

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ganim Alin TÜREMİŞ

**KLİNİK ve GIDA KAYNAKLI ENTEROKOKLAR TARAFINDAN
ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNLERİN BAZI ÖZELLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2012

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK ve GIDA KAYNAKLI ENTEROKOKLAR TARAFINDAN
ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNLERİN BAZI ÖZELLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Ganim Alin TÜREMİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Tez .../.../... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof.Dr. Zerrin ERGİNKAYA
DANIŞMAN

.....
Prof.Dr. Hüseyin ERTEN
ÜYE

.....
Prof.Dr. Hatice K. GÜVENMEZ
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Selahattin SERİN
Enstitü Müdürü

**Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
Desteklenmiştir.**
Proje No: ZF2010YL83

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere
tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLİNİK ve GIDA KAYNAKLI ENTEROKOKLAR TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNLERİN BAZI ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Ganim Alin TÜREMİŞ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

Yıl: 2012, Sayfa: 95

Jüri : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

: Prof. Dr. Hüseyin ERTEN

: Prof. Dr. Hatice K. GÜVENMEZ

Bu çalışmada, 10 adet gıda kaynaklı ve 10 adet klinik kaynaklı enterokok suşlarının bakteriyosin üretebilme özellikleri ve elde edilen bakteriyosinlerin, *Listeria monocytogenes*'e karşı oluşturdukları inhibitör etkileri belirlenmiştir. Ayrıca, söz konusu bakteriyosinlerin, antimikrobiyel özellikleri üzerine, farklı sıcaklık ve pH'ların etkisi araştırılmıştır. Hem gıda, hem de klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin antimikrobiyel etkinlikleri Kirby-Bauer disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir.

20 adet enterokok suşundan elde edilen bakteriyosinin, 14'ünün, *Listeria monocytogenes*'in üremesini engellediği belirlenmiştir. Gıda ve klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerden, indikatör mikroorganizmaya karşı aktivite gösteren 14 adet (L13, YS1, AS1, JS1, A1, E5, NS1, 226, 227, 228, V98, V105, V188, V198) bakteriyosinin antimikrobiyel aktiviteleri üzerine, farklı sıcaklıkların ve pH'ların etkileri saptanmıştır. Farklı sıcaklık uygulamalarına tabi tutulan, gıda ve klinik kaynaklı bakteriyosinlerin çoğu 60, 70, 80, 90 ve 110°C'de 15 dakika *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Ancak, E5 ve V198 suşlarına ait bakteriyosinler, 110°C'de 15 dakikaya maruz bırakıldıklarında aktivitelerini tamamen kaybetmişlerdir. 121°C'de 15 dakika otoklav koşullarında yapılan ısı işlem uygulamasında ise, hem gıda, hem de klinik kaynaklı bütün bakteriyosinlerin inhibitör aktivitelerini tamamen kaybettikleri belirlenmiştir. Farklı pH uygulamalarında ise, bakteriyosinlerin çoğu pH 3, 5, 7, 9 ve 11'de inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Hem gıda, hem de klinik kaynaklı suşlardan elde edilen bakteriyosinlerin, en iyi antimikrobiyel etkilerinin nötral ortamda olduğu belirlenmiş olup, asidik ve bazik ortamlarda aktivitenin azaldığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyosin, enterokok, *Listeria monocytogenes*, antimikrobiyel.

ABSTRACT

MSc. THESIS

COMPARISON OF SOME PROPERTIES OF BACTERIOCINS PRODUCED BY ENTEROCOCCUS ISOLATED FROM CLINICAL AND FOOD SOURCES

Ganim Alin TÜREMİŞ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

Supervisor : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Year: 2012, Pages: 95

Jury : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Prof. Dr. Hüseyin ERTEN
: Prof. Dr. Hatice K. GÜVENMEZ

In this study, the bacteriocin producing properties and the inhibiting effects of the resulting bacteriocins against *Listeria monocytogenes* of 10 food origin and 10 clinical origin strains of enterococci were determined. In addition, antimicrobial properties of the bacteriocins, at different temperatures and pH values were investigated. Antimicrobial activity of bacteriocins of both the food origin and the clinic origin enterococcus strains was obtained by Kirby-Bauer disk diffusion method.

It was determined that 14 of 20 bacteriocins derived from Enterococcus strains, inhibited the growth of *Listeria monocytogenes*. Effects of different temperatures and pH values on antimicrobial activity of 14 bacteriocins (L13, YS1, AS1, JS1, A1, E5, NS1, 226, 227, 228, V98, V105, V188, V198) that show activity against indicator microorganism were determined. Bacteriocins subjected to different temperature applications. Most of the bacteriocins showed antimicrobial effect at 60, 70, 80, 90 and 110°C for 15 minutes against *Listeria monocytogenes*. However, bacteriocins of E5 and V198 strains are completely lost their activity when exposed to 110°C for 15 minutes. It was determined that both food and clinical origin bacteriocins lost their inhibitory activity at 121°C for 15 minutes of heat treatment at autoclave conditions. Bacteriocins subjected to different pH applications. Most of the bacteriocins showed inhibitory activity at pH 3, 5, 7, 9 and 11. It was determined that both food and clinical origin bacteriocins showed their best antimicrobial effect in neutral mediums and also it was detected that acidic and basic mediums decreased the activity.

Key Words: Bacteriocin, enterococci, *Listeria monocytogenes*, antimicrobial

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince çalışmalarımın her aşamasında değerli görüşlerini aldığım, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen, saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin geliştirilmesinde, değerli bilgi ve görüşlerini paylaşan, jüri üyelerim sayın Prof. Dr. Hüseyin ERTEN ve Prof. Dr. Hatice K. GÜVENMEZ'e,

Tez çalışmam sırasında, tezimin her aşamasında emeği geçen, zaman ayırıp sabırla çalışmamı takip eden, sık sık bilgi alışverişinde bulunduğum, ilgi, destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, değerli arkadaşım Ar. Gör. Emel ÜNAL'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında, birlikte keyifli anlar paylaştığım, yardımseverliğini ve dostluğunu hiçbir zaman esirgemeyen, hep gülümseyerek hatırlayacağım değerli arkadaşım Hatice ULUDAĞ'a,

Bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan, manevi desteğini hep hissettiren sevgili arkadaşım Öğrt. Gör. Selin KALKAN'a ve mikrobiyoloji laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, hayata umutla ve azimle tutunmamı sağlayan, bana hayallerimin peşinden gitmeyi öğreten ve bu yolda ilerlerken benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, hayatımın her aşamasında varlıklarıyla güven ve gurur duyduğum, sevgili annem Dilek BAYRAM'a ve sevgili babam Kurtuluş BAYRAM'a, varlığını hep yanımda hissettiğim, her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü sıkıntımı ve mutluluğumu paylaştığım canım kardeşim Adil BAYRAM'a,

Tanıdığım ilk günden itibaren hayatımın renklerini bir gökkuşağına çeviren, beni her konuda destekleyen, anlayışını ve her türlü yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, varlığı ile huzur ve mutluluk bulduğum, hayatımın en'leri sıralamasında hep ilk sıralarda yer alacak olan sevgili eşim Zafer TÜREMİŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Enterokoklar.....	7
2.1.1. Enterokokların Genel Özellikleri.....	7
2.1.2. <i>Enterococcus</i> 'ların Patojenitesi.....	11
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Genel Özellikleri.....	12
2.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Patojenitesi.....	13
2.3. Bakteriyosinler.....	14
2.3.1. Bakteriyosinlerin Tanımı.....	14
2.3.2. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması.....	14
2.3.3. Bakteriyosinlerin Biyosentezi.....	19
2.3.4. Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etki Mekanizmaları.....	22
2.3.5. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları.....	26
2.3.5.1. Bakteriyosinlerin Gıdalarda Kullanımı.....	26
2.3.5.2. Bakteriyosinlerin Klinik Kullanım Alanları.....	28
2.3.6. Bakteriyosinlere Direnç.....	29
2.3.7. Bakteriyosin Uygulamalarındaki Engeller.....	29
2.3.8. Enterosinler.....	31
2.3.9. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokoklardan Elde Edilen Enterosinlerin Önemi.....	32
2.3.10. Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etkileriyle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar.....	33

2.3.11. Bakteriyosinlerin <i>Listeria monocytogenes</i> Üzerine Antimikrobiyel Etkileriyle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	36
2.3.12. Bakteriyosinlerin Farklı Ortam Koşullarındaki Antimikrobiyel Etkileri İle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	37
2.3.13. Bakteriyosinlerin Gıdalarda Kullanımıyla İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	41
2.3.14. Gıdalarda Enterosin Kullanımıyla İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	42
3. MATERYAL VE METOD	45
3.1. Materyal.....	45
3.1.1. Bakteri Kültürleri	45
3.1.2. Besiyerleri ve Çözeltiler	46
3.2. Metod	47
3.2.1. Enterokok Stok Kültürlerinin Saklanması.....	47
3.2.2. Enterokok Ön Kültürlerinin Hazırlanması	47
3.2.3. Bakteriyosinin Kısmi Saflaştırılması	47
3.2.4. Kaba Bakteriyosin Ekstraksiyonunun Eldesi	50
3.2.5. Sıcaklığın Bakteriyosinin Antimikrobiyel Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	51
3.2.6. pH'nın Bakteriyosinin Antimikrobiyel Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	52
3.2.7. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metodu ile Antimikrobiyel Etkinin Belirlenmesi	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	55
4.1. Kısmi Olarak Saflaştırılmış Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etkisi	55
4.2. Kaba Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etkisi	57
4.3. Sıcaklığın Bakteriyosinin Antimikrobiyel Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	61
4.4. pH'nın Bakteriyosinin Antimikrobiyel Aktivitesi Üzerine Etkisi	65

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ	89
EKLER.....	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Bakteriyosin üreten bazı bakteriler, ürettikleri bakteriyosinler, etki spektrumları ve özellikleri	17
Çizelge 3.1. Gıda ve klinik kaynaklı enterokok izolatları.....	45
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri, özellikleri ve kullanım amaçları	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1. Enterokokların diğer Gram pozitif ve katalaz negatif koklardan ayrımı.....	8
Şekil 2.2. Lantibiyotiklerin, grup II ve III bakteriyosinlerin biyosentezi	20
Şekil 2.3. Bakteriyosinlerin regülasyonu ve biyosentezleri	21
Şekil 2.4. Barrel-stave mekanizması ile por oluşumu.....	23
Şekil 2.5. Wedge-Model ile por oluşumu	24
Şekil 2.6. Lipit II model mekanizması ile por oluşumu.....	24
Şekil 2.7. Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları	25
Şekil 3.1. Süspanse edilmemiş kısmi bakteriyosin	48
Şekil 3.2. Enterokok izolatlarından bakteriyosinin kısmi saflaştırılması.....	49
Şekil 3.3. Enterokok izolatlarından kaba bakteriyosin eldesi	51
Şekil 3.4. Test mikroorganizması içeren besiyeri yüzeyine kağıt disklerin yerleştirilmesi.....	53
Şekil 4.1. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı inhibisyon etkileri	55
Şekil 4.2. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı inhibisyon etkileri	56
Şekil 4.3. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kaba bakteriyosinlerin <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı inhibisyon etkileri.....	58
Şekil 4.4. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kaba bakteriyosinlerin <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı inhibisyon etkileri.....	59
Şekil 4.5. AS1, V105, L13 ve 226 enterokok suşlarından elde edilen kaba bakteriyosinlerin indikatör mikroorganizmaya karşı oluşturdukları inhibisyon zonları.....	60
Şekil 4.6. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi.....	62
Şekil 4.7. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi.....	63

Şekil 4.8. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı pH'ların etkisi.....	66
Şekil 4.9. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı pH'ların etkisi.....	67
Şekil 4.10. V105 suşundan elde edilen bakteriyosinin aktivitesi üzerine farklı pH'ların <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı oluşturduğu inhibisyon zonları	68

1. GİRİŞ

İnsanların sağlıklı büyüme ve gelişmelerinde, tükettikleri gıdaların güvenilir olması, oldukça önemlidir. Gıdaların birçoğu, içerdikleri besin maddeleri açısından, mikroorganizmalar için uygun gelişim ortamlarıdır. Gıda zincirinin çeşitli evrelerinde meydana gelen gıda kayıpları yüksek olup, bunların büyük bir çoğunluğu, mikrobiyel bozulmalarla olmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıklar, dünya genelinde, halk sağlığını ilgilendiren en ciddi problemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Modern teknolojiler, iyi üretim uygulamaları, kalite kontrol ve hijyen, HACCP (Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları) ve risk değerlendirmesi gibi gıda güvenliği sistemlerine rağmen, rapor edilen, birçok gıda kaynaklı hastalık ve zehirlenme olayları görülmektedir (Erden, 2012).

Tüketici talebine bağlı olarak, birçok gıdanın fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve raf ömrünün uzatılması için çeşitli katkı maddeleri (antioksidanlar, tatlandırıcılar, renklendiriciler vs.) kullanılmaktadır. Ancak, gıda katkı maddelerinin bazılarının hatalı kullanımına bağlı olarak, kanserojenik ve toksik riskleri söz konusu olmaktadır. Bu da, doğal ve daha güvenilir katkı maddelerinin kullanımını gündeme getirmiştir (Galvez ve ark, 2008; Altuntaş ve ark, 2010).

Yine, tüketicilerin, işlenmiş gıdalarda kullanılan katkı maddelerine yönelik tepkilerinin artması ve söz konusu kimyasalların olası riskleri nedeniyle, gıdalarda kullanımlarını kısıtlayıcı, alternatif yöntem arayışları ön plana çıkmıştır. Mikrobiyel bozulmalara karşı, ekonomik kayıpların önlenmesi, gıda kaynaklı hastalıkların azaltılması ve tüketici eğiliminin daha doğal ve mikrobiyolojik açıdan güvenli olan ürünler yönünde gelişme göstermesi sonucu, endüstride kullanılan muhafaza yöntemlerine duyulan ilgi artmaktadır. Bu yöntemlerden biri de biyokoruma yöntemidir (O’Keeffe ve Hill, 1999; Tuncer, 2005; Altuntaş ve ark, 2010).

Biyokoruma yöntemi, çoğunlukla, gıdaların raf ömrünü uzatmak veya gıda güvenliğini artırmak amacıyla, ya gıdaların doğal mikroflorasından yararlanılarak, ya da antimikrobiyel özelliğe sahip starter kültür veya bu kültürlerin ürettikleri metabolitlerin ürüne ilavesi ile gerçekleştirilmektedir. Üründe, gıda güvenliği ve

kalitesini sağlamak için patojenik ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların kontrolü önemlidir (Schnurer ve Magnusson, 2005). Biyokoruma amacıyla ilave edilen kültürler, üründe olası patojenlerin inhibisyonunu sağlamak ve ürünün raf ömrünü uzatmak için kullanılan, gıdanın duyuşal özelliklerinde değişime sebep olmayan kültürlerdir. Bu kültürlere, koruyucu kültürler de denilmekte olup, gıdalarda doğal olarak bulunabileceği gibi, sonradan da ilave edilebilmektedir (Devlieghere ve ark, 2004; Seçkin ve ark, 2010).

Bazı mikroorganizmaların antagonistik özelliklerinden yararlanılarak, patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların, inhibisyonu sağlanmaktadır. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin önemli bir kısmı, antimikrobiyel bileşenler üretmelerine rağmen, gıdaların biyokontrolünde laktik asit bakterilerinin ayrı bir önemi vardır (De Martinis ve ark, 2002).

Laktik asit bakterileri, uzun yıllardır fermente ürünlerin üretiminde kullanılan ve güvenli kabul edilen bakterilerdir. Bozulma etmeni ve patojenik mikroorganizmalar üzerinde bakteriyostatik veya bakterisit etki gösterirler. Laktik asit bakterilerinin antagonistik etkisi, ya diğer mikroorganizmalarla, ortamda bulunan besin öğeleri için yarışarak, ya da organik asitler (asetik, propiyonik ve laktik asit gibi), hidrojen peroksit, antimikrobiyel enzimler, diasetil ve bakteriyosinler, biyofilm gibi bir veya daha fazla antimikrobiyel aktiviteye sahip bileşikler üretmelerinden kaynaklanmaktadır (De Martinis ve ark, 2002; Devlieghere ve ark, 2004; İşleroğlu ve ark, 2008; Altuntaş ve ark, 2010; Seçkin ve ark, 2010).

Enterokoklar, laktik asit bakterileri (LAB) içinde yer alan önemli bir cinstir. Katalaz negatif, Gram pozitif, 10-45°C'de üreyebilen, %6,5 NaCl bulunan ortamda gelişebilen, fakültatif anaerob, kok şeklinde bakterilerdir (Giraffa, 2003). *Enterococcus* cinsi bakteriler, doğada her yerde bulunabilme özelliğine sahiptirler ve insan ve hayvan bağırsaklarında normal floranın bir parçası olup, memelilerin gastrointestinal sistemindeki bakterilerin büyük bir kısmını oluştururlar.

Enterococcus'lar, lipolitik ve esterolitik aktivite, sitrattan yararlanma ve uçucu aromatik bileşikleri sentezleme gibi özellikleri nedeniyle, gıdalarda starter kültür olarak kullanılma potansiyelleri söz konusudur. Özellikle, süt ve et ürünlerinin doğal

floralarının bir parçası olmalarından dolayı, bu ürünlerin fermantasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Giraffa, 2003; İşleroğlu ve ark, 2008).

Enterococcus'lar, probiyotik olarak, gıda ürünlerinde geniş bir kullanım alanına sahip olup, insan ve hayvanların bağırsak florasında mikrobiyel dengeyi sağlamaktadırlar. *Enterococcus* cinsi içinde, probiyotik özellik gösteren iki tür; *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* olarak bilinmektedir (Rinkinen ve ark, 2003; Saavedra ve ark, 2003; Erginkaya ve ark, 2007).

Laktik asit bakterilerinin, antimikrobiyel özellik göstermelerinde önemli rol oynayan bakteriyosinler, protein yapısında antimikrobiyel bileşikler olup, taksonomik olarak kendilerine yakın bakteriler üzerine, bakterisidal veya bakteriyostatik etki gösterebildikleri gibi, gıdalarda bozulmalara yol açan ve patojen olan bazı bakteriler üzerinde de etki göstermektedirler (Jack ve ark, 1995). Bunlar, doğal antibiyotik olarak nitelenmekle birlikte, klasik antibiyotiklerden farklı olarak, mide ve ince bağırsaklardan geçerken proteazlar tarafından aminoasitlere parçalanmaktadırlar. Bu nedenle, vücutta absorbe edilmezler ve kalın bağırsak florasına ulaşamazlar.

Bakteriyosinlerin, doğal kaynaklı olmaları, insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve korunacak gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın, bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etme özelliklerinden dolayı, son yıllarda üzerinde çok fazla çalışılmaktadır (Howard ve ark, 1994; Akkoç ve ark, 2009).

