal metabolitlerden biri veya birkaçını üreterek diğer mikroorganizmaları inhibe ederler (Työppönen ve ark., 2003; Devlieghere ve ark., 2004).

2.2. LAB'leri Tarafından Üretilen Bakteriyosinler

2.2.1. Tanımı

Farklı bakteriler arasında antagonistik ilişki ilk kez Pasteur ve Joubert (1877) tarafından belirlenmiş ve bakteriyosin tanımı ilk kez Jacob ve ark. (1953) tarafından yapılmıştır.

Bu tanım daha çok farklı türler arası antagonistik ilişkileri kapsamaktaydı. Ancak, daha sonra yapılan çalışmalarda buna benzer çok fazla madde bulununca terimin kapsamı da genişletilmiştir (Eckner, 1992). Bakteriyosinleri net ve açık bir şekilde tanımlayan Tagg ve ark. (1976)'dır. Bu tanıma göre bakteriyosinler: protein tabiatında antagonistik maddeler olup sınırlı sayıda bakteriye, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip makromoleküllerdir. Yapılan çalışmalarda antimikrobiyal spektrumu geniş, özellikle gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakteriler üzerinde etkili bakteriyosinlerin bulunmasıyla birlikte bu tanım genişletilmiştir.

2.2.2. Sınıflandırılmaları

LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinler, ribozomal olarak sentezlenen, küçük katyonik amfifilik, antimikrobiyal peptitler şeklinde tanımlanmaktadır. Bakteriyosinler, antimikrobiyal spektrum ve etki mekanizması, genetik determinantlar, moleküler yapı ve kütle, ısı ve pH stabilitesi açısından farklılık gösteren geniş grup içinde yer almaktadırlar. Yapısal, fizikokimyasal ve moleküler özellikler temel alındığında LAB bakteriyosinleri 3 ana gruba ayrılır. Sınıf I bakteriyosinleri (lantibiyotikler), küçük moleküler ağırlıklı (<5 kDa) membran aktif peptitler olup, anormal aminoasitler olan lanthionin ve dehidre olmuş amino asitler içermektedirler. Sınıf II bakteriyosinleri, küçük moleküler ağırlıklı olmalarına karşın lantibiyotikler içermemekte ve 3 alt grup altında toplanmaktadırlar. Grup IIa listeria'ya karşı aktif ve N-terminalinde Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys amino asit dizisini içermektedir. Grup IIb bakteriyosinlerinin aktivite gösterebilmeleri için genellikle iki farklı peptit gerekmektedir. Grup IIc bakteriyosinlerine thiol'la aktif edilen peptitler denilmektedir. Sınıf III bakteriyosinleri büyük moleküllü (>30 kDa), ısıya dayanıksız proteinlerdir (Klaenhammer, 1993; Ennahar ve ark., 2000; McAuliffe ve ark., 2001; Bauer ve Dicks, 2005; Cotter ve ark., 2005).

2.2.3. Biyosentezleri

LAB'lerin bakteriyosinleri, ribozomal olarak sentezlenmektedir. Bakteriyosin üretimi ile immüniteyi kodlayan genler, plazmid, kromozom ve transposan üzerinde bulunabilmektedir. Çoğu bakteriyosinin yapısal genleri operona benzer bir yapı gösterir. Bakteriyosinlerin üretiminin gerçekleştirilebilmesi için dört farklı gene ihtiyaç vardır: (i) prepeptiti kodlayan bir yapısal gen, (ii) immünite geni, (iii) ABC-taşıyıcısını kodlayan gen ve (iv) bakteriyosinin dışarı taşınmasında gerekli olan aksesuar proteinini kodlayan gen (Garneu ve ark., 2002; Deegan ve ark., 2006).

Biyosentez mekanizması açısından değerlendirildiğinde her üç sınıf bakteriyosinlerin sentezi birbirine benzemektedir. Sadece sınıf I bakteriyosinlerin biyosentezinde bulunan anormal aminoasitlerin üretim aşaması olan kimyasal modifikasyon (posttranslasyon) sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin sentezinde yer almamaktadır. Sınıf I bakteriyosinleri prelantibiyotik (prebakteriyosin) olarak sentezlendikten sonra dehidrasyon ve çapraz bağlanma (kimyasal modifikasyon) reaksiyonlarına uğramakta ve bunun sonucunda anormal amino asitler (lantibiyotikler, dehidreamino asitler vb.) oluşmaktadır. Sınıf II ve sınıf III bakteriyosinleri kimyasal modifikasyona uğramadıkları için anormal aminoasitleri içermemektedirler.

Bakteriyosinlerin biyosentezinde üç bileşenli regülatör sistemi rol oynamaktadır. Bunlar histidin protein kinaz enzimi, respons regülatörü ve indüksiyon faktörüdür. İndüksiyon faktörü membranda bulunan histidin protein kinaz enzimini uyarır. Bunu takiben histidin protein kinaz enzimi sitoplazmada bulunan respons regülatörünü fosforilize ederek bu uyarıyı hücreye iletir ve biyosentezin başlamasını sağlar (Montville ve Winkowski, 1997; Ennahar ve ark., 2000).

Yapısal gen bir prebakteriyosin (prepeptit) olarak kodlanmaktadır. Prebakteriyosinler biyolojik olarak inaktif olup N-terminalinde lider peptit ve C-terminalinde propeptit içermektedirler. Prebakteriyosinin olgunlaşması veya taşınması sırasında N-terminal uzantısı enzim vasıtasıyla parçalanıp uzaklaşmakta ve böylece aktif hale geçmektedirler.

Ancak sınıf I bakteriyosinlerin aktifleşmesi için propeptit post-translasyonel modifikasyona uğramaktadır. Bu modifikasyon spesifik hidroksil aminoasitlerin dehidrasyonu, tioether bağlarının oluşumu, sisteinlerin dehidroaminoasitlere bağlanması gibi olayları da içerir (Sahl ve ark., 1995; Ennahar ve ark., 2000; Rodriguez ve ark., 2003).

Sentezlenen bakteriyosinlerin hücre dışına taşınması membrana bağlı olan iki protein tarafından gerçekleştirilir. Bunlar ABC-transporter ve aksesuar proteindir. ABC-taşıyıcısı hem prebakteriyosinin taşınmasında rol oynamakta hemde proteolitik aktiviteye sahip olduğundan pre-peptidin lider dizisini parçalama fonksiyonuna sahiptir. Sonuçta lider peptit uzaklaşmakta ve olgun bakteriyosin sitoplazmik membrandan dışarıya taşınmaktadır. Aksesuar proteinleri de bakteriyosinlerin taşınmasında rol oynamaktadır (Klaenhammer, 1993; Havarstein ve ark., 1995; Ennahar ve ark., 1999, 2000; Rodriguez ve ark., 2003).

2.2.4. Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları

LAB bakteriyosinleri duyarlı bakterilerin membranlarını destabilize ederek etki gösteren peptitlerdir. Duyarlı bakterilerin hücre membranlarında iyonik gözenekler oluşturarak potasyum ve inorganik fosfat sızmasına ve buna paralel olarak membran iyonik dengesinin bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda transmembran potansiyeli ve/veya pH gradientinin kısmen veya tamamen yok olması nedeniyle proton itici gücü ortadan kalkmaktadır. Proton itici güç, hücre içinde iyonların ve metabolitlerin birikmesi ile ATP sentezi gibi sitoplazmik membranda enerjiye bağlı birçok hayati işlemleri yürütmektedir. Proton itici gücün yok olması veya bozulması direk olarak hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Bruno ve Montville, 1993). Bakteriyosinlerin duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranda por oluşturmalarıyla ilgili olarak öne sürülen başlıca üç model vardır. Bu modeller “Barrel–Stave”, “Wedge–Model” ve “Lipit II Model”dir. Barrel–stave mekanizmasında, bakteriyosinlerin katyonik yük taşıyan C-terminali fosfolipitlerin fosfat grupları ile elektrostatik interaksiyona girerek membranda incelmeye neden olurlar. Membran potansiyeli

varlığında membran içine girip oligomerize olmakta ve böylece membranda iyonik gözenekler oluşturmaktadırlar. Peptitler merkezi kanalın etrafında dizilmekte ve hidrofobik yüzeyler membrana doğru, hidrofilik yüzeyler ise gözenegin merkezine doğru yönelmektedir (McAuliffe ve ark., 2001; Garneau ve ark., 2002). Wedge-modelinde lantibiyotiklerin pozitif yüklü C-terminali anyonik fosfolipitlerle iyonik interaksiyona girerek membran yüzeyine sıkıca tutunmakta ve lipit dinamiğinin bozulmasına neden olmaktadır. Yeterli miktarda membran potansiyeli varlığında (-100 mV), bakteriyosin molekülleri fosfolipitlerle olan interaksiyonlarını kaybetmeksizin membran içine girip membranda bükülmelere veya kıvrılmalara ve dolayısıyla gözeneklerin oluşmasına neden olmaktadır (Brötz ve Sahl, 2000; Bauer ve Dicks, 2005). Lipit II modelinde lantibiyotiklerin gözenek oluşturmada lipit bağlı peptidoglukan prekürsörü olan lipit II önemli rol oynamaktadır. Bu mekanizmada lantibiyotik 1:1 oranında ilk önce lipit II'nin karbonhidrat kısmına bağlanmaktadır. Bu bağlanmada lantibiyotiğin N-terminali rol oynamakta ve negatif bir yüzey gerekmemektedir. Lantibiyotiğin C-terminali membran içine girerek membranın karşı tarafına geçmektedir. Gözenek oluşumu için birkaç lantibiyotik/lipit II kompleksi gereklidir (Kopenon, 2004; Bauer ve Dicks, 2005).

2.2.5. Antimikrobiyal Etki Spektrumları

LAB'nin ürettiği bakteriyosinler genellikle Gram-pozitif bakteriler üzerinde inhibitör aktivite gösterirler; ancak son zamanlarda Gram-negatif bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip bakteriyosinler de tespit edilmiştir (Lee ve Paik 2001; de Kwaadsteniet ve ark., 2005). LAB'lerinde en iyi tanımlanmış, en iyi bilinen ve en yaygın kullanım alanına sahip bakteriosin, bazı *L. lactis* spp. *lactis* suşları tarafından üretilen nisindir. Nisinin çok sayıda Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi olmasına rağmen Gram negatif bakterilere karşı etkisi genellikle düşüktür. *E. coli* O157: H7 ve *Salmonella* gibi patojenlerin gelişimini EDTA gibi metal şelatlaştırıcıların nisin ile kombinasyonu kullanıldığında veya sıcaklık şoku uygulandığında önlediği görülmüştür. EDTA, dış membranı tahrip eder ve nisinin penetrasyonuna izin verir (Cleveland ve ark., 2001).

E. faecalis suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin genellikle enterokok türlerine karşı etkili olduğu, *E. faecium* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin ise, *Propionibacterium* spp., *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *Clostridium sporogenes* ve *Cl. tyrobutyricum*'u kapsayan geniş inhibitör aktivite spektrumuna sahip olduğu görülmüştür (Toit ve ark., 2000). *E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97'nin *Bacillus macroides*, *B. coagulans* ve *B. maroccanus*'un gelişimi inhibe ettiği belirlenmiştir (Garcia ve ark., 2004).

Achemchem ve ark. (2005) yaptıkları bir araştırmada *E. faecium* F58'in ürettiği bakteriyosinin *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Brochothrix* ve *Bacillus*'un bazı suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu, MRS besiyerinde 30°C'de erken durgun fazın başında maksimum düzeyde üretildiği, pH 4-8 arasında aktivitesini koruduğu ve yüksek ısı işleme dayanıklı olduğunu ortaya koymuşlardır. Moleküler ağırlığının ise 5210-5234 arasında olduğunu belirlemişlerdir.

E. faecium ST311LD tarafından üretilen bakteriyosinin bazı Gram-pozitif (*E. faecalis*, *Lb. casei* ve *Str. pneumoniae*) ve Gram-negatif bakterilere (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) karşı inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır (Todorov ve Dicks, 2005).

E. faecalis A-48-32 ve *E. faecium* S-32-81 tarafından üretilen enterosin AS-48 (Ananou ve ark., 2005), *E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97 (Garcia ve ark., 2004), *E. casseliflavus* IM 416K1 ve *E. faecalis* IM 388C tarafından üretilen enterosinlerin (Sabia ve ark., 2004) gıda kaynaklı bir patojen olan *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör etkileri farklı çalışmalarda belirlenmiştir.

Tunus "Rigouta" peynirinden izole edilen *E. faecium*'un MMT21 suşunun ürettiği enterosin A ve B'nin laktik asit bakterilerinin yanısıra *L. monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde de inhibitör etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Ghraiiri ve ark., 2008).

Fermente bir soya ürünü olan “Chungkukjang”dan izole edilen *E. faecium* S2C10 ve S2C11'nin ürettiği bakteriyosinlerin *L. monocytogenes* ve LAB'lerine karşı aktif olduğu belirlenmiştir (Yoon ve ark., 2008).

Tunus'ta fermente et ürünü olan “Gueddid”den izole edilen *E. faecium*'un MMZ 04, 09, 13, 17 suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin patojen ve patojen olmayan birçok Gram pozitif bakteri (*L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Pediococcus acidilacticia*, *L. lactis* spp. *cremoris*, *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* ve *Leuconostoc mesenteroides*) üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Belgacem ve ark., 2008).

E. faecium L50 tarafından üretilen enterosin L50, enterosin P ve enterosin Q'nun biralarda bozulmaya neden olan *Lb. brevis* ve *P. damnosus* ile *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Cl. botulinum*'a karşı oldukça etkili olduğu saptanmıştır (Cintas ve ark., 1998; Basanta ve ark., 2008).