Genellikle, bakteriyosinlerin, yüksek sıcaklıklara dirençli olması, asidik ve nötral pH değerlerinde aktivitelerini sürdürebilmeleri ve sindirim sistemi orjinli proteolitik enzimlerle parçalanabilmeleri nedeniyle, potansiyel gıda koruyucuları olarak önerilmesine ve daha sonraları da bazı gıdalarda bu amaçla kullanılmasına yol açmıştır (Klaenhammer, 1993).

Gıdalarda koruyucu olarak bakteriyosinlerin kullanılması ile;

- Gıdaların raf ömrü uzatılabilmekte,
- Saklama koşulları altındaki sıcaklıklarda ekstra koruma sağlanmakta,
- Gıda kökenli patojenlerin besin zinciri ile dağılım riski azaltılabilmekte,
- Gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmalar nedeni ile yaşanan ekonomik kayıplar en aza indirgenmekte,
- Kimyasal koruyucuların kullanımları azaltılabilmekte ve
- Koruma amaçlı işlemlerin azaltılarak, ürünün organoleptik özellikleri ve besin değeri önemli ölçüde korunabilmektedir.

Enterococcus'ların ürettiği bakteriyosinler, "enterosin" olarak adlandırılmaktadır. Bakteriyosin üreten *Enterococcus*'lar, daha önce de belirtildiği üzere, doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve süt ürünleri, fermente sucuklar, balık, sebze ve gastrointestinal sistemlerden oldukça sık izole edilmişlerdir. Bakteriyosin üreten *Enterococcus faecium* suşları, gastrointestinal sistemde, istenilen popülasyonun devamlılığı açısından ayrı bir önem taşımaktadır. Enterosinlerin, peynir, meyve suyu, sosis, salam, jambon gibi gıdalarda, patojen ve bozulma etmeni olan mikroorganizmalardan *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Alicyclobacillus acidoterrestri*, *Staphylococcus aureus*'a karşı inhibitör etki gösterdiği, birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Rodriguez ve ark, 2003; Grande ve ark, 2005; Nes ve ark, 2007). Et ürünlerinin üretiminde, *Enterococcus faecium*'un, bakteriyosinogenik veya biyokoruyucu starter kültürler olarak kullanılması, bu ürünlerin doğal yolla dayandırılmasını sağladığı bildirilmiştir (Hugas ve ark, 2003).

Diğer yandan, enterokokların bazı türleri, klinik açıdan da çok önem taşımaktadır. Özellikle, *Enterococcus faecium* ve *E. faecalis*, genellikle gıda mikrobiyolojisi açısından zararsız mikroorganizmalar olarak bilinmesine karşın, hastane enfeksiyonlarında etkin rol almaktadırlar. Amerika Birleşik Devletleri'nde, sağlıklı bireylerin ortalama %5-20'sinde, *Enterococcus* kolonizasyonu ya da enfeksiyonu rapor edilmiştir (Namdari, 1998).

Enterococcus'lar, çeşitli çevresel ortamlara olan toleransı, sıcaklık direnci ve ısıtma işlemi görmüş gıdalarda mikrobiyel popülasyonları baskılamaları nedeniyle, fekal kontaminasyonun belirlenmesi ve gıdalarda hijyen ve sanitasyonun kontrolü amacıyla indikatör mikroorganizmalar olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca, gıda endüstrisinde kullanılan; ısıtma, kurutma, dondurma gibi işlemler ile temizlik ve dezenfeksiyon maddelerine karşı dirençlidirler. *Enterococcus*'lar, psikrotrofik olmalarının yanı sıra, değişik substratlara adaptasyonu ve gelişim özellikleri nedeniyle, özellikle sütlerin soğutulması ya da pastörizasyondan sonra canlı kalarak çoğalabilmektedirler (Franz ve ark, 1999; Birollo ve ark, 2001; Giraffa, 2002; Klein, 2003; Kuhn ve ark, 2003).

Bakteriyosin üreten *Enterococcus faecium*'un, aynı zamanda iyi bir rekabetçi olması, bu organizmanın teknolojik açıdan önemini arttırmaktadır. Gıdalarda bakteriyosinlerin kullanımı iki şekilde olmaktadır; ya bakteriyosin üreten suş, doğrudan starter kültür olarak, ya da üretici kültürden saflaştırılan bakteriyosinin ürüne eklenmesiyle kullanılmaktadır (Hugas ve ark, 2003). *Enterococcus faecium*'un ürettiği bakteriyosinler, gıda ürünlerinde raf ömrünün ve gıdanın güvenliğinin artırılmasında kullanılmaktadır (Callewaert ve ark, 2000). Geniş pH aralıklarında aktivite gösteren enterosinler, asidik pH'larda daha fazla aktiftirler. Donma ve buzdolabı koşullarına, ayrıca yüksek sıcaklığa (100°C) dayanıklıdırlar.

Bu çalışmada, hem gıda kaynaklı, hem de klinik kaynaklı enterokok suşlarının bakteriyosin üretme özellikleri ve elde edilen bakteriyosinlerin, farklı sıcaklık ve pH koşullarında *Listeria monocytogenes* üzerine antimikrobiyel etkinlikleri araştırılmıştır.

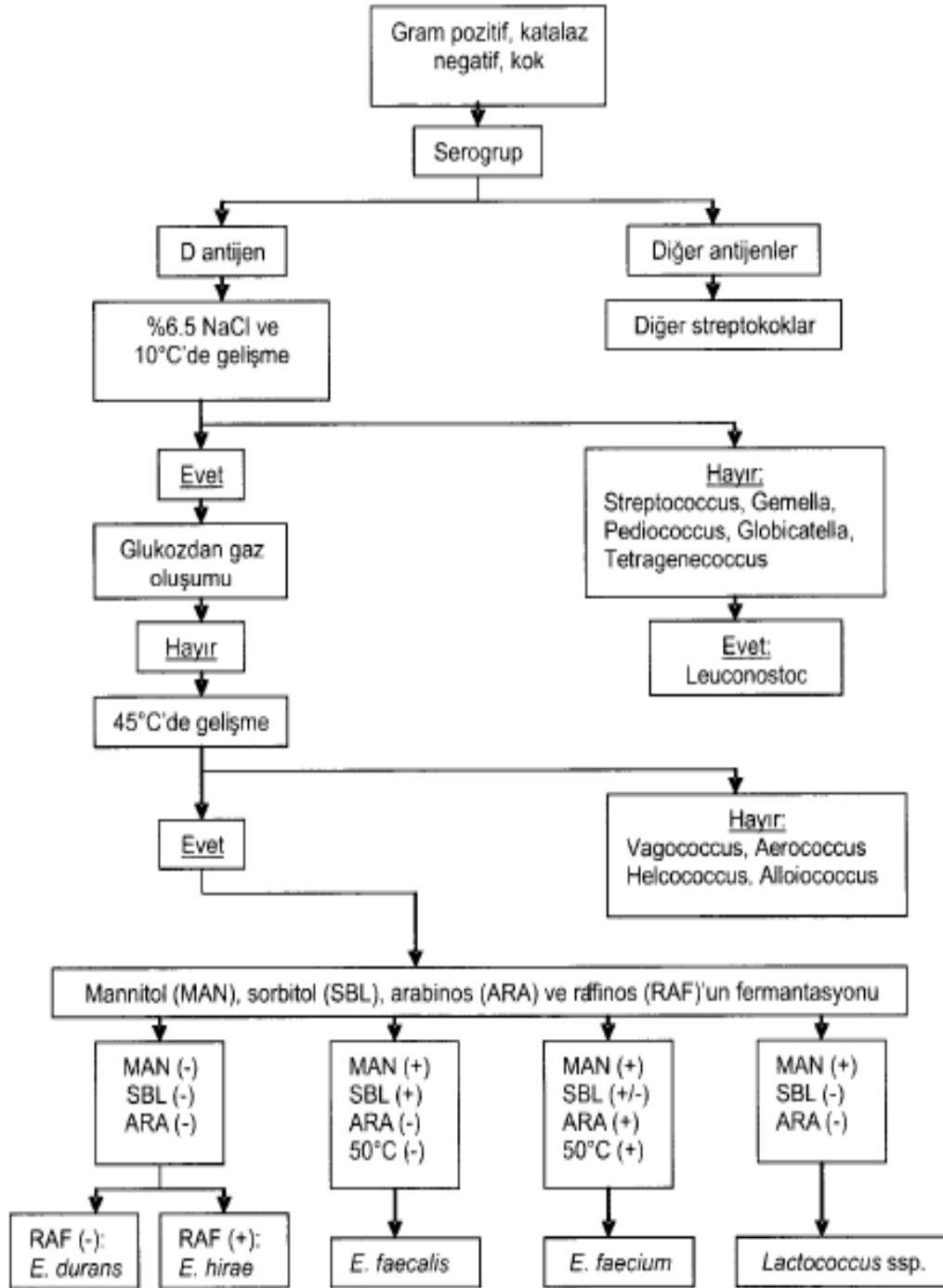
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Enterokoklar

2.1.1. Enterokokların Genel Özellikleri

Enterococcus cinsi bakteriler, laktik asit bakterileri arasında yer alan, hem gıda mikrobiyolojisi, hem de klinik mikrobiyolojisi açısından önem taşıyan bakterilerdir (Erginkaya ve ark, 2007). Önceleri, *Streptococcus* cinsi içinde yer alan enterokoklar, "fekal streptokoklar" veya "Lancefield serolojik D grubu streptokoklar" olarak bilinmekteydi. Daha sonra, 1984 yılında DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyon çalışmaları ile bunların streptokoklardan farklılığı ortaya konulmuş ve bunun sonucunda *Enterococcus* adı altında ayrı bir cins olarak kabul edilmiştir. *Enterococcus*'a ait farklı türlerin, filogenik ilişkileri, bunların 16S rRNA genlerinin karşılaştırmalı dizi analizleri ile belirlenmektedir. Birçok *Enterococcus* türü belirlenmiş olmasına rağmen, *E. faecium* ve *E. faecalis* en yaygın iki türüdür (Schleifer ve Klipper-Balz, 1984; Klein, 2003; Franz ve ark, 2003; İşleroğlu ve ark, 2008).

Enterococcus'lar, tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunan, Gram pozitif koklardır. Optimum gelişme sıcaklıkları, 30-35°C olup, birçoğu, 10 ile 45°C arasında değişen sıcaklıklarda gelişebilirler. Enterokoklar, aerobik ya da fakültatif anaerobiktirler, %6,5 NaCl'li ortamlarda gelişebilen ve 60°C'de 30 dakika canlı kalabilmektedirler. Ayrıca, pH 9,6'da, %40 safra tuzu içeren besiyerinde üreyebilme özelliğine sahiptirler. Sitokrom enzimleri olmadığından, katalaz negatiftirler ve glikozdan gaz oluşturmazlar. Kanlı agarda, enterokok kolonileri belirgin, gri, parlak görünümde olup, alfa, beta hemolitik ya da non-hemolitiklerdir. *E. flavescens*, *E. casseliflavus*, ve *E. gallinarum* gibi bazı kökenler hareketlidirler (Teixeira ve Facklam, 2003; Yıldırım, 2007; Vilas, 2011). Şekil 2.1'de enterokokların tanımlamalarında aranan genel özellikler gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Enterokokların, diğer Gram pozitif ve katalaz negatif koklardan ayrımı (İşleroğlu ve ark, 2008).

Enterococcus'lar, fekal kaynaklı ve kötü çevre koşullarına karşı dayanıklı olmaları nedeniyle, genellikle gıda, bitki, su ve topraktan izole edilmektedirler (Giraffa, 2002). İnsan ve hayvanların, doğal mikroflorasının önemli bir bölümünü oluşturan enterokokların temel habitatları ise, gastrointestinal sistemlerdir. Bağırsak florasının yanı sıra, ağız, üreter, vajina ve safra yollarında da normal flora bakterileri olarak bulunurlar. İnsan bağırsağında baskın olarak bulunan *Enterococcus* türleri, *E. faecium* ve *E. faecalis* olmakla birlikte, *E. faecalis*'in bulunma oranı (%90-95) daha yüksektir (Stiles ve Holzapfel, 1997; Klein, 2003; İşleroğlu ve ark, 2008).

Enterococcus'lar, çeşitli çevresel ortamlara tolerans göstermeleri, sıcaklığa karşı direnci ve ısı işlem görmüş gıdalarda, mikrobiyel popülasyonları baskılamaları gibi özelliklerinden dolayı, fekal kontaminasyonun belirlenmesi ve gıdalarda hijyen ve sanitasyonun kontrolü amacı ile indikatör mikroorganizmalar olarak kullanılmaktadırlar (Biorollo ve ark, 2001; Giraffa, 2003; Erginkaya ve ark, 2007). Ayrıca, fermente gıdaların, duyuşal özelliklerini iyileştirmeleri ve bakteriyosin (enterosin) üretme yetenekleri nedeniyle, enterokoklar gıda endüstrisinde kullanım alanı bulmuşlardır (Franz ve ark, 1999; Hugas ve ark, 2003). *Enterococcus* cinsi içinde yer alan, *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*, gıda endüstrisi açısından, özellikle de süt endüstrisinde en önemli türlerdir. Bu bakteriler, çeşitli geleneksel fermente ürünlerin üretiminde önemli rol oynamaktadırlar (Giraffa, 2003; Erginkaya ve ark, 2007). *Enterococcus* 'lar, lipolitik ve esterolitik aktivite, sitrattan yararlanma ve uçucu aromatik bileşikleri sentezleme gibi özellikleri sayesinde, gıdalarda bazı laktik asit bakterileri ile birlikte, en yaygın starter kültür olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca, özellikle süt ve et ürünlerinin doğal floralarının bir parçası olmaları nedeniyle, bu ürünlerin fermantasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Ross ve ark, 2002; Hugas ve ark, 2003; Erginkaya ve ark, 2007; İşleroğlu ve ark, 2008).

Enterococcus'lar, yöresel peynirlerin, olgunlaştırılması sırasında peynir aromasının gelişmesi ve peynir kalitesinin artmasında, önemli rol oynarlar. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*, asetaldehit, etanol, diasetil ve aseton gibi uçucu bileşikleri üreterek peynirlerde istenen aromanın gelişmesine katkıda bulunmaktadırlar (Ross ve ark, 2002; Foulquie ve ark, 2006; İşleroğlu ve ark, 2008).

Bu özellikleri nedeniyle, Cheddar peyniri, yumuşak İtalyan peynirleri ve bazı İsviçre peynirlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadırlar. *Enterococcus faecium* Arjantin'de geleneksel bir peynir olan, Tafi peynirlerinin üretiminde, belirgin organoleptik karakteristiklerin elde edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Akdeniz tipi peynirlerde ise, diasetil üretimi gibi proteolitik ve esterolitik aktiviteleriyle aroma gelişimi ve olgunlaştırmaya katkıda bulunmaktadır. Geleneksel yöntemle üretilen Mozzarella peynirlerinin fermentasyonu sırasında önemli rol oynarlar (Saavedra ve ark, 2003; Erginkaya ve ark, 2007) .

Enterococcus faecium'un çeşitli suşları, fermente et ürünlerinde *Lactobacillus*'larla birlikte probiyotik ve starter kültürler olarak kullanılmaktadır. *Enterococcus faecium*'un sucuk aromasına katkısı, proteolitik ve lipolitik aktivitelerinden ileri geldiği çeşitli araştırmalarla belirlenmiştir.

Enterococcus'lar, probiyotik olarak insanlarda ve hayvanlarda bağırsak florasında mikrobiyel dengeyi sağlamak için kullanılmaktadırlar. Probiyotik kültür olarak, *Enterococcus* içeren bazı eczacılık ürünleri, insanların klinik tedavisinde kullanılmaktadırlar. *Enterococcus faecium*'un, insanlarda diyarenin tedavisinde probiyotik olarak kullanımının, antibiyotik uygulamalarına bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. *Enterococcus faecium*'un, insanlarda probiyotik etkisi ise, kolesterolün sindirim sisteminden kana absorpsiyonunun azaltılması şeklindedir (Franz ve ark, 1999; Birollo ve ark, 2001; Hugas ve ark, 2003; Klein, 2003; Erginkaya ve ark, 2007).

In vitro koşullarda, *Enterococcus faecium* CRL 183'ün *Lactobacillus jugurti* ile kombinasyonun, kolesterolde %43'lük azalmaya ve *Enterococcus faecium* PR88 probiyotik suşunun, insanlarda iltihaplı bağırsak sendromunun semptomlarının hafiflemesine neden olduğu saptanmıştır (Rossi ve ark, 1999). *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* türleri, insanlarda probiyotik olarak kullanılmasına rağmen, *Enterococcus faecalis*'e ait bazı suşlar, ayrıca hayvan yemlerinin hazırlanmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır (Foulquie ve ark, 2006; İşleroğlu ve ark, 2008).

2.1.2. *Enterococcus*'ların Patojenitesi

Enterokoklar, normal olarak intestinal bölgede kolonize olan organizmalar olmasına rağmen, insanlarda septisemi, bakteriyemi, idrar yolları enfeksiyonları ve endokardit yapabilmekte ve bakteriyel endokardit olgularının %5-15'inden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Fisher ve Phillips, 2009).

Enterokoklar, diğer bakteriler kadar virülans faktörlere sahip olmamalarına karşın, bazı karakteristik özellikleri, (örneğin antimikrobiyel ajanlara direnç gibi) virülans özelliklerini arttırmakta ve etkili fırsatçı patojen haline getirmektedir. Hastane enfeksiyonlarında, 1970'li yılların ortalarından itibaren klinik önemleri giderek artmıştır. İntraabdominal enfeksiyonlar, cerrahi yara ve vasküler kateter enfeksiyonlarına da sıklıkla neden olmaktadır (Aygün ve ark, 2008). Enterokokal enfeksiyonların %60 kadarının özellikle, anti-enterokokal etkisi olmayan metronidazol, klindamisin gibi antianaerobik etkili ve sefalosporinler gibi geniş-spektrumlu antibiyotiklerin, sıklıkla kullanıldığı yoğun bakım ünitelerinde meydana geldiği ifade edilmektedir (Yalçın, 2009).

Gıda kaynaklı enterokokların, henüz klinik enfeksiyonlara yol açtığı gözlenmemiştir. Ayrıca, şimdiye kadar herhangi bir probiyotik kaynaklı enterokok enfeksiyonu raporuna rastlanmamıştır, ancak gıda kaynaklı izolatların horizontal gen aktarımı ile virülans genlerin yayılmasında rol oynayabilecekleri belirtilmektedir. *Enterococcus*'ların, gıdalarda güvenli olarak kullanılıp kullanılmayacağına yanıt vermek zordur. Bu nedenle, klinik ve epidemiyolojik verilere ihtiyaç duyulmaktadır (Rinkinen ve ark, 2003; Valenzuela ve ark, 2009; Schirone ve ark, 2012).