2.2.6. Sentezlerini, Aktivitelerini ve Stabilitelerini Etkileyen Faktörler

Bakteriyosin üretimi, aktivitesi ve stabilitesini etkileyen faktörler sırasıyla; besiyerinin bileşimi, üretici bakterinin gelişme fazı, besiyeri başlangıç pH'sı, fermantasyon şekli (kesikli ve sürekli), inkübasyon sıcaklığı ve süresi, ısı işlem, proteolitik enzimler ve depolama koşullarıdır. Basit bir besiyerinde bakteriyosin üretimi, optimum pH ve bakteri için spesifik besin öğelerinin ilavesi ile artırılabilir. Kullanılan besiyerindeki bazı bileşenler (örneğin triptofan, maya ekstraktı vb.) bakteriyosinleri koruduğu, bazılarının ise stabilitesini azalttığı belirtilmektedir. Bakteriyosinin üretimi için en uygun sıcaklık ise bakterilerin optimum gelişme sıcaklığıdır. Genellikle yüksek hücre yoğunluğunu sağlayan koşullar yüksek bakteriyosin üretimini de sağlamaktadır (Yang ve Ray, 1994; Aasen ve ark., 2000; Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

Enterosin ON-157 (*E. faecium* NIAI 157) amilaz ve proteolitik enzimlere duyarlı, LAB ve *L. monocytogenes* 'e karşı aktif, pH 2-7 bakteri gelişimi ile birlikte üretildiği; ancak

geç logaritmik fazda maksimum düzeye ulaştığı, 37°C’de MRS besiyerinde maksimum düzeyde üretildiği saptanmıştır. Ayrıca asidik (2-5 pH) koşullarda ısıtılma işlemi (100°C’de 30 dk) dayanıklı olmasına karşın, nötr ortamlarda (6-7 pH) ısıtılma işlemi (100°C’de 30 dk) duyarlı olduğu da belirlenmiştir (Ohmomo ve ark., 2000).

E. faecium P21 tarafından üretilen enterosin A ve B’nin pH 2-11 aralığında aktivitesini koruduğu, proteazlara karşı duyarlı, 80-100°C’de 20 dk uygulanan ısıtılma işlemi, lipaz ve α -amilaza dayanıklı olduğu, liyofilizasyondan ve -20°C’de 12 ay depolama koşullarından etkilenmediği, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. perfringens*, *C. botulinum* gibi patojen bakterilere karşı etkili olduğu ve logaritmik fazın sonuna doğru maksimum düzeyde üretildiği tespit edilmiştir (Herranz ve ark., 2001).

Peynirden izole edilen *E. faecium* RZS C5 suşunun pH 6,5 ve 20-35°C inkübasyon sıcaklığında maksimum düzeyde bakteriyosin ürettiği ve bu bakteriyosinin listeria’ya karşı aktif olduğu belirlenmiştir (Leroy ve Vuyst, 2002).

E. faecium N15 tarafından üretilen bakteriyosinin α -kimotripsin, proteinaz K, tripsin ve pepsin gibi proteazlar ile α -amilaza karşı duyarlı, lipaz enzimine, 100°C’de 2 saat uygulanan ısıtılma işlemi dayanıklı, ancak 121°C’de 15 dakika otoklavlama koşullarında aktivitesini tamamen kaybettiği saptanmıştır. Ayrıca geniş bir pH aralığında (2-10) aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Losteinkit ve ark., 2001).

E. casseliflavus ve *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosinler üzerine yapılan bir çalışmada, her iki bakteriyosinin de kullanılan proteolitik enzimlere duyarlı oldukları ve aktivitelerini geniş pH aralığında ve buzdolabı koşullarında 6 ay depolama süresince sürdürdükleri belirlenmiştir. Isı uygulamaları sonucunda *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosinin ısıya duyarlı olduğu, *E. casseliflavus* tarafından üretilenin ise 121°C’de 15 dk otoklavlama işleminden sonra bile antimikrobiyal aktivitesini koruduğu görülmüştür (Sabia ve ark., 2002, 2004).

E. faecium JCM 5804T’nin ürettiği bakteriyosinin proteinaz K, tripsin, α -kimotripsin ve papain enzimlerine duyarlı, yüksek ısıtılma işlemi dayanıklı (100°C’de 30 dk), geniş pH

aralığında (2-10 pH) aktivitesini muhafaza ettiği, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *L. monocytogenes*'i inhibe ettiği belirlenmiştir (Park ve ark., 2003). *E. faecium* RZS C5'in ürettiği bakteriyosinin *L. monocytogenes*'e karşı çok etkili olduğu ve çoğu LAB bakteriyosinleri durgun fazın başında üretilmesine karşın bu bakteriyosinin logaritmik fazın başında yüksek miktarda üretilmeye başladığı bildirilmektedir (Leroy ve ark. 2003).

De Kwaadsteniet ve ark. (2005) *E. mundtii* ST15 tarafından üretilen bakteriyosinin proteinaz K, pronaz, pepsin, proteaz ve Triton X-114 ile inaktive olduğunu fakat katalaz, α -amilaz, Triton X-100, SDS, Tween 20, Tween 80, üre ve EDTA'dan etkilenmediğini belirlenmişlerdir.

E. faecium GM-1'nin ürettiği bakteriyosin Gram negatif bakterilerden *E. coli*, *S. aureus*, *Vibrio* spp., *S. typhimurium*, Gram pozitif bakterilerden *L.monocytogenes*, *Lb. acidophilus*, and *S. thermophilus* 'a karşı aktif, proteolitik enzimlere (papain, pepsin, tripsin ve proteinase K) duyarlı, yüksek ısı işleme (100°C'de 20 dk) dayanıklı olduğu, asidik ve nötral pH'larda aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. MRS besiyeri başlangıç pH'sı 6,0-6,5 ve inkübasyon sıcaklığı 30-40°C arasında olduğunda maksimum düzeyde üretildiği de bulunmuştur (Kang ve Lee, 2005).

E. faecium USC-46 ve *E. mundtii* USC-51 tarafından maksimum bakteriyosin üretiminin gelişimlerinin durgun fazında olduğu belirlenmiştir. Her iki bakteriyosinin proteinaz K ile inaktif olduğu, yüksek ısı işleme (100°C'de 60 dk veya 121°C'de 15 dk) dayanıklı olduğu gözlenmiştir (Campos ve ark., 2006).

E. faecium MMT21'nin ürettiği enterosin A ve enterosin B'nin tripsin, pronaz E ve proteinaz K'ya karşı duyarlı olduğu, geniş pH (2-10) aralığında aktivitesini koruduğu, ancak 100°C'de 15 dk uygulanan ısı işlemden sonra aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir (Ghrai ve ark., 2008).

Başka bir çalışmada *E. mundtii* tarafından üretilen bakteriyosinin pH 6-8 aralığında en yüksek aktiviteyi gösterdiği, 45°C haricinde; sıcaklığın aktivite üzerinde belirli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Settanni ve ark., 2008).

2.2.7. Saflaştırılmaları

Bakteriyosinlerin saflaştırılmasında kullanılan yöntemler bakteriyosinlerin katyonik hidrofobik moleküller olmaları, üreten bakterinin ve diğer Gram-pozitif bakterilere adsorbe olabilmeleri ve adsorpsiyonun pH'ya bağlı olması özelliklerine esas alınarak geliştirilmiştir. Saflaştırmanın ilk aşamasında temel amaç hacim azaltması ve istenmeyen bazı protein ve lipit gibi bileşikler uzaklaştırmak olduğundan tuzla çöktürme, asitle veya diğer organik çözücülerle pıhtılaştırma, diyaliz, ultrafiltrasyon, üretici bakteriye, silikik asit ve çeltik kabuğu külüne adsorpsiyon/desorpsiyon gibi yöntemlerden yararlanır. İkinci aşamada, besiyerinden ve hücre metabolizmasından kaynaklanan kontamine proteinlerden iyi derecede bir arındırma sağlamak olduğundan jel filtrasyonu, anyon veya katyon değiştirici kromatografisi, hidrofobik interaksiyon kromatografisi gibi kromatografik yöntemler kullanılmaktadır (Yang ve ark.,1992; Coventry ve ark., 1996; Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

Molekül ağırlık açısından enterosinler değerlendirildiğinde, enterosin A ve B (*E. faecium* MMT21)'nin sırasıyla 4828.67 Da ve 5463.8 Da (Ghraiiri ve ark., 2008), bakteriosin B1 ile B2 (*E. faecium* B1 ve B2)'nin 3,4 ile 5,8 kDa (Moreno ve ark., 2002), bakteriosin DO81821 (*E. faecium* D081821 ve D081833)'in 3,0 kDa (Chen ve ark., 2007), enterosin ON-157 (*E. faecium* NIAI 157)'nin 2,5 kDa (Ohmomo ve ark., 2000), enterosin RZS C5 ve enterosin RZS C13 (*E. faecium* RZS C5 ve *E. faecium* RZS C13)'ün 5460 ve 5477 Da (Foulquie' Moreno ve ark., 2003), bakteriyosin (*E. faecium* JCM 5804T) 4,5 kDa (Park ve ark., 2003) moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmektedir.

2.3. Enterokoklar ve Ürettikleri Bakteriyosinler

Enterokoklar, LAB içinde yer alan önemli bir cinstir. Enterokoklar, Avrupa ve ülkemizde çeşitli geleneksel fermente gıdaların üretiminde önemli rolleri olduğu gibi probiyotik olarak da başarıyla kullanılmaktadırlar. Ancak bu yararlı etkilerinin yanı sıra zararlı etkileri de bulunmaktadır. Bazı gıdalarda bozulma etmeni oldukları gibi bazı enterokok suşları özellikle antibiyotiğe (vankomisin) dayanıklı suşları insan ve hayvanlar için patojendirler. Enterokoklar, özellikle nozokomiyal infeksiyonlarda hastalığa sebep olan tipik fırsatçı patojenlerdir (Franz ve ark., 2003; Kayser, 2003; İşleroğlu ve ark., 2008, Ogier ve Serror, 2008).

Başlangıçta *Streptococcus* cinsi içinde yer alan enterokoklar, “fekal streptokoklar” veya “Lancefield serolojik D grubu streptokoklar” olarak bilinmekteydi. 1984 yılında DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyon çalışmaları ile bunların streptokoklardan farklılığı ortaya konmuş ve buna bağlı olarak *Enterococcus* olarak ayrı bir cins olarak kabul edilmiştir (Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984). *Enterococcus* cinsi içinde şu ana kadar 32 tür bulunduğu tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus*, *E. seriolicida* ve *E. solitarius* 'dur. Bunlardan *E. faecalis* ve *E. faecium* en önemli iki tür olup insanların gastrointestinal sisteminin doğal florasında bulunmaktadır. Enterokoklar fekal kaynaklı olmaları ve kötü çevre koşullarına karşı dayanıklı olmalarından dolayı genellikle gıda, bitki, su ve topraktan izole edilmektedirler (Giraffa, 2002). Enterokoklar, *Melissococcus*, *Tetragenococcus* ve *Vagococcus* cinsleri ile birlikte *Enterococcaceae* familyası içinde bulunurlar. *Enterococcus* cinsinin üyeleri, Gram pozitif, katalaz negatif, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunan fakültatif anaerob koklardır. Bunlar kemoorganotrofikler ve homofermentatif laktik asit fermentasyonu ile heksozlardan L-laktik asit oluştururlar. Tipik enterokoklar olan *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* ve *E. mundtii*, 10 ve 45 °C'de, %6,5 NaCl, %40 safra varlığında ve pH 9,6'da gelişebilmeleri ile streptokok ve laktokoklar gibi diğer Gram (+) ve katalaz negatif homofermentatif koklardan

kolaylıkla ayrılabilirler. Optimal olarak 35°C'de gelişirken 60°C'de 30 dakika'da canlılıklarını sürdürebilirler. İstisnalar 45°C'de gelişmeyen *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. malodoratus* ve *E. moraviensis*, 10°C'de gelişmeyen *E. cecorum* ve *E. columbae* ile %6,5 NaCl varlığında az gelişen veya gelişemeyen *E. avium*, *E. saccharaminus*, *E. cecorum* ve *E. columbae*'dir. *E. mundtii* ve *E. casseliflavus* sarı pigmentli ve *E. gallinarum* ile *E. casseliflavus* hareketlidir. Grup D antiserumu ile reaksiyon vermeyen bazı türler (*E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus* ve *E. sulfureus*) de mevcuttur (Klein, 2003; Foulquie Moreno ve ark., 2006; Ogier ve Serror, 2008).

Grup D streptokokların bakteriyosin benzeri madde ürettikleri ilk kez 1955'te bildirilmiş ve bu tarihten itibaren çok sayıda enterosin bulunmuştur. Bugüne kadar tespit edilen enterosinlerin sınıf I, sınıf II (a ve c grubu) ve sınıf III bakteriyosinlerinin özelliklerini taşıdığı belirlenmiştir. *E. faecalis*'in ürettiği iki bileşenli sitolisin sınıf I; *E. faecium* tarafından üretilen enterosin A, enterosin P ve enterosin CRL35; *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosin 31 ve *E. mundtii* tarafından üretilen mundtis sınıf IIa'ya ve *E. faecalis*'in ürettiği enterosin AS-48, enterosin 1071A ve 1071B, *E. faecium*'un ürettiği enterosin B, enterosin L50A ve L50B ve enterosin Q sınıf IIc'ye örnek olarak verilebilir. Enterosin üretici suşlar fermente gıdalar (süt ürünleri, sosis vb.), fermente olmayan gıdalardan (balık, sebze vb.), silaj, su, hayvan ve insan dışkılarından izole edilmiştir (Foulquie Moreno ve ark., 2003, 2006).

Enterosinler aynı filogenetik yapı içinde yer alan *Listeria*'lara karşı oldukça aktiftirler. Enterosinler diğer çoğu bakteriyosin gibi, sitoplazmik membran üzerinde etkilidirler. Hücre membranında gözenekler oluştururlar ve böylece elzem intraseluler moleküllerin sızıntısı ile sonuçlanan transmembran potansiyeli ve/veya pH gradiyentini bozarlar. Enterokokal bakteriyosinler genellikle *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *E. coli* ve *Vibrio cholerae* gibi bazı Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı inhibitör aktiviteye sahiptirler (McAuliffe ve ark., 2001; Kopenon, 2004; Foulquie Moreno ve ark., 2006). Özellikle enterosin AS-48 hem Gram pozitif hem de Gram-negatif bakteriler üzerindeki geniş antimikrobiyal aktivitesinden dolayı ilgi odağı olmuştur. Wachsman ve ark.

(1999) enterosin CRL 35'in antiviral aktivitesini de bildirmişlerdir. Enterosinler, proteinaz K, α -kimotripsin, tripsin, pepsin gibi bazı proteolitik enzimlere karşı duyarlıyken lipaz, amilaz ve katalaz enzimlerine karşı dayanıklıdırlar. Geniş pH aralıklarında aktivite gösteren enterosinler, asidik pH'larda daha fazla aktiftirler. Donma ve buzdolabı koşulları ile yüksek sıcaklığa (100°C) dayanıklıdırlar. Liyofilizasyonla kurutmadan sonra uzun süre stabilitelelerini koruyabilmektedirler (Giraffa ve ark., 1994; Griffa ve ark., 1995; Cleveland ve ark., 2001; Rodriguez ve ark., 2003).

Enterokokların önemli türlerinden biri olan *E. faecium* tarafından birçok bakteriyosinin üretildiği bildirilmiştir. Enterosinlere örnek olarak enterosin P (Cintas ve ark., 1997), enterosin A ve B (Aymerich ve ark., 2000), enterosin P21 (Herranz ve ark., 2001), enterosin ON-157 (Ohmomo ve ark., 2002), enterosin B1 ve B2 (Moreno ve ark. 2002), enterosin RZS C5 (Leroy ve ark., 2003), enterosin RZS C13 (Foulquie' Moreno ve ark., 2003), enterosin GM-1 (Kang ve Lee, 2005), enterosin AS-48 (Ananou ve ark., 2005), enterosin F58 (Achemchem ve ark., 2005), bakteriosin DO81821 (Chen ve ark., 2007), enterosin P ve Q (Basanta ve ark., 2008), enterosin S2C10 ve S2C11 (Yoon ve ark., 2008) verilebilir.

Bakteriyosin üreten enterokokların starter kültür, yardımcı-kültür veya koruyucu kültür olarak kullanılması gıda fermentasyon proseslerinde enterosinlerin direkt eklenmesinin yanında fermentasyon teknolojileri arasında büyük ilgi noktasıdır. Enterosinlerin bir çok gıda peynir, meyve suyu, sosis, salam, jambon gibi et ürünlerinde patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmalara *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *S. aureus* ve *Alicyclobacillus acidoterrestri*'ye karşı etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Giraffa ve ark., 1994; Nunez ve ark., 1997; Giraffa, 1995; Farias ve ark., 1999; Aymerich ve ark., 2000; Ananou ve ark., 2005; Grande ve ark., 2005).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Gıda Örnekleri

Bu çalışmada, Tokat yöresinde geleneksel yöntemle üretilen beyaz peynir örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. Test edilen peynir örnekleri piyasadan aseptik koşullarda alındıktan sonra en kısa sürede toplanılmış ve en kısa sürede Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarına getirilmiştir. Örnekler mikroorganizmaların izolasyon işlemleri tamamlanıncaya kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Bakteri Kültürleri ve Besiyerleri

Araştırmanın temel hedefi antimikrobiyal etkiye sahip mikroorganizmaları bulmak olduğu için indikatör test mikroorganizmaları olarak *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecalis* kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan indikatör mikroorganizmalar Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü ve Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir. LAB'leri % 20 gliserol içeren de Mann Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinde, diğer bakteriler ise % 20 gliserol içeren Brain Hearth Infusion (BHI) besiyerinde -80°C'de muhafaza edilmişlerdir. Peynir örneklerinden bakterilerin izole edilmesinde Nutrient broth kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Peynirlerin Hazırlanması

Peynirlerden steril kabinde steril bıçak, pens ve spatülalar vasıtasıyla 10-25 gram alınıp 90 ml Nutrient Broth besiyerine aktarılmış ve karıştırılarak homojenize edilmiştir.

Zenginleştirme amacıyla 25°C'de 1-3 saat bekletildikten sonra 10^{-6} - 10^{-7} 'ye kadar peptonlu su (1g pepton/1000 mL destile su) tamponu kullanılarak dilüsyonlar hazırlanmıştır. Dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak Nutrient agar'a 6'şar paralelli olacak şekilde aktarılmış ve drigalski spatülü ile petri döndericisi kullanılarak yayma işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2. Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Bakterilerin Tespit Edilmesi

Antimikrobiyal aktiviteye sahip bakterilerin tespit edilmesi için Sandviç Yöntemi kullanılmıştır (Mayr-Harting ve ark., 1972). Laktik asit bakterileri için % 0,8 agarlı MRS, diğer bakteriler için ise % 0,8 agarlı BHI besiyerleri eritilip 35-40°C'ye soğutulduktan sonra üzerine 3.1.2'de belirtilen indikatör mikroorganizmalar ilave edilmiştir. İndikatör mikroorganizmaları içeren yumuşak agarlı besiyerleri yaklaşık 25-250 arasında koloni bulunan petrilere eklenmiştir. Besiyeri katılaştıktan sonra petrilere indikatör bakterilerin optimum gelişme sıcaklıklarında 32°C ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon işlemi sonunda inhibisyon zonu veren koloniler steril koşullarda öze ile alınarak MRS besiyerine aktarılmıştır. Bu çalışmada antimikrobiyal aktiviteye sahip kolonilerden birisi seçilmiş ve analizlere tabi tutulmuştur.

3.2.3. Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Bakterinin İzolasyonu ve Tanısı

İnhibitör aktivite gösteren koloni MRS besiyerine öze yardımı ile aktarıldıktan sonra genel mikrobiyolojik yöntemlerden Gram boyama, spor boyama, optimum gelişme sıcaklığı ve pH'sı, gelişebildiği NaCl konsantrasyonu, kanlı agardaki aktivitesi, Voges Proskauer testi, indol testi, katalaz testi, jelatin hidroliz testi, sütte asit üretimi, glikoz sıvı besiyerinde (Glikoz Broth) oluşturduğu en son asitlik, karbonhidrat fermantasyon testi (API Strep 50 ve API 50 CHL) ve yağ asidi profili Sherlock Tanımlama Sistemi (MIS) gibi teknikler kullanılarak bakterilerin tanısı yapılmıştır.

3.2.3.1. Gram ve Spor Boyama

Gram boyama için izole edilen bakterinin genç kültürleri (18-24 saatlik), spor boyama için ise karbonhidrat içeriği azaltılmış besiyerinde geliştirilen yaşlı kültürleri kullanılmıştır. Gram boyama analizinde pozitif kontrol olarak *Lactobacillus plantarum* ve *E. coli*, spor boyama için de pozitif kontrol olarak *Bacillus cereus* kullanılmıştır (Temiz, 2000).

3.2.3.2. Voges-Proskauer ve İndol Testi

Voges-Proskauer testi için bakteri izolatu glikoz-fosfat besiyerine inoküle edildikten sonra 37°C'de 2 gün inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda tüplerin üzerine α -naftol (6 g α -naftol/100 ml % 95'lik etanol) ve KOH (16 g KOH/100 ml saf su) çözeltisi ilave edilmiştir. Kuvvetlice çalkalanan (20 saniye) tüplerde 5 dakika içerisindeki kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). Pozitif kontrol olarak *E. coli* kullanılmıştır. İndol analizi için tripton besiyerine bakteri izolatu aşılandıktan sonra 37°C'de 2 gün inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda kültüre Kovac's ayracı (0,5 mL) katılmıştır. Kültür sıvısının üst kısmında kırmızı renkli halkanın oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). *E. coli* biyotip I pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.3.3. Hemoliz ve Katalaz Testi

MRS besiyerinde 18-24 saat geliştirilmiş bakteriden öze yardımı ile örnek alınarak kanlı agar'a sürülmüş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kolonilerinin etrafında opak bir zon oluşmuşsa β -hemoliz; bulanık ve yeşilimsi zona α -hemoliz, zon oluşmamışsa γ -hemoliz olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). Pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* kullanılmıştır. Katalaz analizi için MRS agar'da geliştirilmiş bakteri kolonileri üzerine hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂'ten 1 mL) ilave edilmiş ve gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif olarak kabul edilmiştir (Temiz, 2000). Pozitif kontrol olarak kullanılan bakteri *S. aureus*'tur.

3.2.3.4. Jelatin Hidrolizi Testi

İnhibisyon aktivitesine sahip bakteri % 10-15 oranında jelatin içeren Nutrient broth besiyerine saplama ekim yapılmış ve tüpler 20-25°C'de 10-30 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. Besiyerinde sıvılaşma meydana gelip gelmediği her gün kontrol edilmiştir (Temiz, 2000). Negatif kontrol olarak ekim yapılmamış besiyeri, pozitif kontrol olarak da *Bacillus subtilis* içeren besiyeri kullanılmıştır.

3.2.3.5. Bakterilerin Gelişebildiği Sıcaklık, pH ve NaCl Aralıklarının Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktiviteye sahip bakteri MRS sıvı besiyerine % 1 oranında aşılacak 4, 10, 30, 37, 40, 45, 50 ve 55°C'de inkübasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Bakterinin gelişme pH aralıklarını belirlemek için pH'sı 3,0, 4,0, 4,4, 6,0, 8,0, 9,2 ve 9,6'ya fosforik asit ve NaOH (5 M ve 0,01 M) kullanılarak ayarlanan MRS sıvı besiyerlerine % 1 oranında ilave edilmiş ve 32°C'de inkübe edilmiştir. Her iki analizde inkübasyon işleminin 24. ve 48. saatlerinde örnekler alınarak 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Perkin Elmer UV/VIS Spektrofotometre Lambda EZ) okuma yapılmıştır. Absorbans değeri artanlar pozitif, absorbans değeri değişmeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Axelsson, 1993). Bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Farklı oranlarda tuz içeren (% 3,0, 4,0, 6,5 ve 10) MRS besiyerine test bakterisi (% 1) katıldıktan sonra 32°C'de inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda örneklerin absorbans değeri belirlenmiştir (Axelsson, 1993). Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS besiyeri, pozitif kontrol olarak ise tuz içermeyen ancak bakteri katılmış MRS besiyeri kullanılmıştır.

3.2.3.6. Hareketlilik Testi

MRS besiyerinde geliştirilen test bakterisi yumuşak agarlı (% 0,8) MRS besiyerine iğne öze ile saplama ekim yapılmış ve 37°C'de 48 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu sürenin sonunda inokülasyon hattının yanlarına doğru yayılmış, bulanıklık şeklinde

üreme görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000). Pozitif kontrol bakterisi olarak *Proteus mirabilis* kullanılmıştır.

3.2.3.7. Glikoz Broth Besiyerinde ve Sütte Asit Üretimi

Glikoz Broth besiyerine % 1 oranında izole edilen bakteri inoküle edilmiş ve 32°C'de 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi sonunda kültür ortamının pH değeri belirlenmiştir. Sütte asit üretimi testi için de UHT süte % 1 oranında bakteri katıldıktan sonra 37°C'de inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işleminin belirli aralıklarında (6, 16 ve 24. saat) örnek alınıp pH metre ile pH değeri ölçülmüştür.

3.2.3.8. Karbonhidrat Fermantasyon ve Yağ Asidi Profili Testleri

İnhibitör aktiviteye sahip bakterinin çeşitli karbonhidrat kaynaklarını kullanım kabiliyetleri API strep 20 ve API 50 CHL fermantasyon testi kullanılarak TÜBİTAK Atal'da yaptırılmıştır. İzolatların yağ asidi profilleri Sherlock Tanımlama Sistemi (MIS) kullanılarak Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi tarafından yaptırılarak belirlenmiştir.

3.2.4. Bakteriyosinin Karakterize Edilmesi

3.2.4.1. Kaba Bakteriyosin Hazırlanması

Peynirden izole edilen bakteri % 0,1 oranında MRS sıvı besiyerine (1 L) inoküle edildikten sonra bakteri 32°C'de 15-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kültürü santrifüj edildikten (8000 x g'de 20 dakika) sonra supernatant kısmı toplanmıştır. Supernatant, 0,45 µm gözenek çaplı membran filtre ile (Milipore) sterilize edildikten sonra dondurulup liyofilizasyon yöntemi ile kurutulmuştur.

3.2.4.2. Bakteriyosinin Antimikrobiyal Aktivitesi ve Spektrumu

Hazırlanan kaba bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesi ve inhibitör spektrumu Agar-Spot yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Mayr-Harting ve ark., 1972). Aktivite arbitrary ünite (AU) olarak ifade edilmiştir. Arbitrary ünite, inhibisyon aktivitesi gösteren en son dilüsyonun tersi şeklinde tanımlanmaktadır. Aktivite ve antimikrobiyal spektrumunu testi için bakteriyosin örnekleri iki kat seyreltilip (1/2, 1/4, 1/8 vs.) dilüsyonları hazırlanmış ve her dilüsyondan 20 µl alınarak nokta halinde indikatör mikroorganizma içeren yumuşak agarlı MRS (laktik asit bakteriler) veya BHI (diğer bakteriler) üzerine konulmuştur. Bu petriler 32°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda oluşan 2 mm veya daha büyük inhibisyon zonları pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.3. Enzimlerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine proteolitik ve proteolitik olmayan enzimlerin etkisini belirlemek için lipaz (Sigma), papain (Merck), pepsin (Merck), panreatin (Sigma), katalaz (Sigma – Aldrich), tripsin (Sigma) ve proteaz (Sigma) enzimleri kullanılmıştır. Belirtilen bu enzimler, fosfat tamponunda (4 mM, pH 7) konsantrasyonu 300 mg/ml olacak şekilde çözündürülüp, üzerine bakteriyosin supernatantı eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 37°C'de 2 saat inkübasyon işlemine tabi tutulduktan sonra bakteriyosin aktivitesi belirlenmiştir (Bhunia ve ark., 1988). Bakteriyosin içeren ve içermeyen fosfat tamponu, sadece enzim içeren fosfat tamponu negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.4.4. Bakteriyosin Aktivitesine Isıl İşlemin Etkisi

Isı stabilitesini belirlemek için bakteriyosin örnekleri (5'şer mL) 60 ve 70°C'de 30 dk, 80 ve 90°C'de 15 ve 30 dk, 110 ve 121°C'de 15 dk ısıl işlemine maruz bırakıldıktan sonra oda sıcaklığına soğutulmuş ve bunu takiben antimikrobiyal aktiviteleri

belirlenmiştir. Kontrol örneği olarak ısıl işlem uygulanmamış bakteriyosin kullanılmıştır.