Enterococcus spp.'in ticari kullanımlarında, güvenlik kriterlerinin oluşturulması gerekmektedir (Vuyst ve ark, 2003). Probiyotik ve starter kültür olarak kullanılan veya kullanılması düşünülen *Enterococcus* cinsine ait suşların, antibiyotik dirençliliği, direnç transfer özellikleri ve virülans faktörleri gıda güvenliği açısından araştırılarak tartışılmalıdır (Vuyst ve ark, 2003; Erginkaya ve ark, 2007; Valenzuela ve ark, 2009). Günümüzde, modern analiz tekniklerinin gelişmiş olması, *Enterococcus*'ların özelliklerinin bilinmesinde ve bazı gıdalarda kullanımının kabulünde, yardımcı olacaktır (Foulquie ve ark, 2006; Erginkaya ve ark, 2007).

2.2. *Listeria monocytogenes*

2.2.1. *Listeria monocytogenes*'in Genel Özellikleri

Doğada yaygın olarak bulunan *Listeria* cinsi içerisinde yer alan *Listeria monocytogenes*, insan ve hayvanlar için oldukça patojen bir türdür. *Listeria monocytogenes*, çevreye geniş ölçüde yayılabilen, buzdolabı sıcaklığında gelişebilen, soğutma, dondurma, ısıtma ve kurutma işlemleri gibi olumsuz koşullar altında bile canlılığını koruyabilen, halk sağlığı açısından önemli bir patojendir. *Listeria*'lar, 1980'li yıllardan sonra birçok gıdadan izole edilmişler ve *Listeria* türlerinden *L. monocytogenes*'in gıdalardan insanlara geçerek, ölümlerle ya da değişik sağlık problemleriyle sonuçlanan enfeksiyonlara neden olabildiği belirlenmiştir (Sancak ve ark, 2007; Yavuz ve Korukluoğlu, 2010).

Listeria, basit boyamada çubuk ve kokobasil şeklinde, 0.3-0.5 x 0.7-2.0 µm boyutlarında, Gram pozitif, sporsuz, kapsülsüz, fakültatif anaerobik bir bakteridir. *Listeria*'ların, optimum gelişme sıcaklıkları, genellikle 35-37°C olup, 1-45°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında da gelişme gösterebilirler. 6 adede kadar peritrik flagellası bulunmakla birlikte, bakterinin hareketliliği, gelişme sıcaklığına bağlıdır. Hücreler, 25°C'de hareketli olmalarına karşın, 37°C'de hareketsizdirler. Gelişebildiği optimum pH değeri, 7,0-7,3 olduğu halde, 4,4-9,6 pH değerleri arasında canlılığını sürdürebilen suşları mevcuttur. Minimum a_w değeri 0,92, optimum a_w ise, 0,97'dir. Halotoleranttır ve böylece yüksek konsantrasyonlardaki (% 10-12) NaCl varlığında bile çoğalabilirler (Evirgen, 2005; Hampikyan, 2006; Yavuz ve Korukluoğlu, 2010).

Listeria cinsine ait, 7 tür bulunmaktadır. Bu türler arasında, sadece *L. monocytogenes* insanlara patojendir. Diğer türler olan; *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* ve *L. murrayi* insanlara patojen değildir.

L. monocytogenes, ürüne, çevreden, sulardan, gıda işletmelerinde kullanılan ekipmanlarından, gıda maddelerinin, üretim, hazırlama ve muhafaza esnasında bulaşabilmektedirler. Buzdolabı şartlarında, düşük pH değerlerinde canlılığını uzun süre muhafaza etmesi nedeniyle, hayvansal gıdalar, enfeksiyonun oluşmasında

önemli rol oynamaktadır. Pastörize edilmemiş sütler ve bu sütlerden üretilen peynir, dondurma gibi süt ürünleri, yumuşak peynirler, yetersiz ısıl işleme görmüş sosis, salam gibi et ürünleri, yetersiz fermentasyona tabii tutulan gıdalar, çabuk bozulabilen kanatlı ve su ürünleri, *L. monocytogenes* açısından riskli gıda grupları olarak bilinmektedir. Kontamine gıdalarda, çok az düzeyde bulunan *L. monocytogenes*, depolanma esnasında soğutma ortamında gelişip çoğalabilmektedir (Koçan ve Halkman, 2006; Roche ve ark, 2009; Yavuz ve Korukluoğlu, 2010).

2.2.2. *Listeria monocytogenes*'in Patojenitesi

Listeria türleri tarafından meydana getirilen listeriozis hastalığı, gıda kaynaklı hastalıklar arasında en önemlilerden biri olarak kabul edilmektedir. Menenjit, septisemi, beyin iltihabı, karaciğer apsisi, endokardit, gebelerde düşük veya ölü doğumlara neden olmaktadır. En sık görülün bulaşma yolu, kontamine gıdaların tüketilmesidir. Anneden bebeğe geçiş, mümkün olduğu gibi, insandan insana geçmesinin çok nadir olduğu belirtilmiştir (Koçan ve Halkman, 2006). Listeriozis, sıklıkla kontamine süt, yumuşak peynir, iyi pişmemiş et ve iyi yıkanmamış çiğ sebzelerin tüketimine bağlı olarak gelişen sporadik bir hastalıktır. Hamile kadınlar, yeni doğanlar, kanser, AIDS, kronik karaciğer yetmezliği ve şeker hastalığı olanlar, 65 yaşın üstündeki yaşlılar ile diğer bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler risk grubunda yer almaktadır. Mortalite oranı, %30'lar civarında olup, hastalığın inkübasyon süresi birkaç günden 2-3 aya kadar değişmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, enfektif dozun kişinin duyarlılığına bağlı olarak, 100-1000 mikroorganizma civarında olduğu bilinmektedir (Hampikyan, 2006; Roche ve ark, 2009; Yavuz ve Korukluoğlu, 2010, Kum ve ark, 2011).

2.3. Bakteriyosinler

2.3.1. Bakteriyosinlerin Tanımı

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, plazmid DNA tarafından kodlanan, protein doğasında, antagonistik etkiye sahip bileşiklerdir. Bu bileşikler, özellikle üretici türe yakın akraba olan türlere karşı, bakteriyostatik veya bakteriyosidal etki gösterirler (Cotter ve ark, 2005). Konu ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda, antimikrobiyel spektrumu geniş, özellikle gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakteriler üzerinde etkili bakteriyosinlerin bulunmasına bağlı olarak, bu tanım genişletilmiştir.

2.3.2. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

Bakteriyosinler için farklı sınıflandırmalar yapılmakla birlikte, daha çok Klaenhammer'in 1993 tarihinde yaptığı sınıflandırma kullanılmaktadır. Biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada, bakteriyosinler, molekül büyüklüğü, kimyasal yapıları, ısıl işleme karşı gösterdikleri direnç, enzimatik duyarlılıkları, translasyon sonrası modifiye edilen aminoasitlerinin olup olmayışı ve etki mekanizmaları esas alınarak, 4 grup altında sınıflandırılmıştır. Ancak, biyokimyasal tanımlanması bakımından ilk 3 sınıf dikkate alınmaktadır (Klaenhammer, 1993; Chen ve Hoover, 2003; Akkoç ve ark, 2009).

GRUP I bakteriyosinler: Bu gruptaki bakteriyosinler, "lanthionin" içermeleri nedeniyle, lantibiyotikler olarak adlandırılmakta ve yapılarında, bilinen aminoasitlerden farklı olarak lanthionin (Lan) ve metil lanthionin (MeLan) aminoasit türevlerini içermektedirler. Bu kısımlar, aminoasitler arasında kovalent köprüler oluşturmakta ve bunun sonucu olarak da, yapıda iç "halkalar" oluşarak, lantibiyotiğe kendine özgü özelliklerini kazandırmaktadır. Molekül ağırlıkları, 5 kDa'dan düşüktür. Bu grupta yer alan nisin, laktisin 3147A ve 3147B ile plantarisin C'nin, ısı stabiliteyi yüksek olup, asidik pH'da, 100°C'ye kadar stabiliteyi koruyabilmektedirler (Twomey ve ark, 2002; Chen ve Hoover, 2003). Bu gruptaki

bakteriyosinler, kimyasal yapılarına ve antimikrobiyel aktivitelere göre, IA ve IB lantibiyotikleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Grup IA bakteriyosinler, 5 kDa 'dan küçük molekül ağırlığına sahip, küçük esnek peptidlerdir. Bu grup, hedef hücrenin membranında porlar oluşturarak, membran bütünlüğünü bozmaya yarayan hidrofobik ve katyonik peptidleri içermektedir. *L. lactis* subps. *lactis* tarafından üretilen nisin, en iyi karakterize edilen lantibiyotiktir. Nisin, bu gruptaki bakteriyosinler arasında en fazla çalışılmış olanıdır ve pek çok patojen ve gıdalarda bozulmaya neden olan bakterilere karşı antimikrobiyel etki gösterir. Ayrıca, *Staphylococcus gallinarum* tarafından üretilen gallidermin, *Streptococcus salivarius* tarafından üretilen salivarisin A ve *L. lactis* tarafından üretilen laktisin 481, bu gruba örnek olarak verilebilir.

Grup IB bakteriyosinler ise, globuler şekilli, Grup IA'ya göre daha katı anyonik veya nötral peptidleri içerir. Grup IB lantibiyotikler, hücre duvarının biyosentezinin inhibisyonu yoluyla, antimikrobiyel etki gösterirler. Bu grup lantibiyotiklere, mersasidin, cinnamicin ve aktagradin örnek olarak verilebilir (Chen ve Hoover, 2003; Akkoç ve ark, 2009).

GRUP II bakteriyosinler: Bu gruptaki bakteriyosinler, Grup I'den farklı olarak lanthionine içermezler. Ayrıca, molekül ağırlıkları 10 kDa'dan daha düşük olup, ıslı stabilitesine sahiptirler. Amfilik helikse, değişik oranlarda hidrofobiteye ve β -tabakalı yapıya sahiptirler. Ayrıca, bu gruptaki bazı bakteriyosinler 100°C'den 121°C'ye kadar olan sıcaklıklara karşı stabildirler. Çok sayıda bakteriyosin içeren bu grup, 3 alt gruba ayrılmaktadır (De Martinis ve ark, 2002).

Grup IIA bakteriyosinleri, en büyük gruptur ve *Listeria* suşlarına karşı inhibitör etki gösterirler. Tıpkı Grup IA lantibiyotiklerde olduğu gibi, Grup IIA bakteriyosinler de sitoplazmik membranda por oluşturmak suretiyle etkilerini gösterirler. Bu gruba dahil olan bakteriyosinlere örnek olarak, pediosin AcH, sakasin A, sakasin P, enterosin A ve lökosin A verilebilir (Cintas ve ark, 2001; Chen ve Hoover 2003; Akkoç ve ark, 2009).

Grup IIB bakteriyosinler, etkiledikleri hücrelerin membranında por kompleksleri oluşturarak, inhibitör etkilerini gösterirler. Çoğu bakteriyosin, ortama tek bir peptit salgılayarak tam bir antimikrobiyel etkiyi sağlayabilirler. Fakat, IIB alt

grubunda bulunan bakteriyosinlerin en önemli özellikleri, aktiviteleri için iki peptid dizisinin aynı anda bulunması ve aktiflik göstermesidir. Bu gruptaki bazı önemli bakteriyosinler, enterosin L50A ve L50B, laktokoksin G ve M/N, plantarisin EF ve JK'dir (Cintas ve ark, 2001; Nes ve ark, 2002; Kurt ve Zorba, 2005; Akkoç ve ark, 2009).

Bir diğer alt grup ise, salgı sinyallerine bağlı olarak üretilen peptitler olan Grup IIC bakteriyosinlerdir. Bu bakteriyosinler sistein aminoasit kalıntısı içermektedir ve bu bakteriyosinlere “thiolbiyotik”ler veya “sistibiyotik”ler denilmektedir. (De Martinis ve ark, 2002).

GRUP III bakteriyosinler: Bu gruptaki bakteriyosinler, daha büyük molekül ağırlığına (>30kDa) sahip olup, ısıya karşı duyarlı proteinlerden oluşmaktadırlar. Helvetisin J ve V, laktasin B bu grubun en bilinenleridir (De Martinis ve ark, 2002).

GRUP IV bakteriyosinler: Bu gruptaki bakteriyosinler ise, büyük ve kompleks moleküller olup, aktiviteleri için karbonhidrat veya lipid bileşenlerine gereksinim duymaktadırlar (Kurt ve Zorba, 2005).

Çizelge 2.1'de bakteriyosin üreten bazı bakterilerin, ürettikleri bakteriyosinlerin, etki spektrumları ve özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bakteriyosin üreten bazı bakteriler, ürettikleri bakteriyosinler, etki spektrumları ve özellikleri (Klaenhammer, 1993)

Tür	Bakteriyosin	Etki spektrumu	Özellikleri
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisin	Gram pozitif bakteriler	Grup I lantibiyotik, 3,5 kDa, ticari olarak kullanımı var
	Lacticin 3147	<i>Clostridium</i> spp. <i>L.monocytogenes</i> <i>S.aureus</i> <i>E.faecalis</i> <i>S. mutans</i>	Grup I lantibiyotik, 4,2 kDa, ısıya dayanıklı, asidik pH'larda aktif
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidocin CH5	Özellikle <i>Lactobacillus</i> spp. başta olmak üzere Gram (+) bakteriler	Grup II bakteriyosin, yüksek molekül ağırlıklı kümeler oluşturma
	Lactacin B	<i>L. delbrueckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L.lactis</i>	Grup III bakteriyosin, 6,3 kDa ısıya dayanıklı, sadece pH 5,0-6,0 arasında aktif
<i>Lactobacillus casei</i>	Lactocin 705	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. plantarum</i>	Grup II bakteriyosin, 3,4 kDa
<i>Enterococcus faecium</i>	Enterocinler	<i>L. monocytogenes</i> Gram pozitif bakteriler	Grup II bakteriyosin, 4,8 kDa, ısıya dayanıklı
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Leucocin A	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>E. faecalis</i> <i>L.monocytogenes</i>	Grup II bakteriyosin, 3,9 kDa, asidik pH'da ve 100°C'de aktif
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocin F Pediocin PA-1	Gram pozitif bakteriler	Grup II bakteriyosin, 4,5 kDa, proteolitik enzimlere duyarlı, ısıya ve pH değişikliklerine dirençli
<i>Lactobacillus sake</i>	Lactocin S	<i>Lactobacillus</i> spp.	Grup I bakteriyosin, 3,7.kDa, 4,5 ve 5,5 pH arasında etkin
	Sakacin P	<i>L.monocytogenes</i>	Grup II bakteriyosin, 4,4 kDa, ısıya dayanıklı
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Curvacin A	<i>L.monocytogenes</i> <i>E.faecalis</i>	Grup II bakteriyosin, 4,3 kDa

Enterococcus'ların ürettiği bakteriyosinler enterosin olarak adlandırılmaktadır. *Enterococcus faecium* tarafından üretilen enterosinler, küçük (4-6kDa) sıcaklığa dirençli, katyonik, hidrofobik, ribozomal yapıdaki düşük molekül ağırlıklı, antimikrobiyel peptit veya proteinlerdir (Giraffa, 2003; Marekova ve ark, 2003). 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 mundtisin 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 (Moreno ve ark, 2003; Vilas, 2011).

E. faecalis suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin sınıflandırılmaları ve bazı özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

Tip 1: *E. faecalis* DS16'dan sitolisin (bakteriyosin/hemolizin). Bu 2 bileşenli lantibiyotik, hem hemolisin hem de bakteriyosin aktivitesi gösterir.

Tip 2: *E. faecalis* S-48'den siklik peptid antibiyotik AS-48 (enterosin AS-48). Bu bileşik hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkilidir. *E. faecalis* INIA 4 tarafından üretilen enterosin 4 ise, sadece Gram pozitif bakterilere etkilidir.

Tip 3: Dar antimikrobiyel spektrum ile *E. faecalis* YI17'den bakteriyosin 31.

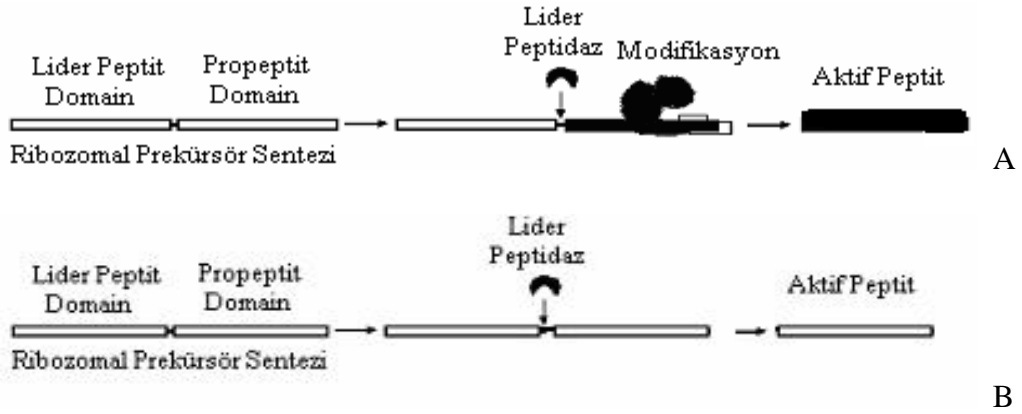
Tip 4: *E. faecalis* BEF 1071'den enterosin 1071A ve enterosin 1071B. Bu enterosinler, Tip 2'den daha dar bir aktivite spektrumu ve *E. faecalis* tarafından üretilen Tip 3 enterosinlerden de geniş aktivite spektrumu gösterirler (Vilas, 2011).

2.3.3. Bakteriyosinlerin Biyosentezleri

Bakteriyosinler, ribosomal olarak sentezlenmektedirler. Bakteriyosin üretimini kodlayan genler, kromozom, plasmid veya transposon üzerinde bulunabilmektedir. Bakteriyosinlerin üretim mekanizmaları, aminoasit dizilişleri, etki mekanizmaları, üretici genlerin RNA dizilişleri belirlenmiş ve genel olarak birçok ortak özelliklere sahip oldukları saptanmıştır. Genel olarak, bakteriyosinlerin üretimlerindeki temel mekanizma aynıdır. Polipeptid dizisi, RNA tarafından kodlandıktan sonra öncü protein olarak ayrılır. Çeşitli modifikasyonların ardından sistein sayısına göre son şeklini kazanmakta ve daha sonra sec-dependent mekanizması yardımıyla hücre dışına salgılanmaktadır (Kurt ve Zorba, 2005; Akkoç ve ark, 2009).