3.2.4.5. Bakteriyosin Aktivitesine pH'nın Etkisi

Liyofilize kaba bakteriyosin örnekleri 4 mM fosfat tamponunda 250 mg/ml konsantrasyonda çözündürülmüş ve 11 eşit kısma bölünmüştür. Son hacimler eşit olacak şekilde pH'ları 2'den 12'ye kadar birer birim artırılarak NaOH veya fosforik asit (5 M) ile ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra örneklerin pH'sı 6,5'e ayarlanıp aktivite belirlenmiştir.

3.2.4.6. Bakteriyosin Aktivitesine Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi

Bakteriyosinin depolama stabilitesini belirlemek amacıyla liyofilize örnekler 25, 4, -20 ve -80°C' de 3 ay süreyle muhafaza edilmiş ve belirli aralıklarla örnekler alınarak antimikrobiyal aktivite testi yapılmıştır. Ayrıca liyofilizasyon işleminin bakteriyosin aktivitesine etkisi belirlemek için filtre sterilize edilmiş supernatantın aktivitesi belirlendikten sonra dondurulup liyofilizasyonla kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra steril fosfat tamponuyla çözündürüp başlangıç hacmine getirilip aktivitesi saptanmıştır.

3.2.4.7. Bazı Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

Bu analiz için organik çözücü olarak formaldehit (% 10), kloroform (% 10), aseton (% 10), propanol (% 10), metanol (% 10), etil alkol (% 25), hekzan (% 25) ve etil eter (% 25) çözeltileri kullanılmıştır. Bu çözeltilerin mililitresine 250 mg kaba bakteriyosin konulup çözündürüldükten sonra 25°C'de 1 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Bu sürenin sonunda örneklerin antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Bakteriyosin içermeyen organik çözücüler negatif, organik çözücü içermeyen bakteriyosin örnekleri ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Bhunja ve ark.,1988).

3.2.4.8. Bazı Deterjanların ve Kimyasal Maddelerin Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

Bakteriyosin supernatantlarına sodyum dodesil sülfat (SDS), tween 80, üre ve triton X-100 deterjanları % 1, etilen diamin tetra-asetik asit (EDTA) 0,1, 2,0 ve 5,0 mM konsantrasyonlarında ilave edildikten sonra 37°C'de 5 saat inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda örneklerin aktivitesi saptanmıştır. Negatif kontrol olarak bakteriyosin içermeyen kimyasalların çözeltileri, pozitif kontrol olarak da kimyasal içermeyen bakteriyosin supernatantı kullanılmıştır. β -merkaptetanolün bakteriyosin aktivitesine etkisini belirlemek için bakteriyosin supernatantına % 10 oranında β -merkaptetanol ilave edilerek 90°C'de 5 dk ısıtma işlemine tabi tutulmuş ve oda sıcaklığına soğutulduktan sonra bakteriyosin aktivitesi belirlenmiştir. Kontrol olarak ısıtma işlemi uygulanmış ve uygulanmamış bakteriyosin supernatantı, ısıtma işlemi uygulanmış β -merkaptetanol çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.5. Bakteriyosin Üretimine Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi

3.2.5.1. Bakteriyosin Üretimine İnokülüm Miktarının Etkisi

Bakteriyosin üretimine inokülüm miktarının etkisini saptamak için MRS sıvı besiyerine % 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 ve 2,5 oranlarında bakteri inoküle edilmiş ve 32°C'de inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işlemi süresince belirli aralıklarla steril koşullarda örnekler alınıp pH ve absorbans değerleri (600 nm) ile bakteriyosin aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.6.2. Gelişme Sıcaklığı ve Fazının Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkileri

Antimikrobiyal maddenin hangi gelişme sıcaklığı ve hangi gelişme fazında maksimum düzeyde üretildiğini saptamak için bakteri MRS besiyerine % 0,1 oranında inoküle edilip 25, 32 ve 37°C'de 48 saat süreyle inkübasyon işlemine tabi tutulmuş ve

inkübasyon işlemi sırasında belirli aralıklarla örnek alınıp bakteriyosin aktivitesi, pH'sı ve absorbans değeri (600 nm) belirlenmiştir.

3.2.6.3. Besiyerinin Başlangıç pH'sının Bakteriyosin Üretimine Etkisi

Başlangıç pH'sı 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 ve 8,5'e ayarlanan MRS sıvı besiyerine % 0,1 oranında bakteri ilave edilip 32°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminin 0, 12, 15, 18 ve 24. saatlerinde örnekler alınıp bakteriyosin aktivitesi, pH değeri ve absorbans değerleri (600 nm) tespit edilmiştir.

3.2.6.4. Farklı Besiyerlerinin Bakteriyosin Üretimine Etkisi

Farklı besiyerlerinin bakteriyosin üretimine etkisini belirlemek amacıyla BHI, PC (Plate Count), NB, NBE (Yeast ekstraktı içeren Nutrient Broth), M17 ve MRS besiyerleri kullanılmış ve hazırlanan besiyerlerine % 0,1 oranında bakteri ilave edilmiştir. Çalkalama işleminin bakteriyosin aktivitesi ve üretimi üzerindeki etkisinin saptamak için MRS ve M17 besiyerine inokülasyon yapıldıktan sonra 200 devir/dk yapan inkübatörde inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon işlemi (32°C'de) süresince belirli periyotlarla örnekler alınarak bakteriyosin aktivitesi, pH değeri ve absorbans değeri (600 nm) saptanmıştır.

3.2.7. Bakteriyosinin Kısmen Saflaştırılması ve Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

MRS besiyerinde geliştirilen kültür santrifüj (8500 g'de 30 dk) edildikten sonra hücre uzaklaştırılmış ve hücre içermeyen süpernatantın pH değeri 6,5'e ayarlanmıştır. Bunun takiben yavaş bir şekilde % 50 oranında amonyum sülfat katılarak 4°C'de gece boyunca karıştırılmıştır. Karışım santrifüj (4°C'de 8000 g/ 60 dk) edildikten sonra yüzeyde ve altta biriken pelet toplanarak 10 mL sodyum fosfat tamponunda (pH 6,5) çözündürülmüştür. Bu işlemin ardında 15 mL metanol/kloroform karışımı (1:2, v/v) ilave edilerek 4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra pelet

liyofilizasyon yöntemiyle kurutularak -75°C 'de muhafaza edilmiştir (Moreno ve ark., 2000).

Trisin-SDS-PAGE (Sodyum dodecil sülfat-poliakrilamid jel, %16) kullanılarak bakteriyosinin molekül ağırlığı saptanmıştır (Schagger ve Jagov 1987; Bhunia ve ark., 1991). Elektroforez işleminden sonra jel iki kısma bölünmüş ve jellerden birisi Coomassie blue G-250 ile 1 saat boyanıp boyayı uzaklaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Antimikrobiyal aktivite testi için diğer jel Coomassie blue G-250 ile 30 dk boyanıp 1,5 saat boyayı uzaklaştırmak için yıkama işlemine ve bunun ardından 3 saat süresince steril deiyonize su ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra jel büyük petri kutusunda bulunan MRS agar üzerine dikkatlice konulmuş ve üzerine *Lb. plantarum* içeren 45°C 'deki yumuşak MRS agar dökülmüştür. Bu işlemi takiben, 30°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.9. İstatiksel Değerlendirme

Araştırma 3 tekerürlü olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler $p<0,05$ seviyesinde varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılık ise LSD testi kullanılarak ($p<0,05$) belirlenmiştir (Anonim, 1995)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bakteriyosin Üreten Bakterinin İzole ve Tanımlanması

Bakteriyosin üreten bakterinin bulunması ve izole edilmesi için Tokat yöresinde geleneksel olarak üretilen beyaz peynirler materyal olarak kullanılmıştır. Starter kültür kullanılmaksızın ev koşullarında geleneksel yöntemlerle üretilen yöresel beyaz peynir örneğinde indikatör mikroorganizmalardan *Lb. plantarum* ve *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör aktiviteye sahip koloniler tespit edilmiştir. İnhibisyon zonu 2 mm'den büyük olan bakteri kolonileri öze ile alınarak MRS broth besiyerine aktarılmış ve 30°C'de 24 saat inkübe edilerek saf kültürleri hazırlanmıştır.

Saf kültürleri hazırlanan inhibitör aktiviteye sahip koloniler genel mikrobiyolojik testlere tabi tutulmuştur. Analizler sonucunda seçilen bakterinin Gram pozitif, hareketsiz, katalaz, hemoliz ve Voges Proskauer negatif, endospor oluşturmadığı, tek, ikili ve kısa zincir şeklinde kok olduğu, jelatini hidrolize edemediği, karbondioksit oluşturmadığı, % 40 safra tuzu ve %0,04 sodyum azid içeren besiyerinde gelişebildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Ayrıca 10-50°C, pH 4,4-9,6 ve %3,0-6,5 NaCl konsantrasyonunda gelişebildiği, ancak sıcaklık ve pH açısından belirtilen değerlerin altında ve üstünde, NaCl konsantrasyonu açısından ise %6,5'in üzerindeki konsantrasyonlarda gelişemediği gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Bakterinin karbonhidrat profilini belirlemek için API strep 20 ve API 50 CHL testlerine tabi tutulmuş ve sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir. API strep 20 ve API 50 CHL testleri sonucunda cins ve tür düzeyinde yüksek bir korelasyonla (%99) izolatın *Enterococcus faecium* olduğu belirlenmiştir. İzolatın yağ asidi profili analizi de söz konusu bakterinin *Enterococcus faecium* olduğunu doğrulamıştır (Çizelge 4.3). İzole edilen bakteri *Enterococcus faecium* HZ ve üretmiş olduğu antimikrobiyal bileşik enterosin HZ olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 4.1. *E. faecium* HZ'nin Genel Özellikleri

Analizler	İzolat
Gram Boyama	+
Şekli	Kok
Katalaz	-
Endospor	-
Hemoliz	-
Hareketlilik	-
İndol	-
Voges Proskauer	-
Jelatin Hidrolizi	-
Glikozdan CO ₂	-
%0,04 Na-azid	+
%40 safra tuzu	+
HS ₂ üretimi	-
pH Gelişme Aralığı	
pH 4,0	-
pH 4,4	+
pH 8,0	+
pH 9,2	+
pH 9,6	+
NaCl Gelişme Aralığı	
% 3 NaCl	+
% 4 NaCl	+
% 6,5 NaCl	+
%10 NaCl	-
Sıcaklık Gelişme Aralığı	
10°C	+
30°C	+
37°C	+
40°C	+
45°C	+
50°C	+
55°C	-
Sütte asit üretimi (37°C)	
6 saat	6,30
24 saat	5,75
Glikoz Broth besiyerinde oluşturulan en son asitlik	4,1

+ : Üreme var; - : Üreme yok

Çizelge 4.2. *E. faecium* HZ'nin Karbonhidrat Fermantasyon Profili

Karbonhidratlar	Sonuç	Karbonhidratlar	Sonuç
Gliserol	+	Maltoz	+
Eritritol	-	Laktoz	+
D-Arabinoz	-	Melibiyoz	-
L-Arabinoz	+	Sakkaroz	+
Riboz	+	Trehaloz	+
D-Ksiloz	-	İnulin	-
L-Ksiloz	-	Melezitoz	-
Adonitol	-	D-Rafinoz	-
α - Metil-xyloside	-	Nişasta	-
Galaktoz	+	Glikojen	-
D-Glikoz	+	Ksilitol	-
D-Fruktoz	+	β -Gentiobiyoz	-
D-Mannoz	+	D-Turanoz	-
L-Sorboz	-	D-Lyxose	-
Rhamnoz	-	D-Tagatoz	-
Dulsitol	-	D-Fukoz	-
İnnositol	-	L-Fukoz	-
Mannitol	+	D-Arabitol	-
Sorbitol	-	L-Arabitol	-
α - Metil-D-Mannosit	-	Glukonat	+
α - Metil-D- Glukozit	-	2-Keto-Glukonat	-
N-Asetil-Glukoamin	+	5-Keto-Glukonat	-
Amigdalın	+	Hippurat hidrolizi	B
Arbutin	+	Pyrolidonylarylamidaz	+
Eskulin	+	β -Galaktosidaz	-
Sallisin	+	Lösin aminopeptidaz	+
Sellobioz	+	Arjinin dihidrolaz	+

+ : Üreme var; - : Üreme yok; B: belirlenemedi.

Çizelge 4.3. *E. faecium* HZ'nin Yağ Asidi Profili¹

Yağ asidi	%
Laurik Asit (12:0)	0,93
Miristik Asit (14:0)	8,33
Sum in featured 3 (16:1 w7c/15 iso 2OH)	17,12
Sum in featured 3 (15:0 iso 2OH/16:1w7c)	2,10
Palmitik Asit (16:0)	21,26
Cis-vaksenik Asit (18:1 w7c)	37,67
Stearik Asit (18:0)	1,44
11-metil cis-vaksenik asit (18:1 w7c)	1,49
Oktadekonat (19:0 cyclo w8c)	9,64
Summed Feature 3 (16:1 w7c/15 iso 2OH;15:0 iso 2OH/16:1w7c)	19,22

¹ Sherlock Microbial Identification System (version 4.0), MIS Operating manual, 145 pp, MIDI, Inc, Newark, DE, USA

4.2. Enterosin HZ'nin Antimikrobiyal Aktivitesi ve Spektrumunun Belirlenmesi

Filtre ile sterilize edilmiş hücre içermeyen kültür süpernatantının *Lb. plantarum*'a karşı antimikrobiyal aktivitesinin 6400 AU/ml olduğu saptanmıştır. Enterosin HZ'nin antimikrobiyal spektrumu Çizelge 4.4'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü üzere enterosin HZ laktik asit bakterilerinden *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Leu. mesenteroides*, *E. faecalis*, *E. faecium* ile gıda kaynaklı patojen bakterilerden *L. monocytogenes* ve *B. cereus*'a karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Test edilen Gram-negatif bakteriler üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır.

E. faecium bakteriyosinlerinin genellikle antimikrobiyal spektrumlarının geniş olduğu, birçok LAB'leri ile Gram-pozitif patojen bakterilere örneğin bazı *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Brochothrix*, *Bacillus* suşlarına karşı aktif oldukları birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Cintas ve ark., 1998; Toit ve ark., 2000; Garcia ve ark., 2004; Achemchem ve ark., 2005; Ghrairi ve ark., 2008; Belgacem ve ark., 2008; Basanta ve ark., 2008). Bazı enterosinlerin ise Gram pozitif bakterilerin yanı sıra Gram-negatif bakterilere (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *Vibrio* spp., ve *P. aeruginosa*) karşı inhibitör etki gösterdiği rapor edilmektedir (Ananou ve ark., 2005; Kang ve Lee, 2005; Todorov ve Dicks, 2005).

4.3. Enterosin HZ Aktivitesine Enzimlerin Etkisi

Enzimlerin bakteriyosin aktivitesine etkisi Çizelge 4.5'de verilmiştir. Yapılan analiz sonucunda antimikrobiyal bileşiğin papain, tripsin ve pankreatine karşı duyarlı olduğu ve aktivitesini kaybettiği ancak pepsin, lipaz, amilaz ve katalaza karşı duyarlı olmadığı belirlenmiştir. Antimikrobiyal maddenin proteolitik enzimlere karşı duyarlı olması, protein yapısında ve dolayısıyla bir bakteriyosin olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.4. *E. faecium* HZ'nin Antimikrobiyal Spektrumu

Bakteri	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Lactobacillus plantarum</i> (RSKK)	+++
<i>Lactobacillus plantarum</i> (AÜ)	+++
<i>Enterococcus faecium</i> (RSKK-ATCC 9097)	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> (RSKK-ATCC 8043)	+++
<i>Enterococcus faecium</i> (RSKK)	+++
<i>Enterococcus dissidens</i> (AÜ)	+
<i>Lactococcus cremoris</i> (AÜ)	+++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (AÜ)	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> (AÜ)	++
<i>B. cereus</i> (AÜ)	++
<i>B. treurgensis</i> spp. <i>plateni</i> (AÜ)	+
<i>Listeria ivonovii</i> (RSKK)	-
<i>Listeria ivonovii</i> (AÜ)	-
<i>B. subtilis</i> (AÜ)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CAMP (AÜ)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (AÜ)	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (AÜ)	-
<i>Escherichia coli</i> Tip I (AÜ)	-
<i>Escherichia coli</i> (AÜ)	-
<i>Rhodococcus equi</i> (AÜ)	-
<i>Hafnia alvevi</i> (AÜ)	-
<i>Salmonella enteritidis</i> (AÜ)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 (AÜ)	-
<i>Camphylobacter jejuni</i> (AÜ)	-
<i>Citrobacter freundii</i> (AÜ)	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (AÜ)	-
<i>Proteus mirabilis</i> (AÜ)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 (AÜ)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (AÜ)	-

+: İnhibisyon pozitif (+++: inhibisyon çapı 20 mm'den büyük, ++: inhibisyon çapı 11-19 mm, +: inhibisyon çapı 4-10 mm); -: İnhibisyon negatif; AÜ: Ankara Üniversitesi; RSKK: Refik Saydam Hıfzısıhha Kültür Koleksiyonu

Çizelge 4.5. Enterosin HZ'nin aktivitesi üzerine farklı enzimlerin etkisi (n=3).

Enzimler	Bakteriyosin Aktivitesi
Tripsin (EC 132.650.8)	- (%0)
Papain (EC 3.4.22.2)	- (%0)
Pepsin (EC 3.4.23.1)	+ (%100)
Pankreatin (EC 232.468.9)	- (%0)
Lipaz (EC 3.1.1.3)	+ (%100)
Katalaz (EC 1.11.1.6)	+ (%100)
Alfa amilaz (EC 3.2.1.1)	+ (%100)

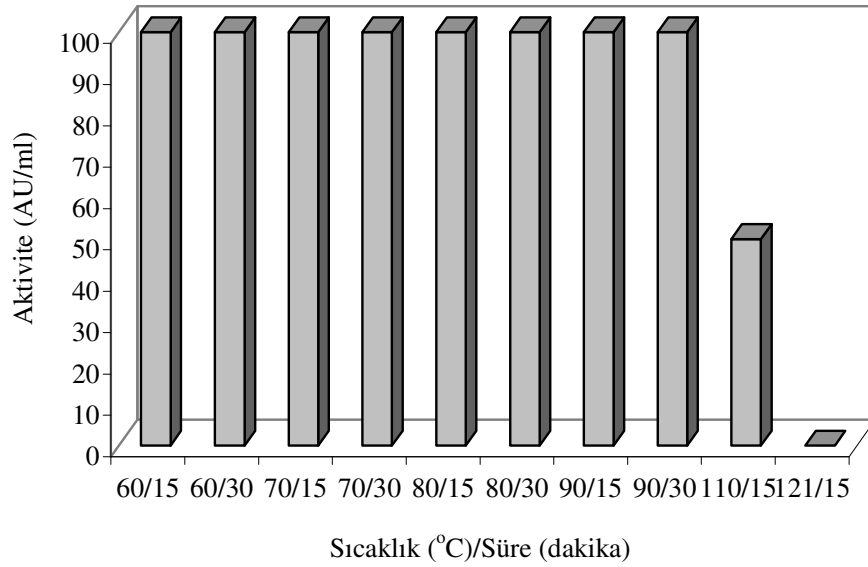
+ : inhibisyon var; - : inhibisyon yok

Antimikrobiyal maddenin katalaza karşı duyarlı olmaması inhibitör aktivitenin H₂O₂'den kaynaklanmadığını, lipaz ve amilaz enziminden etkilenmemesi de aktivitesinde karbonhidrat ve lipit bileşenlerinin etkisinin olmadığını göstermektedir. Enterosinlerin proteolitik enzimlerden bir veya birden fazlasına duyarlı olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Herranz ve ark., 2001; Sabia ve ark., 2002; Park ve ark., 2003; Kang ve Lee, 2005; Ghrairi ve ark., 2008). Enterosinler içinde sadece enterosin ON-157 ve enterosin N15'in proteolitik enzimlerin yanı sıra amilaza karşı da duyarlı olduğu bildirilmektedir (Ohmomo ve ark., 2000; Losteinkit ve ark., 2001).

4.4. Enterosin HZ Aktivitesine Isıl İşlemin Etkisi

Bakteriyosin aktivitesine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla bakteriyosin preparatı 60, 70, 80 ve 90°C'de 15 ve 30 dakika, 110 ve 121°C'de ise 15 dakika ısıtılma tabi tutulmuştur. Sonuçta bakteriyosinin 90°C'de 30 dakikaya kadar uygulanan ısıtılma işlemler sonucunda aktivitesini koruduğu, ancak 110 ve 121°C'de 15 dakika ısıtılma tabi tutulduğunda ise aktivitesinde sırasıyla %50 ve %100'lük bir azalmanın olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1). Yüksek derecede uygulanan ısıtılma (90°C/30 dk) dayanıklı olması bakteriyosinin yapısında ikincil ve üçüncül yapıların olmadığı ve daha çok globüler yapıda olduğunu ortaya koymaktadır.

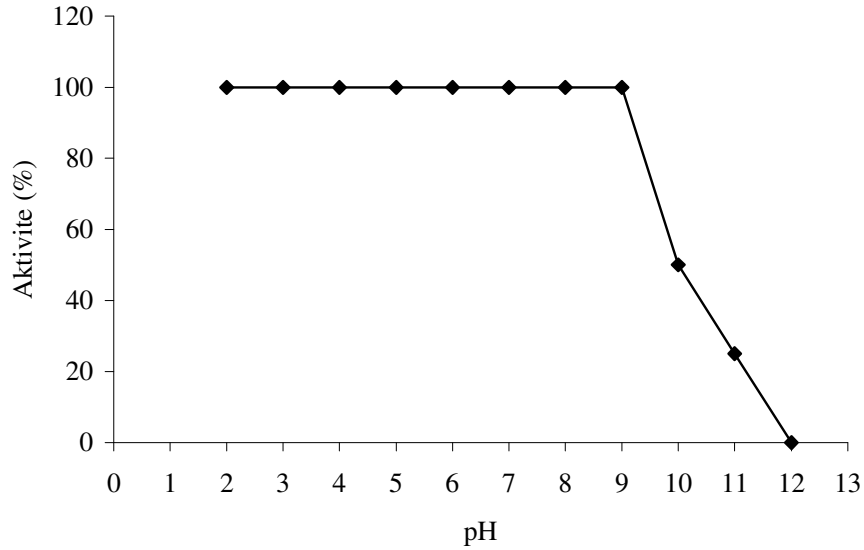
Ohmomo ve ark. (2000) enterosin ON-157'nin asidik (2-5 pH) koşullarda 100°C'de 30 dk ısıtılma dayanıklı olmasına karşın nötr ortamlarda (6-7 pH) ısıtılma (100°C'de 30 dk) duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Enterosin P21 (Herranz ve ark., 2001), enterosin JCM-5894T (Park ve ark., 2003), enterosin GM-1 (Kang ve Lee, 2005) 100°C'de 20-30 dk uygulanan ısıtılma dayanıklı olduğu belirtilmektedir. Ayrıca 100°C'de 60 dk'lık ısıtılma dayanıklı olan enterosin N15 bakteriyosinin 121°C'de 15 dk yapılan otoklavlama işleminden sonra aktivitesini tamamen kaybettiği (Losteinkit ve ark., 2001), enterosin USC-46 ve USC-51'in ise 100°C'de 60 dk ve 121°C'de 15 dk uygulanan ısıtılma dayanıklı olduğu kaydedilmektedir (Campos ve ark., 2006). Ghrairi ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada enterosin MMT21'in 100 °C'de 15 dk ısıtılma tabi tutulduğunda aktivitesini kaybettiğini gözlemlemişlerdir.



Şekil 4.1. Enterosin HZ'nin aktivitesi üzerine ısı işleminin etkisi (n=3).

4.5. Enterosin HZ'nin Aktivitesine pH'nın Etkisi

Bakteriyosin aktivitesine pH'nın etkisi Şekil 4.2'de sunulmuştur. Şekilde de görüldüğü üzere enterosin HZ biyolojik aktivitesini pH 2-9 arasındaki değerlerde koruduğu, aktivitesinde pH 10'da % 50, pH 11'de 75, pH 12'de ise % 100'lük bir kaybın olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar izoelektrik noktasının pH 11 ile 12 arasında olduğunu göstermektedir. Bakteriyosinlerden enterosin F58 pH 4-8 (Achemchem ve ark., 2005), enterosin ON-157 pH 2-7 (Ohmomo ve ark., 2000), enterosin A ve B'nin pH 2-11, enterosin N15 (Losteinkit ve ark., 2001), enterosin JCM-5804 (Park ve ark., 2003) ve enterosin MMT21 (Ghraiiri ve ark., 2008) pH 2-10 arasında aktivitesini koruduğu bildirilmektedir.

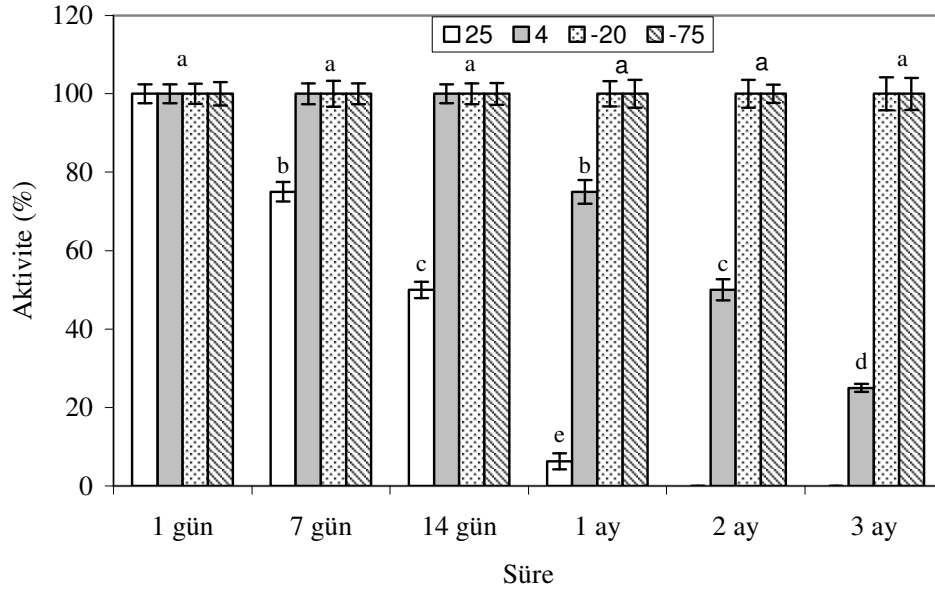


Şekil 4.2. Enterosin HZ'nin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi (n=3).

4.6. Enterosin HZ'nin Aktivitesi Üzerine Depolama Koşullarının Etkisi

Enterosin HZ'nin aktivitesi üzerine depolama sıcaklığı ve süresinin etkisini belirlemek için liyofilize edilmiş bakteriyosin örnekleri kullanılmış ve analiz sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.4'te sunulmuştur. Şekilde görüldüğü üzere enterosin HZ liyofilize formda -20 ve -80°C'de depolandığında 3 ay süresince aktivitesini koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3). Ancak 25°C'de muhafaza edildiğinde depolamanın 1. ayında aktivitesini %94, 4°C'de depolandığında bu sürenin sonunda %25, 3. ayın sonunda ise %75 oranında kaybettiği gözlenmiştir. Ayrıca, liyofilizasyon ve donma-çözme işlemlerinin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Marekova ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada *E. faecium* EK13'ün ürettiği bakteriyosinin 4 ve -20°C'lik depolamalarda stabilitesini uzun süre koruduğu saptanmıştır. Enterosin A, B ve EK 13'ün liyofilizasyon işleminden etkilenmediği ve düşük derecelerde depolama koşullarında (-20 ve -80°C) aktivitesini uzun süre muhafaza ettiği belirtilmektedir (Herranz ve ark., 2001; Nes ve ark., 2003).



Şekil 4.3. Liyofilize enterosin HZ'nin depolama stabilitesi (n=3). Aynı harfli ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir ($P>0.05$).