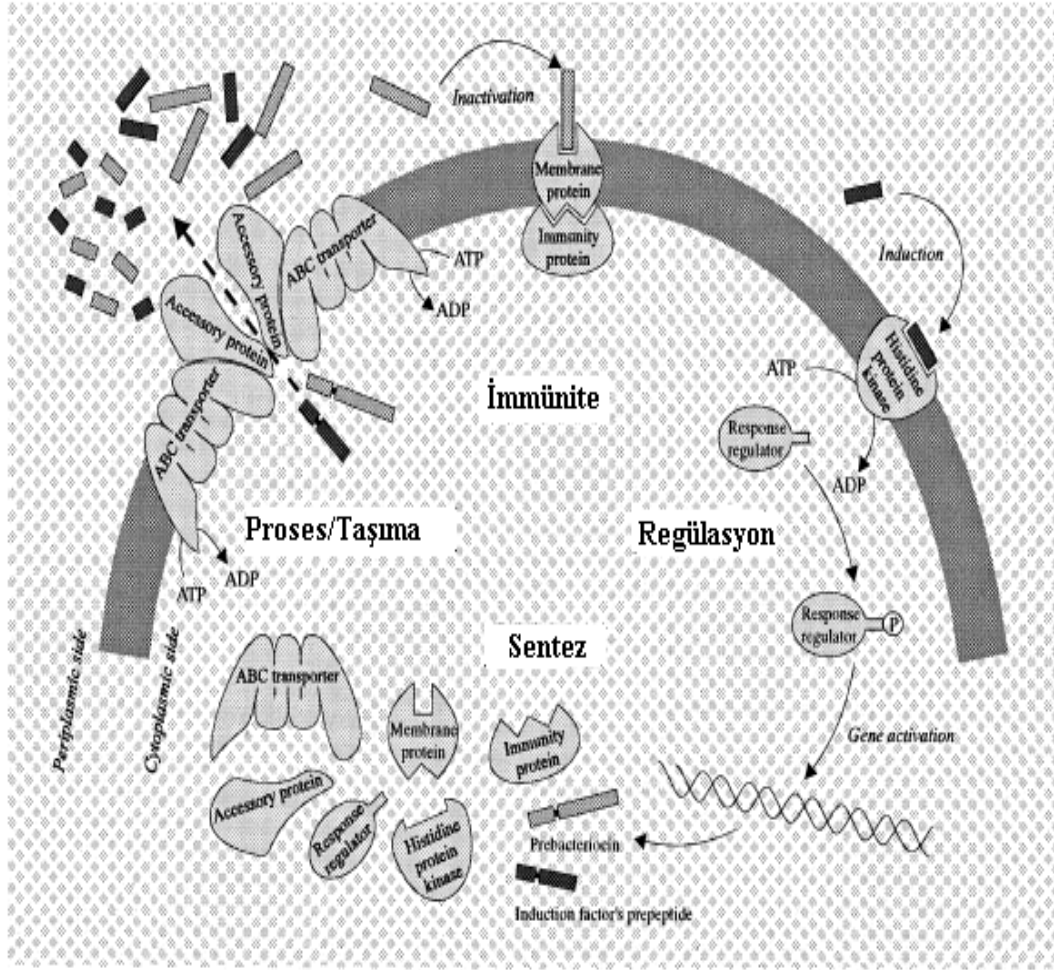
Bakteriyosinlerin üretiminin gerçekleştirilebilmesi için, dört farklı gene ihtiyaç vardır: (i) prepeptiti kodlayan bir yapısal gen, (ii) immünite geni, (iii) ABC-taşıyıcısını kodlayan gen ve (iv) bakteriyosinin dışarı taşınmasında gerekli olan aksesuar proteinini kodlayan gen.

Biyosentez mekanizması açısından değerlendirildiğinde, bakteriyosinlerin sentezi birbirine benzemektedir. Sadece, grup I bakteriyosinlerin biyosentezinde bulunan anormal aminoasitlerin üretim aşaması olan, kimyasal modifikasyon (posttranslasyon), grup II ve grup III bakteriyosinlerin sentezinde yer almamaktadır. Şekil 2.2 (A)'da görüldüğü gibi Grup I bakteriyosinleri, prelantibiyotik (prebakteriyosin) olarak sentezlendikten sonra dehidrasyon ve çapraz bağlanma (kimyasal modifikasyon) reaksiyonlarına uğramakta ve bunun sonucunda anormal aminoasitler (lantibiyotikler, dehidreamino asitler vb.) oluşmaktadır. Grup II ve grup III bakteriyosinleri, kimyasal modifikasyona uğramadıkları için anormal aminoasitleri içermemektedirler (Nagao ve ark, 2006; Savadogo ve ark, 2006; Bilgin, 2008). Şekil 2.2 (B) grup II ve III bakteriyosinlerin biyosentezini göstermektedir.



Şekil 2.2. Lantibiyotiklerin (A), grup II ve III bakteriyosinlerinin (B) biyosentezi (Asutay, 2007).

Bakteriyosinler hücre içinde sentezlendikten sonra, aktivitelerini gösterecekleri bölgelere, hücre dışına taşınmaktadır. Bu taşımada, farklı sistemler rol almaktadır. Sentezlenen bakteriyosinlerin hücre dışına taşınması membrana bağlı olan iki protein tarafından gerçekleştirilir. Bunlar, ABC-transporter ve aksesuar proteindir. ABC-taşıyıcılarının, N-terminal ve C-terminal bölgeleri yapısal olarak farklı olup, C-terminal kısmı ATP bağlama bölgesini içermektedir. N-terminal bölgesi, hidrofobik olup, proteaz aktivitesine sahiptir. Aksesuar proteinleri ise, membran translokasyonunu teşvik ettiği ve lider peptidin prosesinde rol oynadığı belirtilmektedir (Klaenhammer, 1993; Rodriguez ve ark, 2003; Bilgin, 2008). Şekil 2.3'de bakteriyosinlerin regülasyonu ve biyosentezlerinin şeması gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Bakteriyosinlerin regülasyonu ve biyosentezleri (Asutay, 2007).

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.

2.3.4. Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etki Mekanizmaları

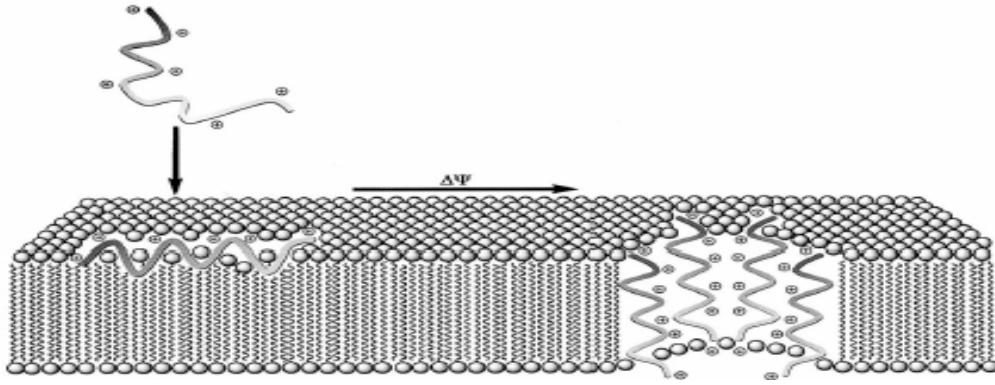
Bakteriyosinler, duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptirler. Bakterilerin sitoplazmik membranı, bakteriyosinlerin hedef noktasını oluşturmaktadır. Hücrenin sitoplazmik zarına bağlanarak, hücre içerisine girip, zarda gözenekler oluştururlar. Böylece düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açarlar.

Laktik asit bakterilerine ait bakteriyosinler, duyarlı bakterilerin hücre membranında, porlar oluşturarak membran geçirgenliğini değiştirirler ve potasyum, inorganik fosfat ile ATP sızmasına ve buna paralel olarak membran iyonik dengesinin bozulmasına neden olurlar. Bunun sonucunda, transmembran potansiyeli ($\Delta\Psi$) ve pH grandiyentinin (ΔpH) kısmen veya tamamen yok olması ile proton itici gücü (PMF) ortadan kalkmaktadır. PMF, hücre içinde iyonların ve metabolitlerin birikmesi ile ATP sentezi gibi sitoplazmik membranda enerjiye bağlı, birçok hayati işlemleri yürütmektir. PMF'nin yok olması veya bozulması ATP'nin kaybına, besin maddelerinin aktif transportla taşınamamasına, hücre içi pH değerinin korunmasında rol oynayan K^+ ve kofaktör olarak rol oynayan Mg^{2+} iyonlarının hücre dışına akışına ve duyarlı bakterinin enerji rezervlerinin tükenmesine yol açar. Buna paralel olarak, DNA, RNA ve protein gibi makromoleküllerin sentezi azalarak, bakterilerin inhibisyonuna neden olmaktadır (De Martinis ve ark, 2002; Twomey ve ark, 2002; Cotter ve ark, 2005; Akkoç ve ark, 2009).

Bakteriyosinler, katyonik bir molekül olduğu için, sitoplazmik zar üzerinde etkili olmalarında, sahip oldukları hidrofobik kısımlar önemli rol oynamaktadır. Duyarlı hücre zarında bulunan negatif yüklü fosfat gruplarının etkisiyle, ortaya çıkan elektrostatik etkileşim sonucu, bakteriyosin hücre zarına tutunmaktadır. Böylece, hidrofobik kısım zar yapısının içine girerek, gözenek oluşumuna yol açmaktadır (Twomey ve ark, 2002).

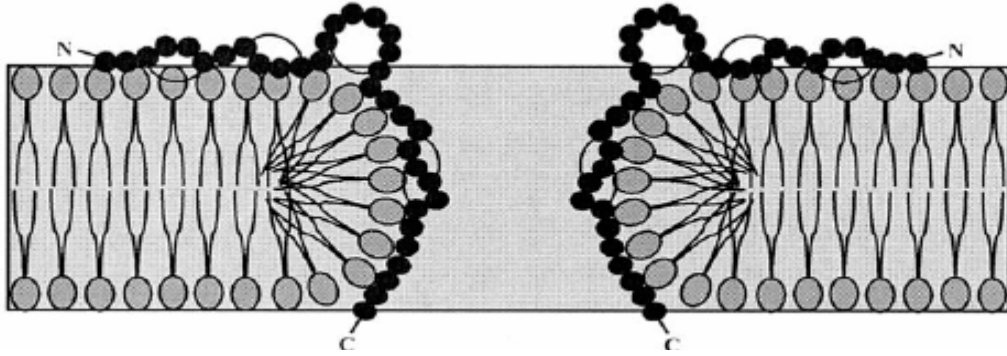
Bakteriyosinlerin, duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranda por oluşturmalarıyla ilgili olarak, öne sürülen başlıca üç model vardır. Bu modeller “Barrel–Stave”, “Wedge–Model” ve “Lipit II Model”dir.

Barrel-stave mekanizması ile por oluşumunda, bakteriyosinlerin katyonik yük taşıyan C-terminali fosfolipitlerin baş grupları ile elektrostatik etkileşime girerek, bu bölgede membranın incelmesine neden olurlar. Membran potansiyeli varlığında, membran içine girip, oligomerize olmakta ve böylece membranda Şekil 2.4’de grüldüğü gibi iyonik por oluşturmaktadırlar. Peptitler merkezi kanalın etrafında dizilmekte ve hidrofobik yüzeyler membrana doğru, hidrofilik yüzeyler ise porun merkezine doğru yönelmektedir (Garneau ve ark, 2002; Twomey ve ark, 2002).



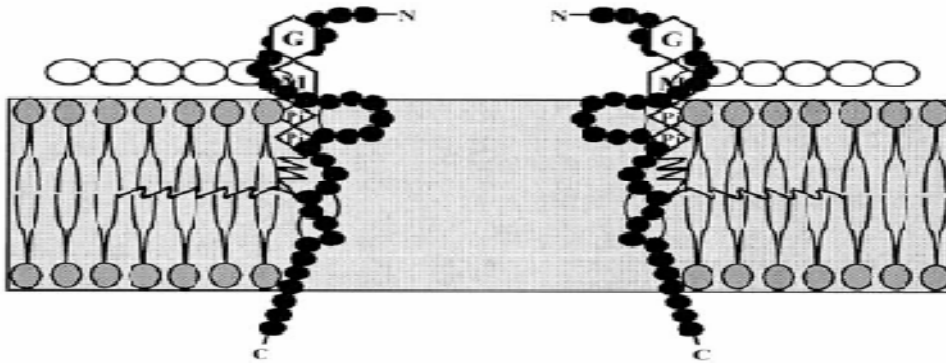
Şekil 2.4. Barrel-stave mekanizması ile por oluşumu.

İkinci model olan Wedge modelinde de, bakteriyosinlerin pozitif yüklü C-terminali anyonik fosfolipitlerle elektrostatik olarak interaksyona girip membran yüzeyine sıkıca tutunmakta ve lipit dinamiğinin bozulmasına neden olmaktadır. Bakteriyosin molekülleri, anyonik fosfolipitlerle interaksyon halindeyken membran içine girerek, membranda bükülmelere ve dolayısıyla porların oluşmasına yol açmaktadır (Twomey ve ark, 2002; Kurt ve Zorba, 2005). Şekil 2.5’de Wedge-Model por oluşumu gösterilmektedir.



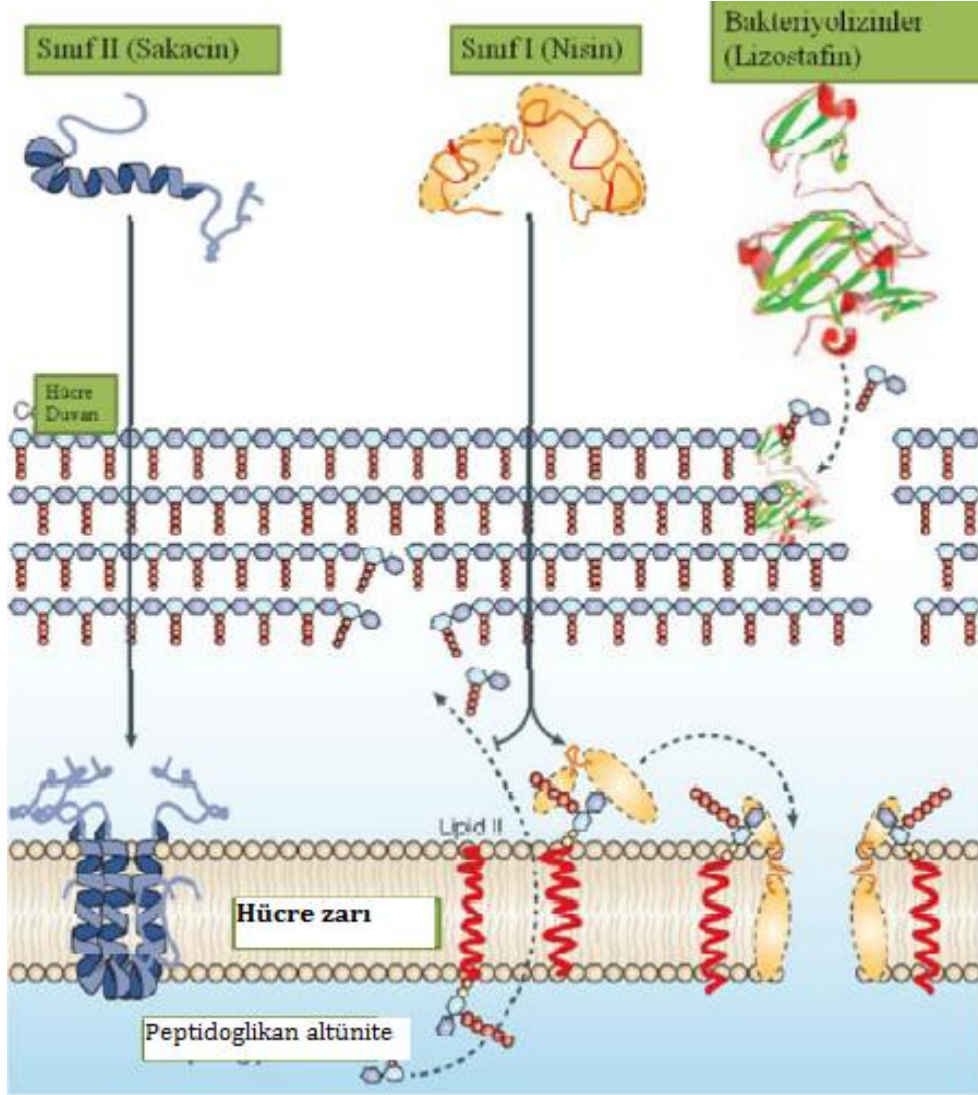
Şekil 2.5. Wedge-Model ile por oluşumu.

Lipit II modelinde ise, lantibiyotiklerin gözenek oluşturmasında lipid bağlı peptidoglukan prekürsörü olan lipid II önemli rol oynamaktadır. Bu mekanizmada, lantibiyotik 1:1 oranında ilk önce lipid 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 (Bauer ve Dicks, 2005). Şekil 2.6' da lipid II model por oluşumu gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Lipit II model mekanizması ile por oluşumu.

Grup I bakteriyosinler “wedge” modeli, Grup II bakteriyosinler ise “barrel-stave” modeli gözenek oluşturabilirler veya peptidler zarın yüzeyine paralel tutunarak zar strüktürünün içerisine girebilirler (Kurt ve Zorba, 2005). Şekil 2.7'de bakteriyosinlerin etki mekanizmaları gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları (Cotter ve ark, 2005).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler, genellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde inhibitör aktivite göstermektedirler. Birçok LAB bakteriyosinleri, gıdalarda bozulma ve hastalık etmeni bakteriler örneğin *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium botulinum* üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Gram negatif bakteriler, dış membranlarından dolayı antimikrobiyal maddelere karşı daha az geçirgen olduklarından, söz konusu bakteriler ısı ve donma işlemlerine maruz bırakıldıkları zaman, bakteriyosinlere karşı duyarlı hale geldikleri bildirilmiştir (Galvez ve ark, 2007). Gram negatif bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip, çok az sayıda da olsa

LAB bakteriyosinleri de tespit edilmiştir. *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*'un bazı suşlarının üretmiş olduğu bakteriyosinlerin, Gram pozitif bakterilerin yanı sıra, Gram negatif bakteriler üzerinde de etkili olduğu belirlenmiştir (Garneau ve ark, 2002; Cotter ve ark, 2005; Kurt ve Zorba, 2005; Asutay, 2007).

2.3.5. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları

2.3.5.1. Bakteriyosinlerin Gıdalarda Kullanımı

Modern gıda üretim tekniklerinde güvenilir, sağlıklı ve raf ömrü uzun gıdalar üretmek esas hedeftir. Son zamanlarda, gıdalarda kullanılan kimyasal koruyucuların bilinen ve/veya olası yan etkilerinden dolayı, tüketicilerin doğal ürünlere karşı ilgileri artmıştır. Bu nedenle de, gıdanın üretim aşamalarını kolaylaştıracak, gıdanın raf ömrünü uzatacak doğal ve etkili koruyucu maddelerin gıda üretiminde kullanılabilirliği üzerine, çok sayıda araştırma yapılmış ve yapılmaktadır. Bu doğal koruyucuların başında gelen ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler, son zamanların en çok araştırılan ve ilgi duyulan biyokoruyuculardır.