4.7. Enterosin HZ Aktivitesine Organik Çözücülerin Etkisi

E. faecium'un biyosentezlediği enterosin HZ'nin test edilen organik çözücülere karşı dayanıklı olduğu ve dolayısıyla aktivitesini muhafaza ettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Enterosin HZ'nin organik çözücülerden etkilenmemesi inhibitör aktivitesinden sorumlu olan bölgede karbonhidrat ya da lipit türevli bileşenlerin olmadığını göstermektedir.

LAB'leri tarafından üretilen birçok bakteriyosinlerin organik çözücülere karşı dayanıklı olduğu bulunmuştur (Ray, 1992; Yildirim ve Johnson, 1998; Lee ve Paik, 2001; Pirzada ve ark., 2000).

Çizelge 4.6. Enterosin HZ'nin aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi (n=3).

Organik Çözücü	Bakteriyosin içermeyen organik çözücüler	Bakteriyosin Aktivitesi (AU/mL)
Formaldehit (%10)	+	6400
Isopropil Alkol (%10)	-	6400
Aseton (%10)	-	6400
Metanol (%10)	-	6400
Kloroform (%10)	-	6400
Etil Eter (%25)	-	6400
Hekzan (%25)	-	6400
Etil Alkol (%25)	-	6400

Organik çözücü içermeyen bakteriyosin aktivitesi (AU/ml): 6400

+ : inhibisyon var - : inhibisyon yok

4.8. Bazı Deterjanların ve Kimyasal Maddelerin Enterosin HZ Aktivitesine Etkisi

Deterjanların bakteriyosinin aktivitesi üzerine etkisi aktif molekülün yapısı hakkında bilgi vermektedir. Anyonik deterjanlar proteinlerin doğal yapılarındaki hidrofobik merkezle kompleks oluşturarak proteinin açılmasına ve üç boyutlu yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Deterjan uygulaması ile bakteriyosin aktivitesinde bir kayıp meydana gelmesi, bakteriyosinin kısmi denatürasyonu ya da aktivitesi üzerinde stabilizasyon etkisi olan diğer moleküllerle birlikteliğinin bozulmasından kaynaklanmaktadır (Ivanova ve ark., 1998). EDTA, bakteriyosin aktivitesinde rol oynayan divalent katyonlarla kompleks oluşturarak bakteriyosin aktivitesini olumsuz yönde etkileyebileceği gibi hücre membranına zarar vererek bakteriyosinin etkisini kolaylaştırabilmektedir. β -merkaptetanol ise bakteriyosin yapısında bulunan ve aktivitesinde rol oynayan olası disülfid bağlarını kırarak bakteriyosin aktivitesinin azalmasına yada tamamen kaybolmasına neden olmaktadır (Hammes ve ark., 1999).

Enterosin HZ deterjanlardan SDS, üre, Tween 80 ve Triton X-100 ile kelatlaştırıcı madde olan EDTA ve β -merkaptetanolla muamele edildiğinde aktivitesini muhafaza ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Elde edilen bu sonuçlardan, bakteriyosinin yapısında ikincil ve üçüncül yapıların olmadığı ve ayrıca aktif bölgesinin hidrofobik

nitelikte olmadığı anlaşılmaktadır. EDTA'nın bakteriyosin aktivitesini etkilememesi ise divalent katyonların inhibitör etki üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

Galvez ve ark. (1998) *E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97'nin SDS, tween 80, EDTA ve β -merkaptetanolden etkilenmediğini göstermişlerdir. *E. mundtii* ST15 tarafından üretilen bakteriyosinin Triton X-114E duyarlı olduğu, fakat Triton X-100, SDS, Tween 20, Tween 80, üre ve EDTA'dan etkilenmediği bildirilmektedir (De Kwaadsteniet ve ark., 2005).

4.9. Gelişme Sıcaklığı ve Gelişme Fazının Enterosin HZ Üretimi Üzerine Etkisi

İnkübasyon sıcaklığı ve gelişme fazının enterosin HZ üretimi ve aktivitesi üzerine etkisini saptamak için *E. faecium* HZ MRS besiyerinde 25, 32 ve 37 °C'de 72 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Analiz sonucunda, *E. faecium* HZ'nin 25°C'ye göre 32 ve 37°C'de daha iyi geliştiği belirlenmiştir (Şekil 4.4). Bakteriyosin üretimi ve aktivitesi açısından incelendiğinde ise, 32 ve 37°C inkübasyon koşullarında enterosin HZ üretiminin üretici bakterinin lag fazında başladığı ve logaritmik fazda (8-12. saatleri) maksimum düzeye (3200 AU/ml) ulaştığı belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte bakteriyosin aktivitesinde %50'lik bir azalma olduğu bulunmuştur. İnkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte bakteriyosin aktivitesinin azalmasının nedeni üretici bakteri tarafından ortama salgılanan ekstraselüler proteolitik enzimler ile bakteriyosinin üretici bakteriye adsorpsiyonudur.

Bir çalışmada *E. faecium* USC-46 ve *E. mundtii* USC-51'in gelişimlerinin durgun fazında maksimum düzeyde enterosin ürettiği belirlenmiştir (Campos ve ark., 2006). Toit ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları tarafından enterosin üretiminin erken logaritmik gelişme fazında başladığı ve maksimum miktarda üretiminin ise durgun fazın başlangıcında olduğunu saptanmışlardır. Enterosin ON-157,P21, RZS-C5, F58, logaritmik fazın sonuna doğru maksimum düzeyde üretildiği tespit edilmiştir (Ohmomo ve ark., 2000; Herranz ve ark., 2001; Leroy ve ark., 2003; Achemchem ve ark., 2005).

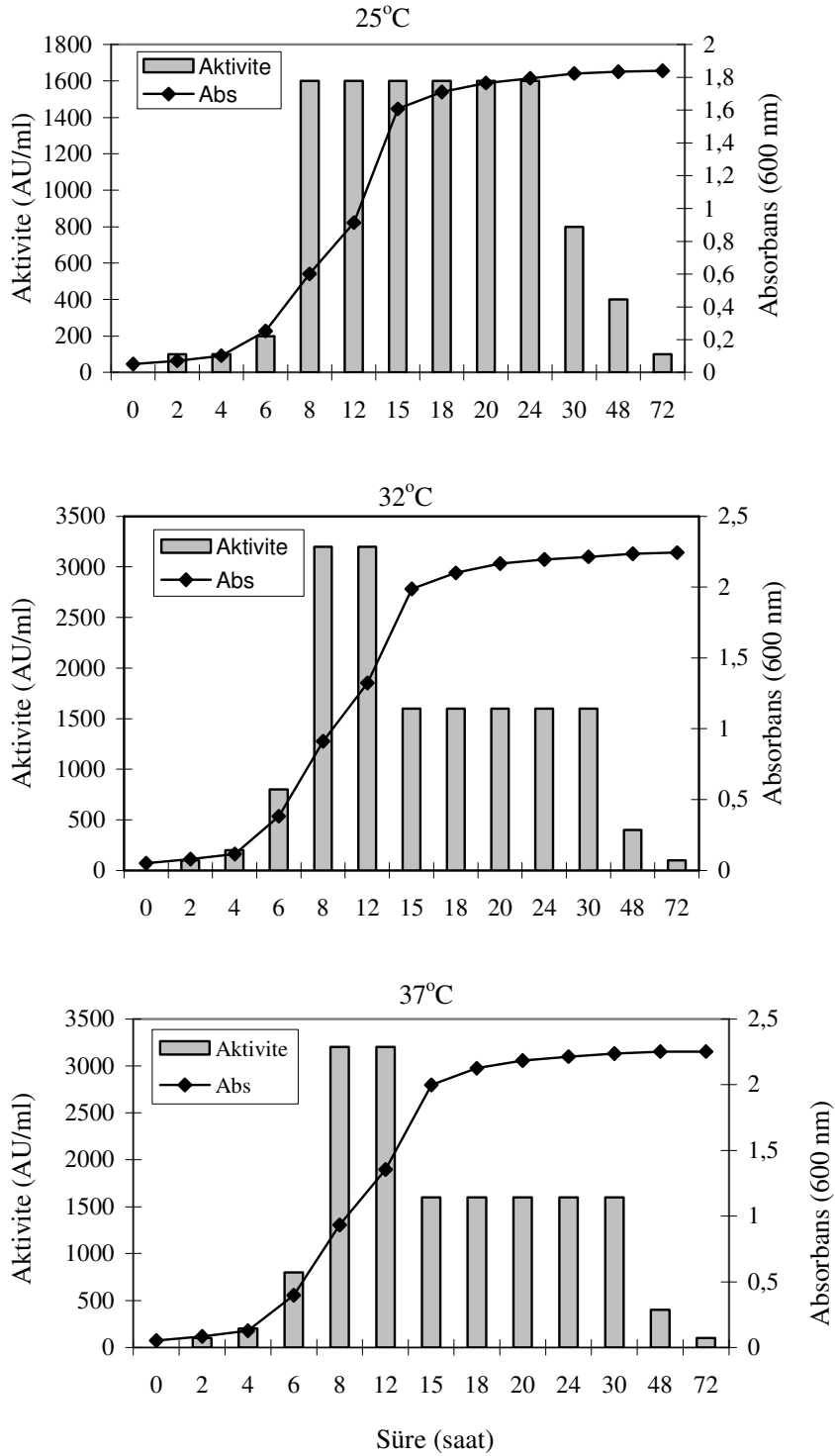
Çizelge 4.7. Enterosin HZ'nin aktivitesi üzerine bazı deterjan ve kimyasalların etkisi (n=4).

Deterjan ve Kimyasallar	Bakteriyosin İçermeyen Deterjan Ve Kimyasalların İnhibisyon Etkisi	Bakteriyosin Aktivitesi (%)
SDS (% 1)	-	100
Tween 80 (% 1)	-	100
Triton X-100 (% 1)	-	100
Üre (% 1)	-	100
EDTA		
0,1 mM	-	100
2,0 mM	-	100
50,0 mM	-	100
1,0 M	-	100
β-merkaptöetanol (% 10)	-	100

+ : inhibisyon var - : inhibisyon yok

4.10. Enterosin HZ Üretimi Üzerine Farklı Besiyerleri, İnokülüm Miktarı ve Başlangıç pH'sının Etkisi

Enterosin HZ üretimi üzerine besiyerinin etkisini belirlemek amacıyla de Mann Rogosa Sharpe (MRS), M17, Nutrient broth (NB), maya ekstraktı içeren Nutrien Broth (NB-E), Brain Hearth Infusion (BHI) ve Plate Count (PC) besiyerleri kullanılmıştır. Analiz sonucunda, enterosin HZ'nin besin içeriği açısından oldukça zengin ve laktik asit bakterilerin gelişiminde kullanılan kompleks MRS ve M17 besiyerlerinde diğerlerine göre daha iyi geliştiği ve yüksek düzeyde bakteriyosin ürettiği tespit edilmiş; ancak enterosin üretiminin M17 besiyeri kullanıldığında maksimum düzeye ulaştığı saptanmıştır (Şekil 4.5). Ayrıca üretici bakteri olan *E. faecium* HZ'nin MRS ve M17 besiyerlerinde yoğun bir şekilde geliştiği de belirlenmiştir. Çalkalama işleminin bakteriyosin üretimi üzerine etkisini belirlemek için MRS (MRS-Ç) ve M17 (M17-Ç) besiyerleri kullanılarak inkübasyon işlemi çalkalamalı inkübatörde (200 devir/dakika) gerçekleştirilmiştir. Sonuçta, inkübasyon işleminin 200 devir/dakikada yapılması her iki



Şekil 4.4. Farklı gelişme sıcaklıkları ve gelişme fazının enterosin HZ üretimi ve aktivitesi üzerine etkisi (n=3).

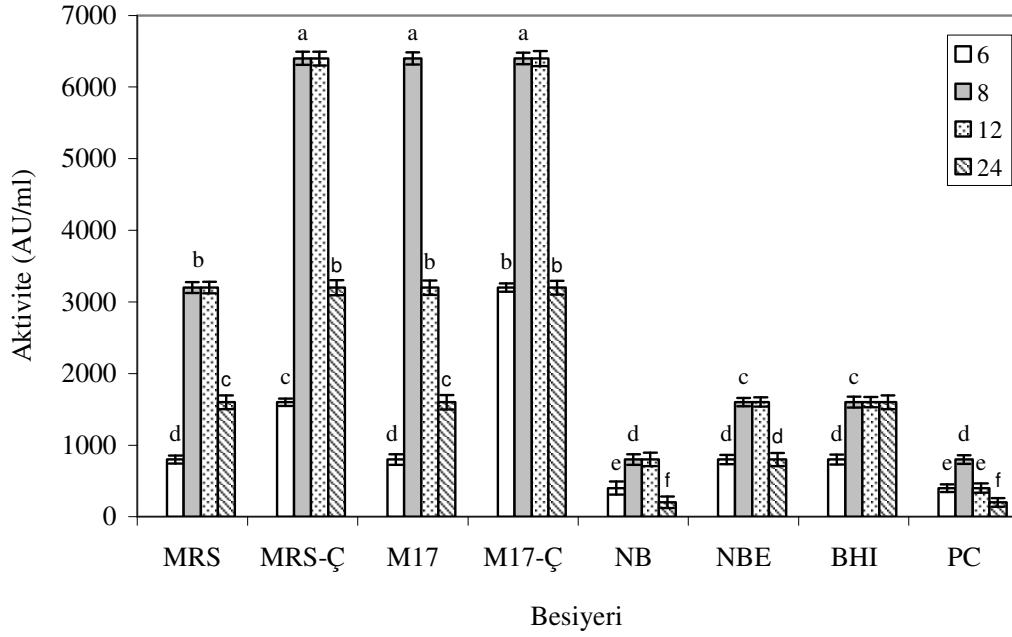
besiyerinde bakteriyosin aktivitesini iki kat artırdığı (6400 AU/ml) tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

İnokülüm miktarının enterosin HZ üretimi ve aktivitesi üzerine etkisini ortaya koymak için değişik düzeylerde (%0,05-2,5) üretici bakteri MRS besiyerine ilave edilip bakteriyosin üretiminin maksimum olduğu 32°C'de 24 h inkübe edilmiştir. İnokülüm miktarı % 0,1 ve 0,5 düzeyinde kullanıldığında enterosin HZ üretiminin maksimum düzeyde olduğu ve stabilitesini daha uzun süre korudu belirlenmiştir (Şekil 4.6).