Bakteriyosinler, gıdalarda antimikrobiyel aktivite göstermelerinin yanı sıra, doğal, renksiz, tatsız ve kokusuz, özelliklere sahiptirler. Peptid veya protein yapılarında olmaları, pankreas kaynaklı proteolitik enzimlerden, mide salgılarından etkilenebildiklerini ve insan vücudunda sindirilebileceklerini göstermektedir. Ayrıca, bazı bakteriyosinlerin (Grup II) sıcaklığa karşı dirençli olması, yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır. Hatta bazı bakteriyosinler, otoklavda sterilizasyon koşullarında bile stabil kalabilmektedir. Bu nedenle de, bakteriyosinlerin et ve süt ürünleri başta olmak üzere, birçok gıdada kullanımını mümkün olmaktadır (De Martinis ve ark, 2002; Kurt ve Zorba, 2005).

Genelde, gıda uygulamaları için bakteriyosin üreten suş seçiminde, takip edilen kriterler şunlardır;

1. Seçilen suş, tercihen GRAS (Generally recognized as safe) (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir kabul edilen özelliklere sahip) olmalıdır.
2. Bakteriyosin *L. monocytogenes* ve *C. botulinum* gibi patojenlerin dahil olduğu geniş bir antimikrobiyel aktivite spektrumuna sahip olmalıdır.
3. Bakteriyosin ısıya dirençli olmalıdır.
4. Bakteriyosinin, gıda güvenliği açısından risk taşımamalıdır.
5. Ayrıca, kalite ve aroma bileşenlerinin geliştirilmesi gibi yararlı etkileri de olmalıdır (Tuncer, 2005; Akkoç ve ark, 2009).

Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlerin özellikleri, onları gıdaların korunmasında oldukça kullanışlı kılmaktadır. Genel olarak güvenilir bileşikler, GRAS kategorisindedirler. Ökaryotik hücrelere karşı, aktif ve toksik değildirler. Sindirim yolundaki proteazlarca inaktif hale gelirler, bu yüzden barsak mikroflorası üzerinde çok az etkileri vardır. Genelde, pH ve ısı karşısında stabildirler. Gıda kaynaklı patojenlere ve bozulmaya neden olan bakterilere karşı, geniş bir aktivite spektrumuna sahiptirler. Bakterisidal etkiye sahiptirler, hücre zarı üzerine etkili olurlar ve antibiyotiklerle çapraz direnç oluşturmazlar. Genetik determinantları genelde plazmidlerce kodlanır, bu özellik sayesinde de, genetik manipulasyona uygundur.

Gıdalarda bakteriyosinlerin kullanımını için 3 uygulama şekli vardır. Bunlar:

- Direk olarak bakteriyosinlerin gıdalara ilavesi,
- Bakteriyosin üreten LAB'lerin gıdaların üretiminde kullanılması ve
- Ambalajlama materyaline (yenilebilir filmlere) bakteriyosin ilavesidir (Asutay, 2007).

Bu amaçlarla koruyucu kültür olarak, daha çok laktik asit bakterileri, bakteriyosin olarak ise, yasal kullanımına izin verilen nisin kullanılmaktadır. Nisin, gıda işleme sırasında ve fermantasyonlarda ticari olarak kullanılan ilk laktik asit bakterisi bakteriyosinidir. Ayrıca, GRAS olarak kabul edilen ilk bakteriyosindir. Nisinin etki spektrumu, diğer birçok bakteriyosine kıyasla, daha geniş olup, asidik gıdalarda ve Gram pozitif bakteriler üzerine kuvvetli inhibisyon etki gösterirler. Nisin, düşük pH'ya dayanıklı ve vejetatif hücrelerin yanı sıra, bakteriyel endosporlara karşı da etkilidir (De Martinis ve ark, 2002; Chen ve Hoover, 2003).

2.3.5.2. Bakteriyosinlerin Klinik Kullanım Alanları

Bakteriyosinler, genel olarak gıdaların korunmasında kullanılsa da, lantibiyotiklerin toksik etkilerinin olmayışı ve Gram pozitif patojen bakterilere karşı, antimikrobiyel aktiviteye sahip olmaları, klinik etkilerinin de araştırılmasına öncülük etmektedir (Akkoç ve ark, 2009). Bazı lantibiyotiklerin, etki mekanizmalarının kesin olarak belirlenmesi ve yeni tanımlanan bir mekanizma ile çoklu-ilaç dirençliliğine sahip patojenlere karşı aktiviteye sahip olmaları, tedavi amacı ile kullanımlarına olanak sağlamaktadır. Örneğin, iki peptitli laktisin 3147 *Staphylococcus aureus* (methisillin dirençli *S. aureus* da dahil), enterokoklar (VRE dahil), streptokoklar (*S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus mutans*) *Clostridium botulinum* ve *Propionibacterium acnes* gibi bakteri türlerine karşı in vitro etkinliğe sahiptir.

Hayvan modelleriyle yapılan in vivo denemelerde, lantibiyotiklerin, *S. pneumoniae* ve MRSA kaynaklı enfeksiyonları, önlemede başarılı olduğu bildirilmiştir. Nisin ve laktisin 3147, süt endüstrisinde hayvanlar için büyük problem oluşturan, streptokok ve stafilokok kaynaklı mastiti engellemektedirler (Kruszewska ve ark, 2004).

2.3.6. Bakteriyosinlere Direnç

Bakteriyosinlerin hedef aldığı bakterilerin, zaman içerisinde o bakteriyosine karşı direnç geliştirme olasılıkları, gıda güvenliğinde etkin olarak kullanımları konusunda, bazı endişelere yol açmaktadır. Bu alanda en fazla çalışılan bakteriyosinler, nisin ve bazı Sınıf IIa peptidleridir. Bakteriyosinler, antibiyotiklerden farklı bir yapıya sahiptirler. Birçok antibiyotiğe karşı yüksek direnç kazanmış patojenler üzerinde bakteriyosinlerin direnç mekanizması, ilgi odağı olmasına karşın, bu konuda yeterli sayıda çalışma mevcut değildir. Her ne kadar, tüm bakteriyosinler için bu mekanizmaların nasıl işlediği bilinmese de, düşük molekül ağırlıklı bakteriyosinlerin çoğunun, bakteriyel membran ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu nedenle direnç, genellikle bakteriyosinin hedeflediği bakterinin membranındaki değişikliklere bağlı olarak şekillenmektedir. Direnç gelişimi, hücre zarının ve hücre duvarının yükü, hücre zarı akışkanlığının değişimi, hücre duvarı kalınlığı ve bu faktörlerin kombinasyonu ile ilgilidir (Vadyvaloo ve ark, 2004; Akkoç ve ark, 2009).

Antibiyotik dirençliliği genellikle, genetik determinant ile türler, suşlar ve hücreler arası dirençliliğin transfer edilebilmesiyle alakalıdır. Fakat antibiyotik dirençliliğinin aksine, bakteriyosin dirençliliği, hedef hücre membranında fizyolojik değişiklikler sonucu gerçekleşir. Bakteriyosine karşı direnç, genellikle bakteriyosinin hedeflediği bakterinin membranındaki değişikliklere bağlı olarak şekillenmektedir.

Sınıf II bakteriyosinlere direncin en iyi çalışıldığı örneklerden biri, Sınıf II a dirençli *L. monocytogenes*'dir. Bakteriyosine direnç, fosfotransferaz, sistemin, mannoz ve permeaz ekspresyonunu azaltmaktadır. Nisine dirençli mutantlarda olduğu gibi, hücre zarının akışkanlığı ve hücre yüzeyinin yükü, direnç gelişiminde önemlidir (Crandall ve Moontville 1998; Vadyvaloo ve ark, 2004).

2.3.7. Bakteriyosin Uygulamalarındaki Engeller

Bakteriyosinlerin antimikrobiyel aktiviteleri, gıdanın fiziksel özelliklerine ve kimyasal kompozisyonuna bağlıdır. Her ne kadar, bakteriyosinlerin birçok gıda

sisteminde koruyucu olarak uygulamaları denense de, bakteriyosinlerin tek başına koruyucu olarak kullanımlarında, bir engeller sistemiyle karşılaşılmaktadır. Gıda ortamında, çok sayıda faktör, bakteriyosinlerin aktivitesinde etkili olmakta ancak, bu faktörlerin hepsini aynı zamanda kontrol altına almak oldukça zor olmaktadır.

Bakteriyosin üreten mikroorganizmaların veya direk olarak bu kültürlerin ürettiği bakteriyosinlerin, gıda sanayinde kullanımlarını sınırlayan faktörlerin başında;

- Bakterinin adaptasyonu,
- Ürüne ait faktörler,
- Hedef bakterinin dayanıklılığı ve rekabet gücü,
- Yöntem parametrelerine duyarlılık,
- Metabolik aktivite,
- Gıda sistemindeki gereklilikler (İnaktivasyon riski),
- Duyusal özelliklere muhtemel olumsuz etkiler,
- Aktivite spektrumu,
- İnhibitörler (Spesifik proteazlar vs),
- Katı materyalde difüzyonun sınırlı olması,
- Dirençlilik gelişimi, gıda bileşenleriyle spesifik olmayan bağlanma (lipitlerin neden olabileceği inaktivasyon) şeklinde sıralanabilmektedir.

Bakteriyosinlerin gıdalarda uygulamalarını sınırlayan en büyük engel, onların sınırlı aktivite spektrumları ve antibakteriyel etkilerinin az olmasıdır. Ayrıca, bazı bakteriyosinler Gram negatif bakterilere karşı aktif değildir. Bakteriyosinlerin, çok faktörlü bir sistemin parçası olarak kullanılması, daha başarılı sonuçlar alınmasını sağlamaktadır. Gıda güvenliğinin sağlanmasında, birden fazla antimikrobiyel faktörün bir arada kullanılması sonucu, sinerjistik bir etkinin ortaya çıkmasına “Hurdle Etkisi” (veya engeller teknolojisi) denilmektedir (Cleveland ve ark, 2001; Chen ve Hoover, 2003). Bu kombine yöntemlerle, gıdaların muhafazasında tek başına yeterli olamayan bir çok faktör (sıcaklık, su aktivitesi, pH, oksidasyon/

redüksiyon potansiyeli, farklı antimikrobiyel maddeler) bir araya getirilerek, bunların etkileşimleri sonucu kümülatif bir etki yaratılmaktadır.

Bakteriyosinlerin büyük bir çoğunluğu, Gram pozitif bakteriler üzerinde büyük bir antimikrobiyel etki göstermesine karşın, Gram negatif bakteriler üzerinde etkisizdir. Ancak, Gram negatif bakterilerin dış membranlarının geçirgenlik bariyerleri etkisiz hale getirildiği takdirde, bakteriyosinlerin Gram negatiflere etkilerinin artacağı belirtilmiştir. Örneğin, Gram negatiflerin dış membranlarında lipopolisakkarit tabakada bulunan magnezyum iyonlarını bağlayan EDTA gibi çelat ajanları kullanıldığı takdirde, nisinin sitoplazmik zara geçişi sağlanabilmekte ve bu da antimikrobiyel etkiyi artırmaktadır.

2.3.8. Enterosinler

Enterosinler, *Enterococcus* spp. tarafından üretilen bakteriyosinler olup, aynı filogenetik yapı içinde yer alan *Listeria*'lara karşı inhibitör etkileri yüksektir. Enterosinler, diğer çoğu bakteriyosin gibi, sitoplazmik membran üzerinde etkilidirler. Hücre membranında, gözenekler oluştururlar ve böylece elzem hücre içi moleküllerin sızıntısı ile sonuçlanan transmembran potansiyeli ve/veya pH gradiyentini bozarlar. Enterokokal bakteriyosinler, genellikle *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., ve *E. coli* gibi bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı inhibitör aktiviteye sahiptirler (Foulquie ve ark, 2006; Nes ve ark, 2007; İşleroğlu ve ark, 2008). Özellikle, enterosin AS-48, hem Gram pozitif, hem de Gram negatif bakteriler üzerindeki geniş antimikrobiyel aktivitesinden dolayı, üzerinde en çok araştırma yapılan bakteriyosin arasında olmuştur.

Enterosinler, proteinaz K, α -kimotripsin, tripsin ve pepsin gibi bazı proteolitik enzimlere karşı duyarlıyken, lipaz, amilaz ve katalaz enzimlerine karşı dirençlidirler. Geniş pH aralıklarında aktivite gösteren enterosinler, asidik pH'larda daha fazla aktiftirler. Donma ve buzdolabı koşulları ile yüksek sıcaklığa (100°C) dayanıklıdır. Liyofilizasyonla kurutmadan sonra, uzun süre stabilitelelerini

koruyabilmektedirler (Cleveland ve ark, 2001; Moreno ve ark, 2003; Nes ve ark, 2007).

Bakteriyosinlerin, gıda bozulması yapan organizmalar ile gıda kaynaklı patojenleri inhibe edici aktiviteleri nedeniyle, gıda endüstrisinde biyokoruyucular olarak kullanımı yaygınlaşmaktadır ve bu bileşiklerin, geleneksel kimyasal koruyuculara bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Bakteriyosin üreten *Enterococcus faecium*'un, aynı zamanda iyi bir rekabetçi olması, bu organizmanın teknolojik açıdan önemini artırmaktadır.

Enterococcus faecium'un ürettiği bakteriyosinler, gıda ürünlerinde raf ömrünün ve gıdanın güvenliğinin artırılmasında kullanılmaktadır. *Enterococcus faecium*'a ait bakteriyosinlerin, starter kültür ya da biyokoruyucu olarak et ve süt endüstrisinde kullanımı yaygındır. Enterosinler ve enterosin üreten *Enterococcus faecium* suşları, sucukların fermantasyonunda, dilimlenmiş ve paketlenmiş etlerde *Listeria monocytogenes* ve mukaz oluşturan laktik asit bakterilerinin gelişiminin engellenmesinde, Cheddar peynirlerinde ise, *Listeria* aktivitesinin inhibisyonunda kullanılmaktadır (Giraffa, 2003; Leroy ve ark, 2003; İşleroğlu ve ark, 2008).

2.3.9. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokoklardan Elde Edilen Enterosinlerin Önemi

Enterokoklar, GRAS olarak kabul edilme ihtimali olan, bakteriler arasında yer almaktadır. Bazı enterokok türlerinin, starter kültür, koruyucu kültür veya probiyotik kültür olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir. Enterokoklar, özellikle de geleneksel peynirlerin aroma gelişiminde, önemli bir rol oynamaktadırlar. Enterokoklar, bakteriyosin gibi antimikrobiyel peptit üretimleri, esterolitik, lipolitik aktiviteleri ile yararlı bir takım özelliklere sahip olmaları yanında, hastane enfeksiyonlarına (nozokomiyal) neden olmaları açısından risk de taşımaktadırlar (Vuyst ve ark, 2003).

Gerek klinik kaynaklardan ve gerekse gıda kaynaklarından sıkça izole edilen suşların, *E. faecalis* ve *E. faecium* olduğu, yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Vuyst ve ark, 2003; Özdemir ve ark, 2011). Daha önce de değindiğimiz gibi enterokoklar,

bakteriyosin üretimleri ve bazı patojen bakteriler üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olmaları nedeniyle, yararlı mikroorganizmalar arasında sayılmaktadır. Ancak, burada ihmal edilmemesi gereken durum, özellikle de klinik kaynaklarda sıkça karşımıza çıkan virülans genlerinin, gıda kaynaklı olanlarda da taşıyor olabileceğidir. Nitekim şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, hem klinik hem de gıda kaynaklı enterokokların bazılarında, bu virülans genlerin bulunduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, bakteriyosin üreten bütün enterokok türlerinin yararlı türler olduğunu bildirmek hatalı olmaktadır. Enterokoklardan elde edilen ve gıdalarda koruyucu kültür, starter kültür veya probiyotik ticari kültür olarak kullanılması düşünülen enterokokların, virülans özelliğe sahip olup olmadıklarının belirlenmesi, önem taşımaktadır (Moreno ve ark, 2003; Vuyst ve ark, 2003; Sabia ve ark, 2007; Klibi ve ark, 2008; Özdemir ve ark, 2011; Nemade ve Musaddiq, 2012).

Bakteriyosinlerin genetik yapılarına bakıldığında, sitolisin içerenlerin daha çok klinik *E. faecalis* tarafından üretildiği görülmektedir ve virülansla ilişkilendirilmektedir. Fagasioza direnç gibi, hemolisin veya sitolisin üretim olayları enterokokların virülans özelliklerine katkı yapmaktadır. Özellikle de, vankomisin dirençli enterokoklar, bu anlamda tehlike yaratmaktadır. Bakteriyosin üretimi, hemolisin ve vankomisin direnci arasındaki ilişki, hem gıda hem de sağıktaki önemleri açısından bakteriyosin üreten enterokokların güvenli ticari uygulamalarını değerlendirilmesinde kullanılan normlardır (Vuyst ve ark, 2003; Sabia ve ark, 2007; Klibi ve ark, 2008).

2.3.10. Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etkileriyle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Kwon ve ark (1997), pediocin AcM, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus*' un bazı bakteri türlerine karşı inhibisyon etkisini belirlemişler, ancak, söz konusu bakteriyosinin, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* ve *Aeromonas hydrophila* ya karşı etkili olmadığını saptamışlardır.

Davies ve ark (1997), nisinin raf ömrü üzerindeki etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada, peynir örneklerine, 10^2 – 10^3 kob/g *L.monocytogenes* inoküle

ederek, 70 gün olgunlaştırılan peynir örneklerinde, 2,5 mg/l nisin, peynir türüne bağlı olarak 8 hafta ve üzerinde *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör etki gösterdiğini, diğer yandan kontrol grubu örneklerinde, 1–2 hafta içinde *L. monocytogenes* sayısının peynirde tüketilemeyecek düzeye çıktığını belirlemişlerdir.

Cintas ve ark (1998), enterosin L50, pediosin PA-1, nisin A ve laktosin S'nin, bazı bozulma etmeni ve gıda kaynaklı patojenlere karşı aktivitelerini incelenmişlerdir. Enterosin L50 ve pediosin PA-1 *L. monocytogenes*'e karşı fazlaca aktif olmalarına rağmen, nisin A ve laktosin S, aynı bakteriye karşı inhibitör aktivite göstermemişlerdir. Ayrıca, enterosin L50, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Clostridium botulinum*'a karşı da antimikrobiyel aktivite göstermiştir. Bu patojenler, diğer bakteriyosinlere karşı ise, az dirençli ya da kuvvetli dirençli bulunmuştur. *B. cereus* ATCC9139'un ise, saf enterosin L50 ve nisin A ekstraktlarına, duyarlı olduğu görülmüştür.

Toit ve ark (2000), *E. faecalis* suşlarının, genellikle enterokok türlerine karşı etkili olduğu, *E. faecium* suşlarının ise, *Propionibacterium* spp., *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *Clostridium sporogenes* ve *Clostridium tyrobutyricum*'u kapsayan geniş inhibitör aktivite spektrumuna sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Lee ve Paik (2001), *L. lactis* NK24 tarafından üretilen laktisin NK24'ün, çoğu LAB'lerine karşı, geniş bir antimikrobiyel spektruma sahip olduğu, Gram negatif bakterilerden, *E.coli* KCMM32396 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442'nin gelişimlerini inhibe ettiği ve bunun yanında, mayalara karşı hiçbir inhibitör etkiye sahip olmadığını belirtmişlerdir.

Benkerroum ve ark (2002), *L. lactis* spp. *lactis* CCM, tarafından üretilen bakteriyosinin, test edilen *L. monocytogenes* suşuna karşı, inhibitör aktiviteye sahip olduğu, ancak, *Micrococcus flavus*, *L. lactis* spp. *lactis* biov. *diacetylactis* ve *Bacillus* türlerine karşı inhibitör etki göstermediğini belirtmişlerdir.

Tahiri ve ark (2004), dondurulmuş midyelerden izole ettikleri *Carnobacterium divergens* M35 izolatının, ürettiği divergisin M35 bakteriyosinini saflaştırarak, tanımlamışlardır. Bu yeni bakteriyosinin sınıf IIa bakteriyosin grubuna dahil olduğunu ve molekül ağırlığının 4518,75 Da olduğunu, güçlü bir antilisteriyal etki gösterdiğini ve özellikle *L. monocytogenes*'e karşı yüksek

antimikrobiyel etkiye sahip, fakat *Escherichia*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* ve *Lactococcus*'lara karşı etkili olmadığını saptamışlardır.

Ghrai ve ark (2005), Rigouta peynirinden izole edilen *L. lactis* MMT24 tarafından üretilen laktokoksin MMT24'ün, *Lactobacillus* spp. ve *L. lactis*'e karşı, inhibitör etki gösterdiği, peynirde bozulma etmeni olan ve fermantasyonda sıklıkla kontaminant olan, *E. faecalis* ve *E. faecium*'a karşı ise inhibitör etki göstermediği belirlenmiştir.

De Kwaadsteniet ve ark (2005), *E. mundtii* ST15 tarafından üretilen bakteriyosinin, hem Gram pozitif, hem de Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olduğunu belirlemişlerdir. Söz konusu bakteriyosinin, test edilen *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* ve *Clostridium*'un bazı suşları ile *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve *S. caprinus*'un gelişimlerini inhibe ettiği saptanmıştır.

Todorov ve Dicks (2005), *E. faecium* ST311LD tarafından üretilen bakteriyosinin, bazı Gram pozitif (*E. faecalis*, *L. casei* ve *S. pneumoniae*) ve Gram negatif bakterilere (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) karşı inhibitör etki gösterdiğini saptamışlardır.

Von Mollendorff ve ark (2006), bozadan izole edilen *L. plantarum* ve *L. fermentum* tarafından üretilen bakteriyosinlerin, Gram pozitif bakteriler üzerinde geniş bir inhibitör spektruma sahip olduğu belirlemişlerdir.

Todorov ve ark (2007), *L. plantarum* AMA-K tarafından üretilen bakteriyosinin, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus* ile *E. coli* ve *K. pneumoniae*'ya karşı inhibitör etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Yoon ve ark (2008), fermente bir soya ürünü olan "Chungkukjang"dan izole edilen, *E. faecium* S2C10 ve S2C11'nin ürettiği bakteriyosinlerin, *L. monocytogenes* ve bazı LAB'lerine karşı antimikrobiyel etki gösterdiklerini saptamışlardır.

Ben Belgacem ve ark (2010), yaptıkları bir çalışmada, "Gueddid" olarak adlandırılan, geleneksel Tunus fermente et ürününden, 24 adet enterokok suşu izole etmişler ve bu suşların antimikrobiyel aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir. Moleküler yöntemle, bunların tümünün, *E. faecium* olarak tanımlamışlardır. Aynı araştırmada, enterokok suşlarını, gıda güvenliği ve fonksiyonel özellikleri açısından

incelemişler ve tüm izolatların, *Listeria* spp. dahil olmak üzere, gıdalarda bozulma yapan bir çok bakteriye ve gıda kaynaklı patojenlere karşı inhibitör etkisi gösteren bakteriyosinleri ürettiklerini belirlemişlerdir.

2.3.11. Bakteriyosinlerin *Listeria monocytogenes* Üzerine Antimikrobiyel Etkileriyle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Leroy ve Vuyst (2002), peynirden izole edilen *E. faecium* RZS C5 suşunun pH 6,5 ve 20-35°C inkübasyon sıcaklığında maksimum düzeyde bakteriyosin ürettiğini ve bu bakteriyosinin *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Bhatti ve ark (2004), sütler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, 4 log kob/mL oranında *L. monocytogenes* kültürü ile kontamine ettikleri çiğ ve pastörize sütlere, 125 IU/mL oranında hazırlanan nisin çözeltisi ilave etmişlerdir. Çalışmanın sonunda, pastörize sütlerde 4 gün, çiğ sütlerde 6 gün içinde *L. monocytogenes* sayısının 1 log kob/mL'nin altına düştüğünü saptamışlardır.

Hampikyan ve ark (2007), tarafından yapılan bir çalışmada, nisin Türki tipi sucuk hamuruna eklenmesi sonucunda, *L. monocytogenes*'in baskılandığı gözlenmiştir. Bu inhibisyon etkisinin, artan nisin konsantrasyonlarına paralel olarak yükseldiği belirtilmiştir.

Adetunji ve Adegoke (2007), *L. plantarum* (LAB4) ve *Lb. lactis* (LAB70) tarafından üretilen bakteriyosinin *L. monocytogenes* gelişimi üzerine olumsuz etkisi olduğunu saptamışlardır. Agar difüzyon metodu ile belirledikleri anti-listerial etkinin, saf bakteriyosinin 100°C'de 15, 20 ve 25 dakika ısı işlemi tabi tutulduktan sonra da devam ettiği belirlemişlerdir.

Ghrai ve ark (2008), Tunus "Rigouta" peynirinden izole edilen *E. faecium* MMT21 suşunun ürettiği enterosin A ve B'nin, laktik asit bakterilerinin yanı sıra, *L. monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde de inhibitör etkiye sahip olduğunu saptamışlardır.

Tome ve ark (2009), vakum paketlenmiş soğuk tütülenmiş somon balığı örneğinden, 614 LAB izole etmişlerdir. Bunlardan 9 tanesi bakteriyosin üreten olarak

belirlenmiştir. İnhibisyon zonlarına bakılarak, *L. monocytogenes*'e karşı inhibe edici etki gösterdiği belirlenmiştir. Bakteriyosin üreten 9 LAB'si, *L. curvatus* (3), *L. delbueckii*, *Pediococcus acidilactici*, *L. fermentum*, *Enterococcus faecium*(3) olarak belirlenmiştir. Bakteriyosinlerin, sınıf IIa, olduğu belirtilmiştir. *L. curvatus* ve *E. faecium* en fazla antimikrobiyel aktivite gösteren türler olarak belirlenmiştir.

Ortolani ve ark (2010), 36 çiğ süt örneği ve 18 çiğ süttten üretilmiş peynir örneklerinden, 389 LAB izole edilmiş ve bu izolatlardan, 58 tanesinin bakteriyosin ürettiğini ve *L. monocytogenes* üzerine antagonistik aktiviteye sahip olduğunu, BHI (Brain-Heart Infusion) katı besiyeri dökülmüş petrilere oluşan zonlar değerlendirilerek belirlemişlerdir.

Xie ve ark (2011), yaptıkları bir çalışmada geleneksel fermente süt ürünü olan Koumiss'den izole ettikleri *L. plantarum* LB-B1 türünün bakteriyosin üreterek *L. monocytogenes*'e karşı inhibe edici etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

2.3.12. Bakteriyosinlerin Farklı Ortam Koşullarındaki Antimikrobiyel Etkileri İle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Morena ve ark (2000), tarafından yapılan bir çalışmada, *L. lactis* (14 *L. lactis* subsp. *lactis* ve bir *L. lactis* subsp. *cremoris*)'in 15 suşun ürettiği olduğu bakteriyosinlerin ısı işleme dayanıklı, bazı proteolitik enzimlere duyarlı ve geniş pH aralığında aktivitesini koruduğu (2,0-8,0 pH) saptanmıştır. Sadece, *L. lactis* subsp. *lactis* ITAL 383 suşunun oluşturduğu bakteriyosinin, Gram pozitif bakteriler üzerinde, geniş inhibitör spektruma sahip olduğu ve molekül ağırlığının nisninki ile aynı (3.5 kDa) olduğu belirlenmiştir.

Ohmomo ve ark (2000), enterosin ON-157'nin (*E. faecium* NIAI 157), amilaz ve proteolitik enzimlere duyarlı, LAB ve *L. monocytogenes* 'e karşı inhibitör etki gösterdiği, 37°C'de MRS besiyerinde maksimum düzeyde üretildiği saptanmıştır. Ayrıca asidik (2-5 pH) koşullarda ısı işleme (100°C'de 30 dakika) dayanıklı olmasına karşın, nötr ortamlarda (6-7 pH) ısı işleme (100°C'de 30 dakika) duyarlı olduğu da belirtilmiştir.

Losteinkit ve ark (2001), *E. faecium* N15 tarafından üretilen bakteriyosinin proteinaz K, tripsin ve pepsin gibi proteazlara karşı duyarlı, lipaz enzimine, 100°C'de 2 saat uygulanan ısı işleme dayanıklı, ancak 121°C'de 15 dakika otoklavlama koşullarında aktivitesini tamamen kaybettiği saptanmıştır. Ayrıca geniş bir pH aralığında (2-10) aktivitesini koruduğu gözlenmiştir.

Lee ve Paik (2001), *L. lactis* NK 24 tarafından sentezlenen laktisin NK'nın logaritmik fazın ortasında üretilmeye başladığı, erken durgun fazda maksimum düzeye ulaştığı ve durgun fazın uzamasıyla aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Laktisin NK'nın proteaz IX veya proteaz XIV ile muamele edildiğinde aktivitesini tamamen kaybettiği, α -amilaz, lipaz, tripsin, ısı işleme (100°C'de 30 dakika), pH (2,0-9,0) ve organik çözücülere (etanol, metanol, aseton, toluen, isopropanol, kloroform) karşı dayanıklı olduğu görülmüştür. Molekül ağırlığının ise 3,0-3,5 kDa arasında olduğu ve inhibitör spektrumunun geniş olduğu, ancak Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir.

Cheigh ve ark (2002), *L. lactis* subsp. *lactis* A164 tarafından üretilen nisin benzeri bakteriyosinin üretiminin, karbon ve azot kaynaklarından fazlaca etkilendiği görülmüştür. A164 suşunun, M17 besiyerinde diğer karbon kaynakları yerine laktoz kullanıldığında 4 kat daha fazla bakteriyosin ürettiği gözlenmiştir. %3 düzeyinde maya ekstraktı ilavesi optimum azot kaynağı olarak bulunmuştur. Söz konusu bakterinin, optimum gelişme sıcaklığı 37°C iken, maksimum düzeyde bakteriyosin üretimi için gerekli sıcaklığın, 30°C olduğu gözlenmiştir. Gelişme için optimum pH aralığının 5,5-6,5 arasında değişirken bakteriyosin üretimi için optimum pH'nın 6,0 olduğu belirlenmiştir. En yüksek aktivite, M17L broth (%3 laktoz), 30°C ve pH 6,0'da erken durgun gelişme fazında gözlenmiştir.

Phillips ve Duggan (2002), ısı işlemin tek başına ve nisinle birlikte *Arcobacter butzleri* üzerindeki etkisini belirlemek için bir araştırma yapmışlardır. Çalışma sonucunda, 60°C'de 10 dakikak ısı işleme tabi tutulup 30°C'ye soğutulan ve nisin eklenen (500 IU/mL) ve bu sıcaklıkta 24 saat inkübe edilen *A. butzleri* örneğinde canlı bakteri tespit edilmediği belirlenmiştir.

Onda ve ark (2003), *Lactococcus* sp. GM005 inkübasyon koşulları 30°C ve pH 6,0'da sabit tutularak geliştirildiğinde ürettiği bakteriyosinin aktivitesinin, kontrolsüz pH koşullarına göre 8 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Garcia ve ark (2003), *Bacillus coagulans*'a karşı enterosin EJ97 (1 µg/mL)'nin aktivitesi üzerine koruyuculardan Na-benzoat ile NaCl ve pH'nin etkilerini incelemiştir. Çalışma sonucunda, enterosin Na-benzoat (%0,1 ve 0,05) veya NaCl (%3 ve %6) ile birlikte kullanıldıklarında bakteri gelişimi üzerine etkilerinin enterosin yalnız kullanıldığında elde edilenle aynı olduğunu belirlemiştir. Benzoik asit ve NaCl'ün tek başlarına kullanıldıklarında bakteri gelişimini engellemediklerini saptamışlardır. En yüksek bakteriyosin aktivitesinin pH 7,0'de görüldüğünü ve bakteri sayısında yaklaşık 4 log'luk bir azalmanın olduğunu, ancak asidik pH'da bakteriyosin aktivitesinin azaldığını, alkali pH'da (9,0) ise bakteriyosin aktivitesinin çok düşük olduğunu saptamışlardır.

Nes ve ark (2003), *E. faecium* EK 13 tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitesinin, 4 ve -20°C'de uzun depolama periyotlarında değişmediği, optimum bakteriyosin üretiminin, 30°C ve 37°C ve pH 5,0-6,5 aralığında olduğu saptanmıştır. Bakteriyosinlerin aktivitesinin logaritmik gelişme fazında en yüksek olduğu görülmüştür.

Park ve ark (2003), *E. faecium* JCM 5804T'nin ürettiği bakteriyosinin proteinaz K, tripsin, α-kimotripsin ve papain enzimlerine duyarlı, yüksek ısı işleme dayanıklı (100°C'de 30 dakika), geniş pH aralığında (2-10 pH) aktivitesini muhafaza ettiği, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *L. monocytogenes*'i inhibe ettiği belirlenmiştir.

Sabia ve ark (2004), *E. casseliflavus* ve *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosinler üzerine yaptıkları 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 dakika otoklavlama işleminden sonra bile antimikrobiyel aktivitesini koruduğu görülmüştür.

Ananou ve ark (2004), gıda koruyucularının varlığında, enterosin AS-48 (0,125 µg/l)'in, *S. aureus* CECT 976 suşu üzerine inhibitör davranışını incelemiştir. Araştırma sonucunda, asidik pH değerlerinde (4 ve 5), enterosinin inhibitör aktivitesinin arttığı, NaCl (%2, 4, 6 ve 7) varlığında ise, aktivitesinin etkilenmediği gözlenmiştir. Ancak, NaCl (%6-7), enterosin ve buzdolabı sıcaklığı kombinasyonları birlikte uygulandığında, hücre sayısında 2,7-3,6 logaritmik bir azalmanın olduğu belirlenmiştir.

Ananou ve ark (2005a), enterosin AS-48'in *E. coli* O157:H7 karşı aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri bir çalışmada, nötral pH'da bakterinin enterosine karşı dayanıklı olduğu, ancak düşük (5,0) ve yüksek (8,5) pH değerlerinde duyarlılığının arttığı belirlenmiştir.

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, Triton X-100, SDS, Tween 20, Tween 80, üre ve EDTA'dan etkilenmediğini belirlenmiştir.

Drosinos ve ark (2006), *L. mesenteroides* E131 gelişimi için, optimum sıcaklık (25-30°C) ile maksimum bakteriyosin aktivitesinin görüldüğü sıcaklığın (25°C) birbirine yakın olduğunu belirtmişlerdir ve bu suş için en iyi hücre gelişiminin pH 6,5 iken maksimum bakteriyosin aktivitesinin pH 5,5'te gösterdiğini saptamışlardır.

Campos ve ark (2006), *L. lactis* subsp. *lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46 ve *E. mundtii* USC-51 tarafından üretilen bakteriyosinlerin, proteinaz K ile inaktive olduğunu, ayrıca tüm bakteriyosinlerin 100°C'de 60 dakika veya 121°C'de 15 dakika ısıtılma dayanıklı olduğu görülmüştür. *L. monocytogenes*'e karşı olan aktiviteleri suşa bağlı olarak pH 3,5-5,5 veya 3,5-6,5 aralığında devam etmiştir.

Ananou ve ark (2007), enterosin AS-48 (*E. faecalis* A-48-32)'in *S. aureus*'a karşı aktivitesi üzerine organik asitlerin etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, sitrik (%0,3-0,6) ve asetik asidin (%0,5-1,0) sadece düşük pH (4,5)'da, laktik asidin (%1,0) ise hem düşük hem de nötral pH (7,0)'da enterosinin aktivitesini arttırdığını bulmuşlardır. Asidik pH'da, benzoat (%0,06-0,12) veya sorbat (%2-3)'in

enterosin aktivitesini çok az düzeyde arttırdığını, nötral pH'da ise bakterisidal aktiviteyi hiç etkilemediğini belirlemişlerdir.

Ghraiiri ve ark (2008), *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 dakika uygulanan ısı işleminden sonra aktivitesini kaybettiği belirtmişlerdir.

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

2.3.13. Bakteriyosinlerin Gıdalarda Kullanımıyla İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Budde ve ark (2003), vakum paketlenmiş et örneklerinden izole ettikleri *L. carnosum* 4010 suşunun, güçlü bir antimikrobiyel etkiye sahip olduğunu ve et ürünlerinin muhafazasında koruyucu olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Deneysel olarak üretilmiş vakum paketlenmiş sucuklara, 10⁷ kob/g *L. carnosum* ilave ettiklerinde, *Listeria monocytogenes* sayısında, hızlı bir azalma olduğunu belirten araştırmacılar, aynı zamanda, 5°C'de 21 günlük muhafaza süresince de, *L. monocytogenes* sayısında bir artış gözlemediklerini rapor etmişlerdir.

Rodriguez ve ark (2005a), bakteriyosin üreten *L. lactis* ve *P. acidilactici* ile birlikte, hedef patojenleri (6 log kob/mL) inoküle ederek ürettikleri peynirlerde, olgunlaşma boyunca gıda patojenlerinin inhibisyonunu araştırmışlardır. Muhafazanın 30. gününde bakteriyosinojenik starter katılan peynirlerde patojen sayısının 2-0 log kob/g'a düştüğünü ve özellikle pediocinin tüm olgunlaştırma periyodu boyunca etkisini koruduğunu belirtmişlerdir.

Rodriguez ve ark (2005b), yaptıkları çalışmada, bakteriyosinlerin, diğer bileşiklerle birlikte, gıda patojenlerine karşı etkilerini araştırmışlardır. Çiğ sütlerden yapılan peynirlerde *E. coli* O157: H7'nin inaktivasyonunda, yüksek basınç ve bakteriyosin uygulamasının kombine etkisini araştırmışlardır. Süte inoküle ettikleri patojenin (10⁶ kob/mL) 60 gün sonunda kontrol örneklerinde 5,1 log kob/g'a düştüğünü, bakteriyosin katılmadan basınç uygulanan (300 MPa'da 50 gün)

peynirlerde, bu sayının 3,8 log kob/g olduğunu, hem basınç hem bakteriyosin uygulaması sonucunda ise, sayının 2 log kob/g olduğunu belirtmişlerdir. Bu kombine sistemin güvenilir olduğunu rapor etmişlerdir.

Solomakos ve ark (2008), nisin ile kekik yağının kombine kullanımı sonucunda, kıymada *L. monocytogenes* sayısında azalma olduğu bildirilmiştir. Uygulanan dozlar arasında en etkili olan, %0,6 kekik yağı ve 1000 IU/g nisin olarak belirlenmiştir ve bakteri sayısı, bu kombine kullanım sayesinde Avrupa Birliği'nin *L. monocytogenes* için olan 2 log cfu/g resmi limitinin altına düştüğünü saptamışlardır.

2.3.14. Gıdalarda Enterosin Kullanımıyla İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Giraffa ve ark (1995), *E. faecium* 7C5 tarafından bakteriyosin üretiminin, serum ayrılması süresince başladığını ve genellikle peynir tuzlamanın hemen ardından maksimum miktara ulaştığını göstermişlerdir. Olgunlaşma boyunca, enterosin stabilitesinin etkilenmediğini ve *E. faecium* 7C5'in Taleggio peynirinin yüzeyinde, *L. monocytogenes* gelişmesini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. *E. faecium* RZS C13 ve *E. faecium* CCM 4231, İspanyol tip kuru fermente sosislerin üretimi için starter kültür olarak kullanılmışlar ve *Listeria* spp.'ın gelişimini kuvvetlice inhibe ettikleri belirlemişlerdir.

Laukova ve ark (1999), süt ürünlerinde yaptıkları bir çalışmada, enterokokal bir bakteriyosin olan enterosin CCM 4231'in *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gelişimini inhibe ettiğini saptanmışlardır.

Aymerich ve ark (2000), farklı et ürünlerine *E. faecium* CTC 492 tarafından üretilen enterosin A ve B'yi, yarı-safılaştırılmış gıda katkıları olarak uygulamışlardır. *Listeria*'nın gelişimi üzerine bir inhibitör etki belirlenmiştir. Fakat, üretici suşun tek starter olarak eklenmesi kuru fermente sosislerde, *Listeria*'nın gelişiminin inhibisyonu üzerine etkisinin olmadığı, ancak hem *E. faecium* CTC 492 ve hem bunun enterosinlerinin kombinasyonu birlikte kullanıldığında, dilimlenmiş pişmiş jambonda yapışkanlığı önlediği tespit edilmiştir.

Grande ve ark (2005), tarafından yapılan bir çalışmada, *E. faecalis* A-48-32'den üretilen enterosin AS-48'in, meyve sularında bozulma etmeni olan

Alicyclobacillus acidoterrestris'e karşı etkisi incelenmiş ve bu bakterinin, enterosin AS-48 (25µg/mL) tarafından inaktif edildiği ve 14 gün boyunca gelişmediğini belirlemişlerdir.

Ananou ve ark (2005b), *E. faecalis* A-48-32 tarafından üretilen enterosin AS-48'in sosislerde *S. aureus* gelişimini inhibe ettiğini saptamışlardır.

Ananou ve ark (2005c), model sosis kullanılarak yaptıkları bir başka çalışmada, *E. faecalis* A-48-32 tarafından üretilen enterosin AS-48'in, düşük konsantrasyonda (112 AU/g) ilave edildiğinde, *Listeria* spp. sayısını belirgin şekilde azalttığı, yüksek konsantrasyonda (225 AU/g) katıldığında ise *Listeria* spp. sayısının 3 gün inkübasyonun sonunda belirleme değerinin altında kaldığı saptanmıştır. Fakat, 9 gün sonra *Listeria* spp. gelişiminin tekrar gözlemlendiği belirtilmiştir.

Moreno ve ark (2006), kuru fermente Hornad salamında, *L. monocytogenes* kontaminasyonu kontrolünde enterosin CCM 4231'in etkinliği incelenmiştir. Araştırma sonucunda, bakteriyosin ilavesinden hemen sonra kontrole karşılaştırıldığı zaman *L. monocytogenes*'in 1,67 log azaldığı, bir hafta sonra *L. monocytogenes* kontrol örneğinde 10^7 kob/g ulaşırken, deney örneğinde bu sayının, 10^4 kob/g'a ulaştığı gözlenmiştir.

Basanta ve ark (2008), *E. faecium* L50 tarafından üretilen enterosin L50, enterosin P ve enterosin Q'nun biralarda bozulmaya neden olan *L. brevis* ve *P. damnosus* ile *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Cl. botulinum*'a karşı kuvvetli bir inhibisyon etkisi olduğu saptamışlardır.

Cebrian ve ark (2012), İspanya'da yaptıkları bir çalışmada, İspanyol koyun peyniriden izole edilen *E. faecalis* UGRA1'in AS-48 enterosin ürettiğini tespit etmişlerdir. *E. faecalis* UGRA1 suşunda, gıda güvenliği açısından biyojenamin üretimi, virülans genler ve antibiyotik direnç durumu araştırılmıştır. Ayrıca, bu suşun, *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, geniş spektrumlu bakteriyosin üreten bu suşun gıda muhafazasında koruyucu bir ajan olarak ve bir probiyotik olarak biyoteknolojik potansiyeli olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri Kültürleri

Bu çalışmada, gıda kökenli 10, klinik kökenli 10 olmak üzere toplam 20 enterokok suşu kullanılmıştır. Gıda kaynaklı enterokok suşları, çeşitli gıdalardan, klinik kökenli enterokok suşları ise, Ç.Ü. Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olup, bu suşlarla ilgili bilgiler, Çizelge 3.1’de verilmiştir. İndikatör mikroorganizma olarak *Listeria monocytogenes* ATCC7644 (Remel-USA) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Gıda ve klinik kaynaklı enterokok izolatları

Örnek Kodu	İzolat Kaynağı	Mikroorganizma Türü
A1	Urfa Peyniri	<i>E. faecalis</i>
AS1	Ev yapımı Sucuk	<i>E. faecalis</i>
JS1	Tavuk eti	<i>E. faecalis</i>
LS1	Tavuk eti	<i>E. faecalis</i>
NS1	Ev yapımı Sucuk	<i>E. faecalis</i>
E5	Antep Peyniri	<i>E. faecium</i>
H8	Erzincan Tulum Peyniri	<i>E. faecium</i>
L13	Hatay İnek Peyniri	<i>E. faecium</i>
P18	Kaşar Peyniri	<i>E. faecium</i>
YS1	Kangal Sucuk	<i>E. faecium</i>
225, 226, 227, 228, V188	Klinik kaynak	<i>E. faecalis</i>
V65, V98, V105, V150, V198	Klinik kaynak	<i>E. faecium</i>

3.1.2. Besiyerleri ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kullanım amaçları, Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri, özellikleri ve kullanım amaçları

Besiyeri	Özellik	Kullanım amacı
Brain Heart Broth (BHI)	Merck, hazır besiyeri	Enterokok stok kültürü
Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAA)	Merck, hazır besiyeri	Enterokok ön kültürü
MRS (Man Ragosa and Sharp) Broth	Merck, hazır besiyeri	Enterokok suşlarının geliştirilmesi ve bakteriyosin ekstraksiyonu
Nutrient Agar	Merck, hazır besiyeri	<i>Listeria monocytogenes</i> 'in geliştirilmesi
Nutrient Broth	Merck, hazır besiyeri	<i>Listeria monocytogenes</i> 'in geliştirilmesi
Mueller-Hinton Agar	Merck, hazır besiyeri	Antimikrobiyel etkinin belirlenmesi

Çalışmada, aşağıda belirtilen çözeltiler kullanılmıştır:

- Amonyum sülfat [(NH₄)₂SO₄] (Merck); Proteinlerin çöktürülmesi aşamasında,
- Sodyum hidroksit (NaOH) ve Hidrojen klorür (HCl); pH ayarlanmasında,
- Potasyum fosfat; Bakteriyosin ekstraktının süspansiyonunda.

3.2. Metod

3.2.1. Enterokok Stok Kültürlerinin Saklanması

Hem klinik, hem de gıda kökenli enterokok suşları, %10 gliserol ve %10 kan içeren Brain Heart Broth içerisinde, -20°C’de stok kültür olarak saklanmıştır.

3.2.2. Enterokok Ön Kültürlerinin Hazırlanması

Stok kültürden, öze yardımı ile alınan enterokok izolatlarının her birinden, Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAA)’a sürme ekim yapılarak, plaklar 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kolonilerden bir öze dolusu alınarak, bakteriyosin eldesi için, MRS broth’lara inoküle edilmiştir.

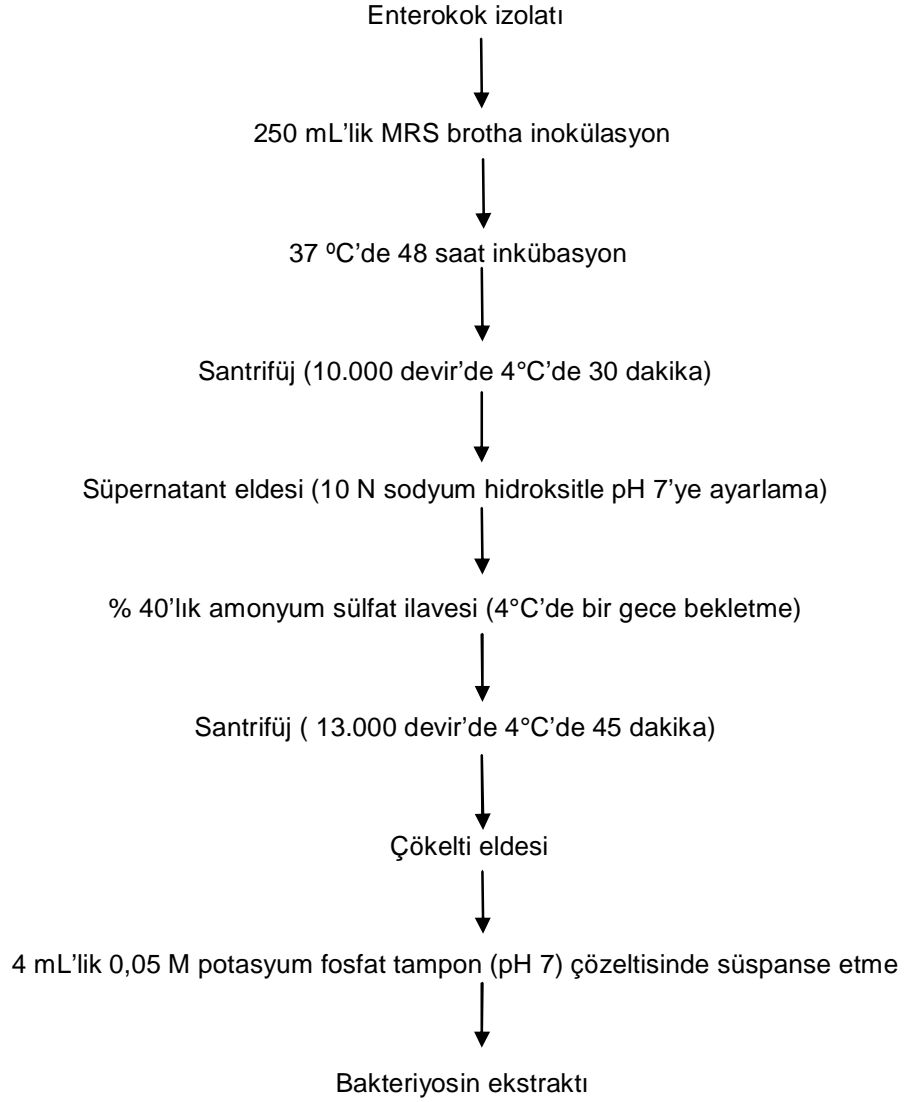
3.2.3. Bakteriyosinin Kısmi Saflaştırılması

Saf enterokok izolatlarının her birinden bir öze dolusu alınıp, 5 mL’lik MRS broth besiyerlerine inoküle edildikten sonra, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde gelişen kültürler, 250 mL’lik MRS broth besiyerleri içine döküldükten sonra, 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, gelişen kültürler +4°C’de 10.000 devirde 30 dakika santrifüjlenerek, hücre parçacıkları ve kaba partiküller ayrılmıştır. Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek, yeni tüplere kültür üst sıvısı (süpernatant) aktarılmış ve süpernatantta, organik asitin antimikrobiyal etkisini engellemek için 10 N sodyum hidroksitle (NaOH) süpernatantın pH’sı 7,0’ye ayarlanmıştır. Bakteriyosinler protein yapısında bileşiklerdir. Bu yüzden santrifüjleme işleminin ardından, süpernatant içerisine proteinlerin çöktürülmesi amacıyla, son konsantrasyon oranı %40 olacak şekilde, yavaş yavaş amonyum sülfat ilave edilmiş ve eriyinceye kadar karıştırılmıştır. Amonyum sülfat ilave edilen süpernatantlar, santrifüj tüplerine aktarılmış ve +4°C’de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra örnekler, +4°C’de 13.000 devirde 45 dakika

süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bitiminde, üst faz dökülmüş ve çökelti oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulmuş çökelti, 4 mL steril 0,05 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde çözülmüştür. Santrifüj tüpündeki oluşan çökeltinin süspanse edilmemiş hali, Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Süspanse edilen çökelti karışımı, kısmi bakteriyosin ekstraktı olarak kullanılmıştır. Bakteriyosin ekstraktının antimikrobiyel etkisi, indikatör mikroorganizma olarak kullanılan *Listeria monocytogenes*’e karşı 3.2.7’de anlatılan Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metodu ile belirlenmiştir. Deneme, iki tekrarlı olarak çalışılmıştır (Moreno ve ark, 2003; Savadogo ve ark, 2004; Bilgin, 2008). Şekil 3.2’de bakteriyosinin kısmi saflaştırılma aşamaları gösterilmiştir.



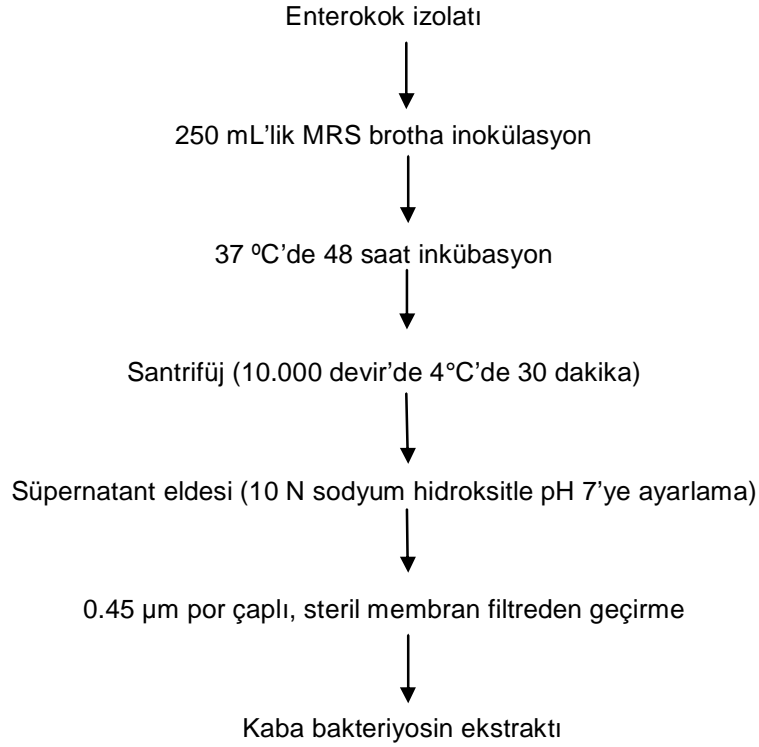
Şekil 3.1. Süspanse edilmemiş kısmi bakteriyosin.



Şekil 3.2. Enterokok izolatlarından bakteriyosinin kısmi saflaştırılması (Savadoğo ve ark, 2004).

3.2.4. Kaba Bakteriyosin Ekstraksiyonunun Eldesi

Saf enterokok izolatlarının her birinden bir öze dolusu alınıp, 5mL'lik MRS broth besiyerlerine inoküle edildikten sonra, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde gelişen kültürler, 250 mL'lik MRS broth besiyerine ilave edildikten sonra, 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, gelişen kültürler, +4°C'de 10.000 devirde, 30 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek, yeni tüplere aktarılan kültür üst sıvısının (süpernatantın), pH'sı 10 N sodyum hidroksit kullanılarak, 7,0'e ayarlanmıştır. Daha sonra, pH'sı ayarlanmış olan süpernatantlar, steril şırıngalarla çekilerek, 0.45 µm por çaplı, steril membran filtreden süzölmüş ve süzöntüler steril tüplere toplanmıştır. Elde edilen kaba bakteriyosin ekstratının, *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkisi 3.2.7'de anlatılan Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metodu ile belirlenmiştir. Deneme iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Powell ve ark, 2007; Ghamat, 2010; Koral, 2011). Kaba bakteriyosin aşamaları Şekil 3.3'de belirtilmiştir.



Şekil 3.3. Enterokok izolatlarından kaba bakteriyosin eldesi (Powell ve ark, 2007; Ghamat, 2010; Koral, 2011).

3.2.5. Sıcaklığın Bakteriyosinin Antimikrobiyel Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

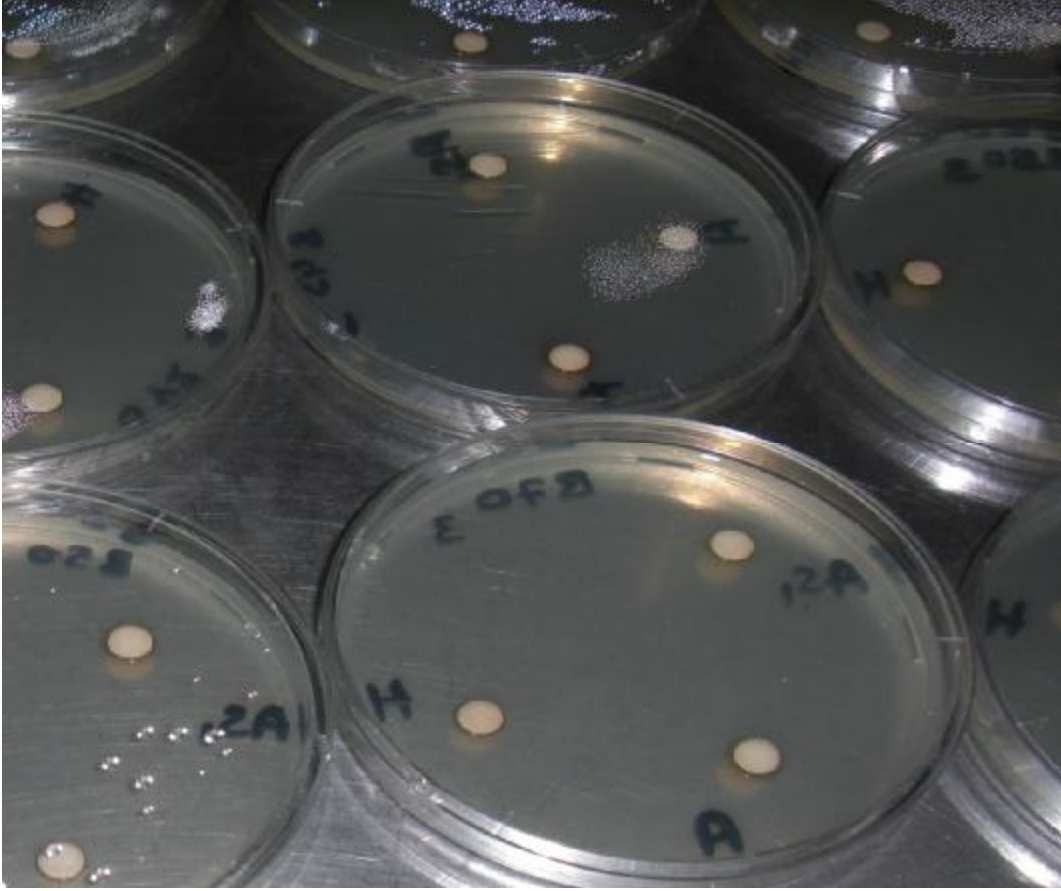
Bakteriyosinin antimikrobiyel aktivitesi üzerine, sıcaklığın etkisini denemek amacıyla, gıda ve klinik kökenli enterokok suşlarından elde edilen ve pH'sı 7,0'e ayarlanmış kaba bakteriyosinler, 60, 70, 80, 90, 110 ve 121°C'lerde 15 dakika olmak üzere, farklı sıcaklık uygulamalarına tabi tutulmuşlardır. Oda sıcaklığında soğutulmuş bakteriyosin örnekleri, 0.45 µm por çaplı, steril membran filtreden süzülerek, steril tüplere alınmıştır. Farklı sıcaklıklara maruz bırakılmış bakteriyosin örneklerinin antimikrobiyel aktiviteleri, *Listeria monocytogenes*'e karşı 3.2.7'de belirtilen disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Kontrol örneği olarak, ısı işlem uygulanmamış bakteriyosin yani 3.2.4'de elde edilen kaba bakteriyosin kullanılmıştır (Powell ve ark, 2007; Ghamat, 2010; Koral, 2011). Deneme iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. pH'nın Bakteriyosinin Antimikrobiyel Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisini araştırmak amacıyla, bakteri izolatlarına ait süpernatantların pH'ları, 5 M NaOH veya 5 M HCl ile 3, 5, 7, 9 ve 11'e ayarlanmıştır. İki saat oda sıcaklığında bekletilen örnekler, daha sonra pH'sı 7,0'ye ayarlanarak, 0.45 µm por çaplı membran filtrelerden geçirilerek sterilize edilmişlerdir. Farklı pH'lara ayarlanan bakteriyosin çözeltilerinin *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etkileri, 3.2.7'de belirtilen disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Kontrol örneği olarak, pH'sı 7'ye ayarlanmış kaba bakteriyosin kullanılmıştır (Powell ve ark, 2007; Ghamat, 2010; Koral, 2011). Deneme iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metodu ile Antimikrobiyel Etkinin Belirlenmesi

Bakteriyosinin antimikrobiyel aktivitesini belirlemek için, indikatör mikroorganizma olarak kullanılan *Listeria monocytogenes*, Nutrient agar'da 37°C'de 24 saat inhibe edilmiştir. Daha sonra gelişen koloniler, McFarland Standardına göre 0,5-0,6 McFarland düzeyinde ($1,5 \times 10^6$ kob/g) steril fizyolojik tuzlu su ile süspanse edilmiştir. Elde edilen süspanسیون, Mueller-Hinton agar içeren petrilere, 0,1 mL ilave edilerek, drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. Test mikroorganizması ekilmiş besiyeri yüzeyine, Şekil 3.4'de görüldüğü üzere boş kağıt diskler (Oxoid CM0998) yerleştirilerek, üzerine 100 µL bakteriyosin örneği damlatılmıştır. Daha sonra petriler, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, indikatör bakteriye karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiş ve zon çapları mm cinsinden ölçülerek, değerlendirilmiştir (Yamato ve ark, 2003; Campos ve ark, 2006).



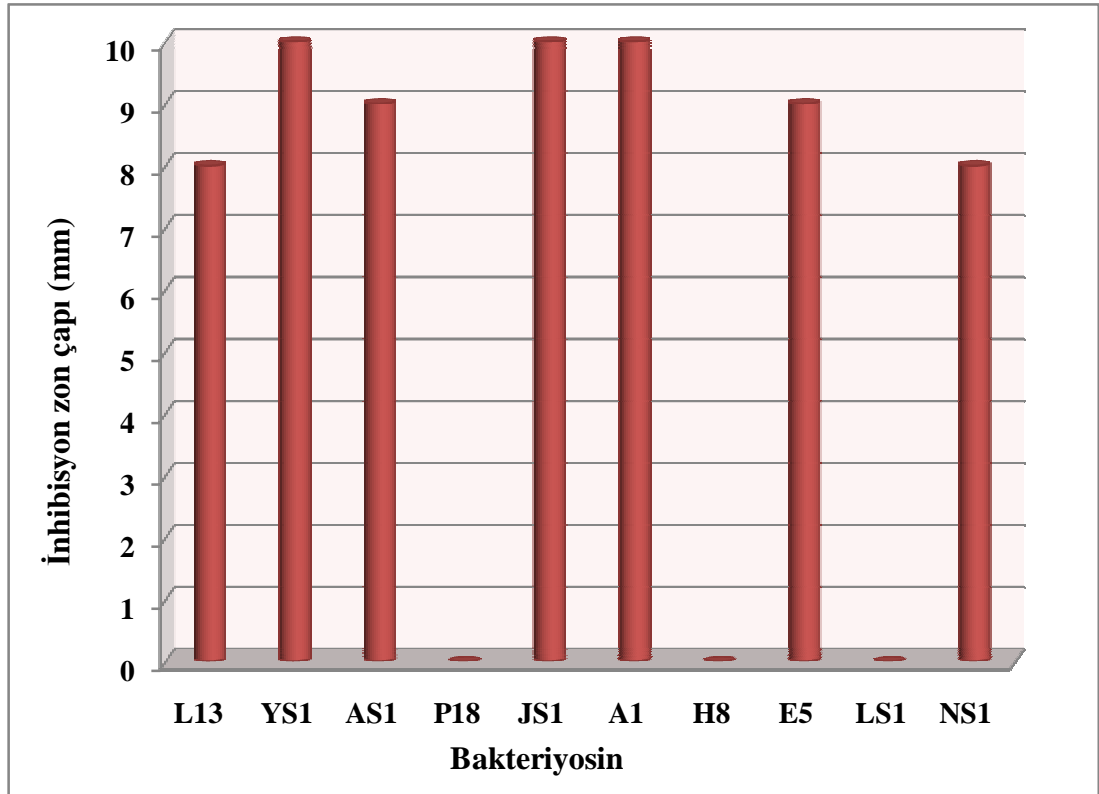
Şekil 3.4. Test mikroorganizması içeren besiyeri yüzeyine kağıt disklerin (Oxoid CM0998) yerleştirilmesi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

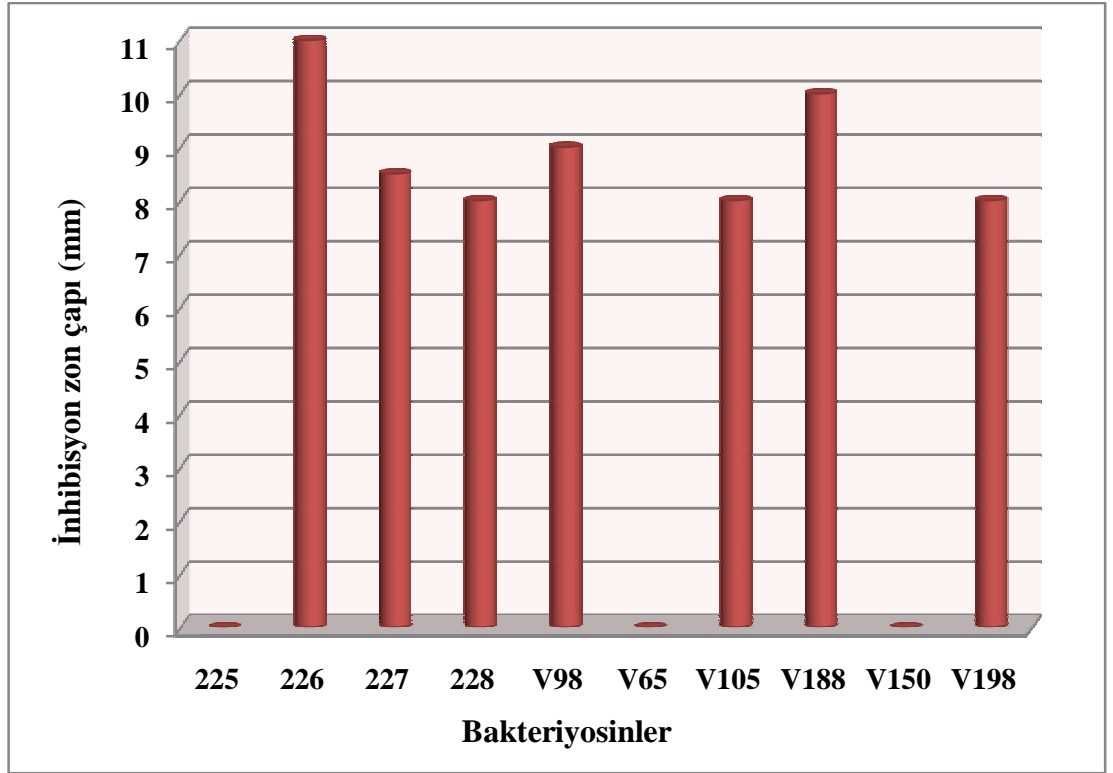
Bu çalışmada, hem gıda kaynaklı, hem de klinik kaynaklı enterokok suşlarından bakteriyosin üreten suşlar belirlenerek, bakteriyosinlerin farklı sıcaklık ve pH koşullarındaki antimikrobiyel etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, elde edilen sonuçlar, suşun elde edildiği kaynağa göre karşılaştırılmıştır.

4.1. Kısmi Olarak Saflaştırılmış Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etkisi

Çalışmamızda kullanılan gıda ve klinik kaynaklı enteroklardan elde edilen kısmi saflaştırılmış enterosinlerin büyük bir kısmı, indikatör mikroorganizma olarak kullanılan *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de kısmi saflaştırılmış enterosinlerin oluşturdukları inhibisyon zon çapları verilmiştir.



Şekil 4.1. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin *L. monocytogenes*'e karşı inhibisyon etkileri.



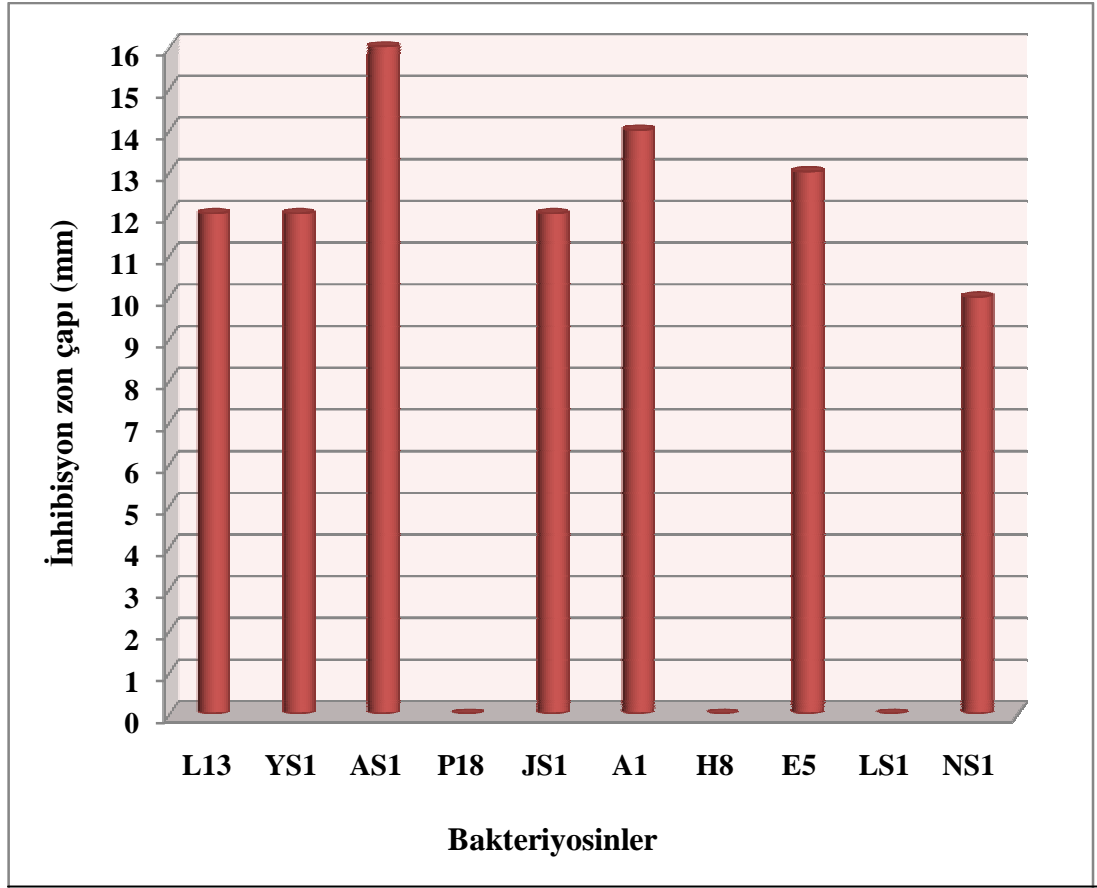
Şekil 4.2. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin *L. monocytogenes*'e karşı inhibisyon etkileri.

Çalışmamızdaki gıda ve klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin antimikrobiyel etkileri, gerek izole edildikleri kaynak ve gerekse de izole edildikleri bakteri suşunun türü bakımından, farklılık göstermemiştir. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'deki sonuçlar değerlendirildiğinde, gıda ve klinik kaynaklı bakteriyosinlerden L13, AS1, E5, NS1, 227, 228, V98, V105, V198'in inhibisyon zon çaplarının 8-9 mm arasında değiştiği, YS1, JS1, A1, 226 ve V188 izolatlarından elde edilen enterosinlerin 10-11 mm arasında olduğu belirlenmiştir. Gıda kaynaklı P18 (*E. faecium*), H8 (*E. faecium*), LS1 (*E. faecalis*) izolatlarından elde edilen enterosinler ile klinik kaynaklı 225 (*E. faecalis*), V65 (*E. faecium*), V150 (*E. faecium*) izolatlarından elde edilen enterosinler, *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etki göstermemiştir. Benzer çalışma, Savadogo ve ark (2004), tarafından süt ürünlerinden izole ettikleri bazı laktik asit bakterilerinden elde ettikleri kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerle yapılmış olup, sonuçta, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*'ye ait inhibisyon zonlarının, 8-12 mm arasında değiştiğini belirlemişlerdir.

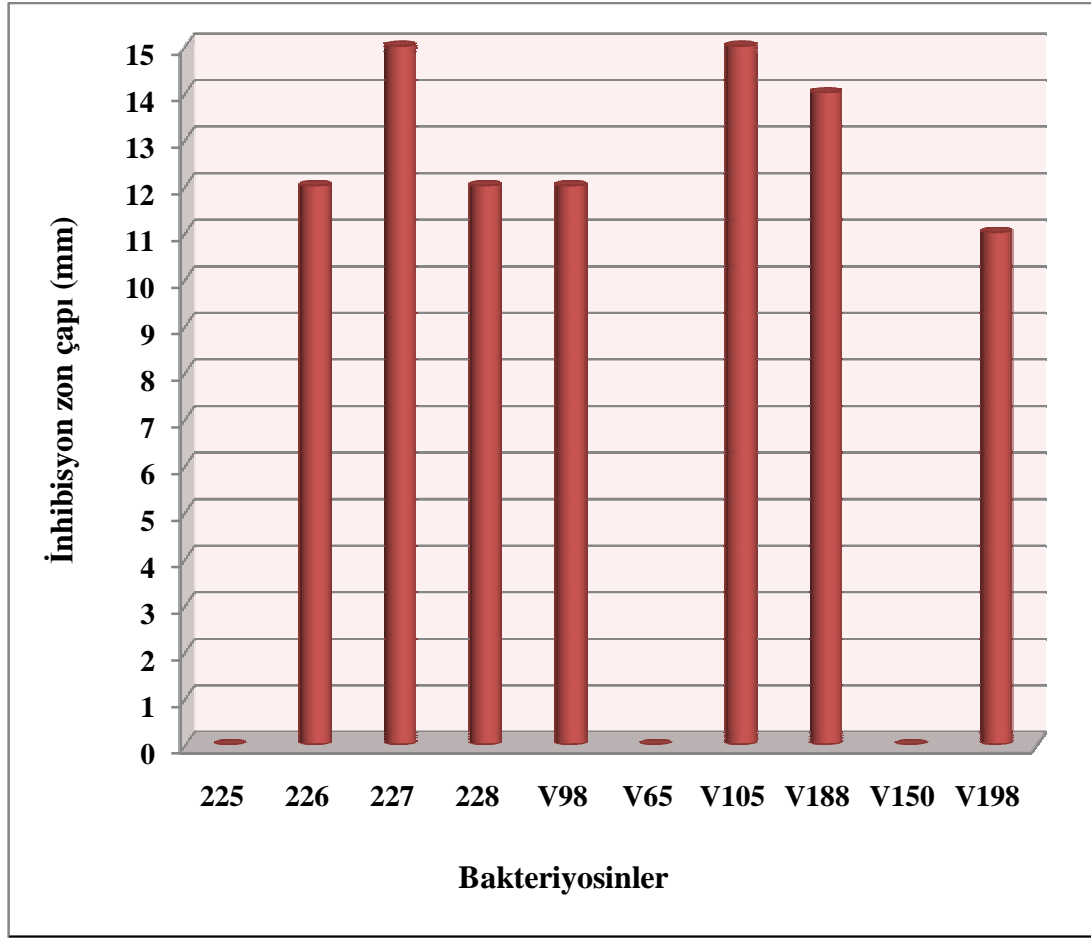
Çalışmamızda kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarından, *E. faecalis* suşu (8), *E. faecium* suşuna göre (6) sayıca daha fazla *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör aktivite gösterdiğini belirlenmiştir. Klibi ve ark (2008), yaptıkları bir araştırmada, bu çalışmada olduğu gibi, klinik kaynaklı *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının bakteriyosin ürettiğini ve bu suşlardan *E. faecalis* türünün *E. faecium*'a göre sayıca daha fazla *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

4.2. Kaba Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etkisi

Gıda ve klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kaba bakteriyosinlerin çoğunda, *Listeri monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etki görülmüştür. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de, kaba enterosinlerin indikatör mikroorganizmaya karşı inhibisyon etkileri gösterilmiştir. Hem gıda, hem de klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerden antimikrobiyel etki göstermeyenler (P18, H8, LS1, 225, V65, V150), kaba bakteriyosin halinde de indikatör mikroorganizma olan *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etki göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kaba bakteriyosinlerin *L. monocytogenes*'e karşı inhibisyon etkileri.