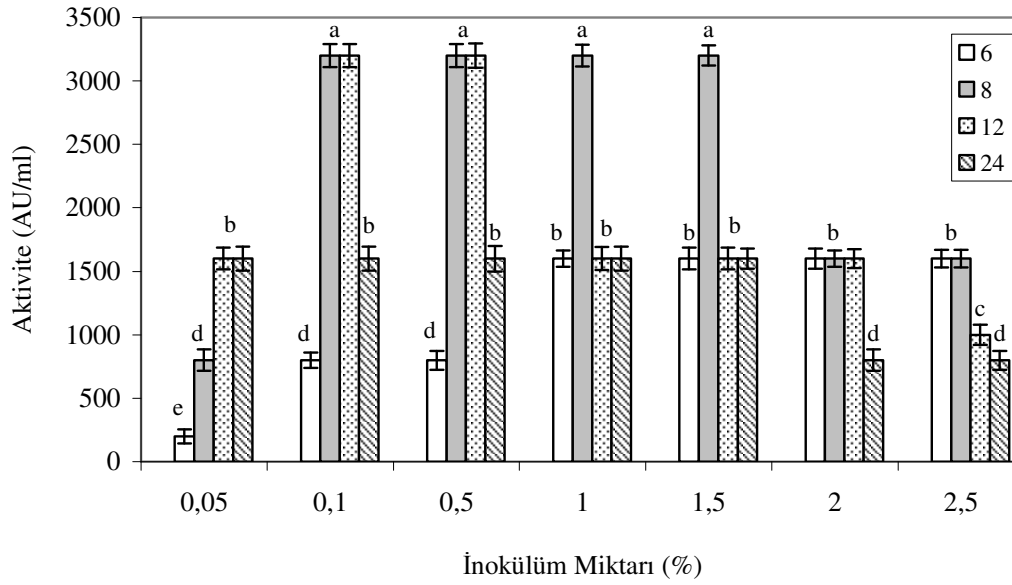
Kullanılan besiyeri başlangıç pH'sının hem *E. faecium* HZ'nin gelişimi hem de enterosin HZ'nin üretimi üzerine önemli bir etkisinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7). MRS besiyeri pH'sı nötral yani 6,5-7,0 pH değerlerde olduğu zaman *E. faecium* HZ'nin yoğun bir şekilde geliştiği ve enterosin HZ üretiminin arttığı ve özellikle inkübasyon işleminin 8 ile 12. saatinde maksimum düzeye ulaştığı saptanmıştır. pH 7,0'den yüksek olduğunda söz konusu üretici bakteri gelişiminin iyi olmasına karşın bakteriyosin üretiminin daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Düşük başlangıç pH (5,0-5,5) değerlerinde ise gerek bakteri gelişiminin gerekse enterosin HZ üretiminin oldukça düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir.

E. mundtii'nin 45°C haricinde, gelişme sıcaklığın bakteriyosin üretimi ve aktivitesi üzerinde belirli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Settanni ve ark., 2008).

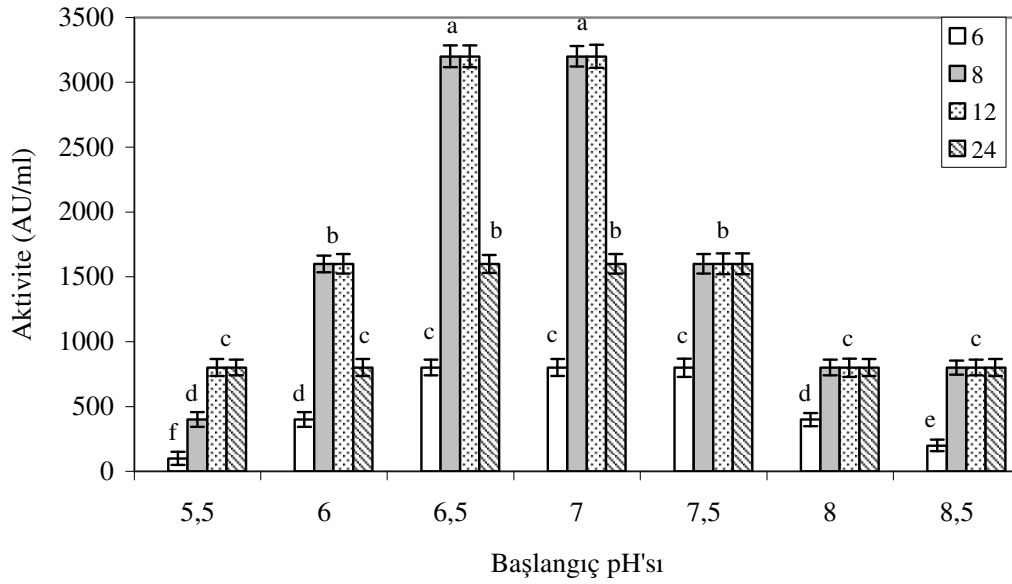
E. faecium GM-1'in besiyeri olarak MRS, başlangıç pH'sı 6,0-6,5 ve inkübasyon sıcaklığı 30-40°C (Kang ve Lee, 2005), *E. faecium* RZS C5 suşunun ise 6,5 pH ve 20-35°C inkübasyon sıcaklığında maksimum düzeyde bakteriyosin ürettiği belirlenmiştir (Leroy ve Vuyst, 2002). Enterosin ON-157 37°C'de, enterosin F58'in 30°C'de MRS besiyerinde maksimum düzeyde üretildiği saptanmıştır (Ohmomo ve ark., 2000; Achemchem ve ark., 2005). Bakteriyosin aktivitesinin besiyeri olarak M17L (%3 laktoz), inkübasyon sıcaklığı 30°C ve pH'sı 6,0 kullanıldığında erken durgun gelişme fazında maksimum düzeye ulaştığı saptanmıştır (Cheigh ve ark., 2002).



Şekil 4.5. Farklı besiyerlerin enterosin HZ-10'nin üretimi üzerine etkisi (n=3). M17-Ç ve MRS-Ç çalkalama işleminin uygulandığını ifade etmektedir. Aynı harfli ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir (P>0,05).



Şekil 4.6. İnokülüm miktarının enterosin HZ'nin üretimi üzerine etkisi (n=3). Aynı harfli ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir (P>0,05).

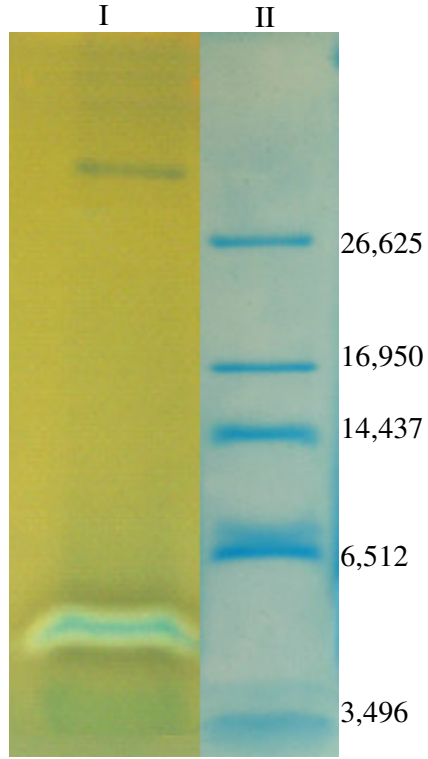


Şekil 4.7. Besiyeri başlangıç pH değerinin enterosin HZ üretimi üzerine etkisi (n=3). Besiyeri olarak MRS, inkübasyon sıcaklığı ise 32°C kullanılmıştır. Aynı harfli ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir (P>0,05).

4.11. Enterosin HZ'nin Molekül Ağırlığı

Tuzla ve metanol/kloroformla çöktürme ile kısmen saflaştırılan enterosin HZ'nin molekül ağırlığını belirlemek amacıyla % 16 trisin-SDS-PAGE kullanılmıştır. Boyama ve boya giderme işlemlerinden sonra jelde enterosin HZ'nin yüklendiği kısımdaki bantlardan hangisinin antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğunu saptamak için *Lb. plantarum*'a karşı antimikrobiyal aktivite testi yapılmıştır. Analiz sonucunda molekül ağırlığı 6512 ile 3496 Da arasında olan bandın inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan hesaplama sonucunda enterosin HZ'nin molekül ağırlığının yaklaşık 4500 Da olduğu tespit edilmiştir.

Şu ana kadar tespit edilen *E. faecium* tarafından sentezlenen bakteriyosinlerin molekül ağırlıklarının yaklaşık 2,5-6,0 kDa arasında olduğu gözlenmiştir (Ohmomo ve ark., 2000; Moreno ve ark., 2002; Foulque' Moreno ve ark., 2003; Park ve ark., 2003; Chen ve ark., 2007; Ghrairi ve ark., 2008).



Şekil 4.8. Enterosin HZ'nin trisin-SDS-PAGE jeli. I. sütun, enterosin HZ'nin *Lb. plantarum*'a karşı inhibitör etkisini gösteren trisin-SDS-PAGE jeli; II. sütun, düşük moleküler ağırlıklı standart (BioRad).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tokat yöresinde geleneksel olarak üretilen beyaz peynirden bakteriyosin üreten bakterinin tanımlanması ve bakteriyosinin karakterize edilmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. Yöresel bir peynirde indikatör mikroorganizmalardan LAB'leri ve *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör aktiviteye sahip bakteri izole edilmiş ve tanımlanmıştır.
2. Analizler sonucunda, bakterinin Gram pozitif, hareketsiz, katalaz, endospor ve hemoliz negatif, Voges Proskauer negatif, tek, ikili ve kısa zincir şeklinde kok olduğu ve glikozu fermente edebildiği tespit edilmiştir. Ayrıca 10°C - 50°C'de, pH 4,4–9,6'da ve % 3,0 - 6,5 NaCl konsantrasyonunda gelişebildiği ancak sıcaklık ve pH açısından belirtilen değerlerin altında ve üstünde, NaCl konsantrasyonu açısından ise % 6.5'in üzerindeki konsantrasyonlarda gelişemediği tespit edilmiştir. Yağ asidi profili ve karbonhidrat fermantasyon profili analizleri yüksek bir korelasyonla bakterinin *Enterococcus faecium* olduğu belirlenmiş ve *Enterococcus faecium* HZ olarak isimlendirilmiştir.
3. *Enterococcus faecium* HZ'nin ürettiği antimikrobiyal maddenin proteolitik enzimlerden papain, tripsin ve pankreatine karşı duyarlı olduğu ve biyolojik aktivitesini kaybettiği, ancak pepsin, lipaz, amilaz ve katalaza karşı dayanıklı olduğu saptanmıştır. İnhibitör maddenin proteolitik enzimlere duyarlı olması bu bileşiğin protein tabiatında bir bakteriyosin olduğunu ortaya koymuştur. *E. faecium* HZ'nin ürettiği bakteriyosin enterosin HZ olarak adlandırılmıştır.
4. Enterosin HZ'nin LAB'den *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Leu. mesenteroides*, *E. faecalis*, *E. faecium* ile gıda kaynaklı patojen bakterilerden *L. monocytogenes* ve *B. cereus* karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Test edilen Gram-negatif bakterilere karşı etkili olmadığı bulunmuştur.
5. Bakteriyosinin 90°C'de 30 dk kadar uygulanan ısı işlemi sonucunda aktivitesini muhafaza ettiği, ancak 110 ve 121°C'de 15 dakika ısı işleme tabi tutulduğunda aktivitesinde sırasıyla %50 ve %100'lük bir azalmanın olduğu saptanmıştır.

6. Enterosin HZ'nin geniş bir pH aralığında (2-9) aktivitesini koruduğu, fakat aktivitesinde pH 10'da % 50, pH 11'de 75, pH 12'de ise % 100'lük bir kaybın olduğu tespit edilmiştir.
7. Enterosin HZ liyofilize formda -20 ve -80°C'de muhafaza edildiğinde test süresi olan 3 ay boyunca aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca liyofilizasyon ve donma-çözme işlemlerinin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı gözlenmiştir.
8. Enterosin HZ test edilen organik çözücüler (etanol, metanol, hekzan, klorofom, aseton, etil eter, isopropil alkol, formaldehit), deterjanlar (SDS, üre, Tween 80 ve Triton X-100), EDTA ve merkaptotanol ile muamele edildiğinde aktivitesinde herhangi bir azalma olmadığı belirlenmiştir.
9. Enterosin HZ'nin besiyeri olarak MRS, özellikle de M17, besiyeri başlangıç pH'sı 6,5-7,0, inkübasyon sıcaklığı 32-37°C, inokulum miktarı %0,1-0,5 kullanıldığında inkübasyon işleminin 8-12. saatleri arasında maksimum düzeyde üretildiği saptanmıştır. Ayrıca inkübasyon işleminde çalkalama işlemi (200 devir/dk) kullanıldığında enterosin üretimi ve aktivitesinin iki kat arttığı (6400 AU/ml) tespit edilmiştir.
10. Enterosin HZ'nin üretiminin ve aktivitesinin üretici bakterinin gelişme fazına da bağlı olduğu belirlenmiştir. Bakteriyosin üretiminin logaritmik gelişme fazının başında başladığı ve logaritmik fazın ortasına doğru (8 ve 12. saatlerde) maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte enterosin HZ'nin aktivitesinin azaldığı saptanmıştır.
11. Enterosin HZ'nin molekül ağırlığının yaklaşık 4500 Da olduğu belirlenmiştir.

Peynir, sosis gibi fermente ürünlerde, enterokoklar kullanıldıklarında organoleptik olarak farklı ürünlerin oluşmasını sağlamaktadırlar. Enterokokların gıdalardaki bu olumlu özellikleri dikkate alındığında bu çalışmada izole edilen ve bakteriyosin ürettiği belirlenen *E. faecium* HZ'nin farklı gıdalarda starter kültür, yardımcı kültür veya koruyucu kültür olarak kullanılması söz konusu olabilir. Özellikle *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus* gibi gıda kaynaklı patojenlere karşı inhibitör etki gösteren enterosin HZ'nin de gıdalarda direkt olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Aasen, I., Moretro, T., Katla, T., Axelson, L. ve Storro, I. 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 53, 159-166.
- Achemchem, F., Martinez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E. ve Maqueda, M. 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *J. Appl. Microbiol.*, 99, 141-150
- Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Galvez, A. ve Valdivia, E. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.*, 103, 179-190.
- Anonim, 1995. "User's Guide: Statistics", Version 6.12 Ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Axelsson, L.T., 1993. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In "Lactic Acid Bacteria", Ed: Salmina, S., Wright, A.V., Marcel Dekker Inc., USA, p. 1-63.
- Aymerich, M.T., Artigas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M. ve Hugas, M. 2000. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocin A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.*, 88 (4), 686-694.
- Basanta, A., Sanchez, J., Gomez-Sala, B., Herranz, C., Hernandez, P.E. ve Cintas, L.M. 2008. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer-spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. *Int. J. Food Microbiol.*, 125, 293-307.
- Bauer, R. ve Dicks, L.M.T. 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 101, 201-216.
- Belgacem, Z.B., Ferchichi, M., Prevost, H., Dousset, X. ve Manai, M. 2008. Screening for anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria from "Gueddid" a traditionally Tunisian fermented meat. *Meat Sci.*, 78, 513-521.
- Bhunja, A., Johnson, M.C. ve Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, 65, 261-268.
- Brötz, H. ve Sahl, H.G. 2000. New insights into the mechanism of action of lantibiotics—diverse biological effects by binding to the same molecular target. *J. Antimicrob. Chemother.*, 46, 1-6.
- Bruno, M.E.C. ve Montville, T.J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3003-3010.

- Campos, C.A., Rodriguez, O., Mata, P.C., Prado, M. ve Velazquez, J.B. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*psetta maxima*). *Food Research Int.*, 39, 356–364.
- Cheigh, C.I., Choi, H.J., Park, H., Kim, S.B., Kook, M.C., Kim, T.S., Hwang, J.K. ve Pyun, Y. R. 2002. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *J. Biotech.*, 95, 225-235.
- Chen, Y.S., Yanagida, F. ve Srionnual, S. 2007. Characteristics of bacteriocin-like inhibitory substances from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821 and D081833. *Lett. Appl. Microbiol.*, 44, 320–325.
- Chen, H. ve Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compre. Rev. Food Sci. Food Safety.*, 2, 82-100.
- Cleveland, J., Montville., J.T., Nes, F.I. ve Chikidas, L.M. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Microbial.*, 50, 1-17.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Harvarstein, L.S., Hernandez, P.E. ve Nes, I.F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin p, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4321-4330.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Fernandez, M. F. ve Hernandez, P. E. 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin 150, pediocin pa-1, nisin a and lactocin s against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.*, 15, 289-298.
- Cotter, P.D., Hill, C. ve Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews* 3, 777-788.
- Coventry, M.J., Gordon, J.B., Alexander, M., Hickey, M.W. ve Wan, J. 1996. A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1764-1769.
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H. ve Dicks, L.M.T., 2005. Characterization of a 3 944 Dalton bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 105, 433–444.
- De Vuyst, L. ve Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 194–199.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. ve Ross, P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extention. *Int. Dairy J.*, 16, 1058-1071.

- Devlieghere, F., Vermeiren, L. ve Debevere, J. 2004. New Preservation technologies: possibilities and limitations. *Int. Dairy J.*, 14, 273-285.
- Eckner, K. F. 1992. Bacteriocins and food applications. *Dairy Food Environment Sanit.*, 12, 204-209.
- Ennahar, S., Sonomoto, K. ve Ishizaki, A. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Bio. Bioeng.*, 87, 705-716.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. ve Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 85-106.
- Farias, M.E., Nunez De Kairuz, M., Sesma, F., Palacios, J., De Ruiz Holgado, A.P. ve Oliver, G. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin enterocin CRL35 during goat cheese making. *Milchwissensc.*, 54, 30- 32.
- FDA. 1988. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. *Federal Register.*, 53, 11247.
- Foulquie Moreno, M.R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J. ve De Vuyst, L. 2003. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 214-229.
- Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., ve De Vuyst, L., 2006. The Role and Application of Enterococci In Food and Health. *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. ve Holzapfel, W. H. 2003. Enterococci in foods a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 88, 105-122.
- Gálvez, A., Valdivia, E., Camafeita, H.A.E., Bueno, E.M.M.M. ve Maqueda, M. 1998. Isolation And characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch Microbiol.*, 171, 59-65.
- Garcia, M.T., Lucas, R., Abriouel, H., Omar, N. B., Perez, R., Grande, M.J., Canamero, M.M. ve Galvez, A. 2004. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 against '*Bacillus macroides*/*Bacillus maroccanus*' isolated from zucchini pure. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 731-737.
- Garneau, S., Martin, N. I. ve Vederas, J.C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.*, 84, 577-592.
- Ghraiiri, T., Frere, J., Berjeaud, J.M. ve Manai, M. 2008. Purification and characterisation of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*, 19, 162-169.
- Giraffa, G., Neviani, E. ve Torri Tarelli, G. 1994. Antilisterial activity by enterococci in a model predicting the temperature evolution of taleggio, an Italian soft cheese. *J. Dairy Sci.*, 77, 1176-1182.

- Giraffa, G., Picchioni, N., Neviani, E. ve Carminati, D. 1995. Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during taleggio cheesemaking and ripening. *Food Microbiol.*, 12, 301- 307.
- Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 163– 171.
- Grande, M.J., Lucas, R., Valdivia, E., Abriouel, H., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., Ben Omar, N. ve Gálvez, A. 2005. Stability of enterocin AS-48 in fruit and vegetable juices. *J. Food Prot.*, 68, 2085–2094.
- Gwen, M., 2006. Maintaining Freshness in Cultured Dairy Products. Cultured Dairy Products Conference Minneapolis. http://www.idfa.org/meetings/presentations/culturedairy06_meyer.pdf. (25.04.2007).
- Hammes, W.P., Ganzle, M.G. ve Weber, S. 1999. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, 46, 207-217.
- Havarstein, L.S., Diep, B.D. ve Nes, I.F. 1995. A family of bacteriocin abc transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.*, 16, 229-240.
- Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadhyay, S., Martinez, J.M., Rodriguez, J.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E. ve Cintas, L.M. 2001. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiol.*, 18 (2), 115-131.
- Holtzel, A., Ganzle, M.G., Nicholson, G.J., Hammes, W.P. ve Jung, G. 2000. The first low-molecular-weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic acid. *Angewandte Chemie. Int. Ed.* 39, 2766–2768.
- Howard, B.J., Keiser, J.F., Smith, T.F., Weissfeld, A.S. ve Tilton, R.C. 1993. *Clinical and Pathogenic Microbiology*. 2nd Edition. A.C.V. Mosby. Imprint Of Mosby Year Book Inc. St. Louis. 95.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Demirpençe, Y. ve Yıldırım, M. 2008. Enterokoklar: Biyokimyasal, fizyolojik ve fonksiyonel özellikleri ile patojenitesi. *Akademik Gıda*, 6, 16-26.
- Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T., Pantev, A., Danova, S. ve Dousset, X. 1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int. J. Food Microbiol.*, 42, 147–158.
- Jacob, F., Lwoff, A., Simonovitch, A. ve Wollman, E.L. 1953. Définition de quelques terms relatifs á la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur*, 84, 222-224.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. ve Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram positive bacteria, *Microbiol. Rev.*, 171-200.

- Kang, J.H. ve Lee, M.S. 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. J. Appl. Microbiol., 98, 1169–1176.
- Kayser, F.H. 2003. Safety aspects of Enterococci from the medical point of view. Int. J. Food Microbiol., 88,255– 262.
- Kazatelová, M. 2003. Antimicrobial metabolites of lactic acid bacteria. Bulletin Potravinárskeho Výskumu, Vol., 42, 67-73.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol., 12, 39-86.
- Klein, G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. Int. J. Food Microbiol., 88, 123-131.
- Koponen, O. 2004. Studies of producer self – protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*, (Doctoral Dissertation), Institute Of Biotech. And Department Of Appl. Chemistry And Microbiol., Helsinki.
- Lee, N.K. ve Paik, H.D. 2001. Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from jeot-gal. Food Microbiol., 18, 17-24.
- Leroy, F. ve Vuyst, L. 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. Int. J. Food Microbiol., 72, 155- 164.
- Leroy, F., Foulquie´ Moreno, M.R. ve De Vuyst, L. 2003. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. Int. J. Food Microbiol., 88, 235– 240.
- Losteinkit, C., Uchiyama, K., Ochi, S., Takaoka, T., Nagahisa, K. ve Shioya, S. 2001. Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. Bioscience And Bioeng., 91, 390-395.
- Marekova, M., Laukova, A., Devuyst, L., Skaugen, M. ve Nes, I.F. 2003. Partial characterization bacteriocins produced by enviromental strain *Enterococcus faecium* EK13. J. Appl. Micrabial., 94, 523-530.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J. ve Berkley, R.W. 1972. Methods For Studying Bacteriocins. In ‘Methods In Microbiology, Eds: J.R. Noris And N.W. Ribbons. Vol 7A. Pp. 315-442
- McAuliffe, O., Ross, R. P. ve Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiol. Rev., 25, 285-308.

- Montville, T. J. ve Winskowski, K., 1997. Biologically Based Preservation Systems And Probiotic Bacteria. In "Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers", Eds: M. P. Doyle, L.R. Beuchat & T. J. Montville. ASM, Washington D.C.
- Moreno, M.R.F., Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M. ve De Vuyst, L. 2002. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two mabacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. J. Appl. Microbiol., 92, 147-57.
- Nes, I.F., Marekova, M., Laukova, A., De Vuyst, L. ve Skaugen, M. 2003. Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. J. Appl. Microbiol., 94, 52-530.
- Nunez, M., Rodriguez, J.L., Garcia, E., Gaya, P. ve Medina, M. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. J. Appl. Microbiol., 83, 671-677.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisingprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M. ve Nakanishi, K. 2000. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. J. Appl. Microbiol., 88, 81-89.
- Ohmomo, S., Tanaka, O., Kitamoto, H.K., ve Cai, Y. 2002. Silage and microbial performance, old story but new problems. JARQ, 36(2), 59-71.
- Ogier, J.C., Serror, P. 2008. The enterococcus genus. Int. J. Food Microbiol., 126, 291-301.
- Park, S.H., Itoh, K. ve Fujisawa, T. 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. J. Appl. Microbiol., 95, 294-300.
- Pasteur, L. ve Joubert, F. 1877. Charbon et septicemie. C.R. Soc. Biol. Paris, 85, 101-115.
- Pirzada, Z.A., Syed, A.A., Khan, B.M. ve Rasool, S.A. 2000. Production and physico-chemical characterization of bacteriocins-like inhibitory substances from marine bacterium ZM81. Pakistan J.Biol. Sci., 7(12), 2026-2030.
- Ray, B. 1992. Nisin of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* as food biopreservative. In 'Food Biopreservatives of Microbial Origin', Eds: B. Ray and M.A. Daeschel, CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 209-257.
- Rodriguez, J.M, Martinez, M.I., Horn, N. ve Dodd, H.M., 2003. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Int. J. Food Micro., 80, 101-116.

- Røssland E., Langsrud T., Granum P.E. ve Sørhaug T., 2005. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 98, 193-200.
- Sabia, C., Manicari, G., Messi, P., De Niederhausern, S. ve Bondi, M. 2002. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from italian sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 75, 163- 170.
- Sabia, C., Messi, P., De Niederhausern, S., Manicardi, G. ve Bondi, M. 2004. Study of two bacteriocins produced by *E. casseliflavus* and *E. faecalis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38, 99-105.
- Sahl, H-G., Jack, R.W. ve Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, 230, 827-853.
- Schagger, H. ve Jagov, G.V. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Schleifer, K.H. ve Kilpper-Balz, R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 31-34.
- Settanni, L., Valmorri, S., Suzzi, G. ve Corsetti, A. 2008. The role of environmental factors and medium composition on bacteriocinlike inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. *Food Microbiol.*, 25, 722-728.
- Soomro, A.H., Masud T. ve Anwaar, K. 2002. Role of lactic acid bacteria (lab) in food preservation and human health – A Review. *Pakistan J. Nutrition* 1, 20-24.
- Steffen, T., 2005. Natural Dairy Safety in Dairy World. Food Protection Symposium Sao Polia, June 2005, Brazil.
- Stiles, M. E. ve Holzapfel, W. H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36, 1- 29.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. ve Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40, 722-756.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. III. Baskı. Hatiğoğlu Yayınevi. Ankara.
- Todorov, S.D. ve Dicks, L.M.T. 2005. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiol.*, 45(4), 312–322.

- Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T. ve Holzappel, W.H. 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. J. Appl. Microbiol., 88, 482-494.
- Työppönen, S., Petaja, E. ve Mattila-Sandholm, T. 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. Int. J. Food Microbiol., 83, 233-244.
- Wachsmann, M.B., Farias, M.E., Takeda, E., Sesma, F., De Ruiz Holgado, A.P., De Torres, R.A. ve Coto, C.E. 1999. Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpes viruses. Int. J. Antimic. Agents, 12, 293-299.
- Yang, R., Johnson, M.C. ve Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 58, 3355-3359.
- Yang, R. ve Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol., 11, 281-291.
- Yang, V.A. ve Clausen, C.A. 2004. Antifungal metabolites of lactobacilli. Proceedings from the Woodframe Housing Durability and Disaster Issues Conference, October 4-6, 2004. Las Vegas, Nevada, USA. Madison, WI : Forest Products Society, p. 307-311.
- Yıldırım, Z. ve Johnson, M.G. 1998. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. Lett. Appl. Microbiol., 26, 297-304.
- Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M., 2000. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakteristikleri. Süt mikrobiyolojisi ve katkı maddeleri sempozyumu, s. 247-253, 22-23 Mayıs 2000, Tekirdağ.
- Yoon, M.Y., Kim, Y.J. ve Hwang, H.J. 2008. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Cungkukjang, a fermented soy product. LWT 41, 925-933.

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Adı Soyadı : Harun BİLGİN
Doğum Tarihi ve Yer : Tokat/1982
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0506 294 00 73
e-mail : harunbilgin@mynet.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Gıda Mühendisi	Selçuk Üniversitesi	2004
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev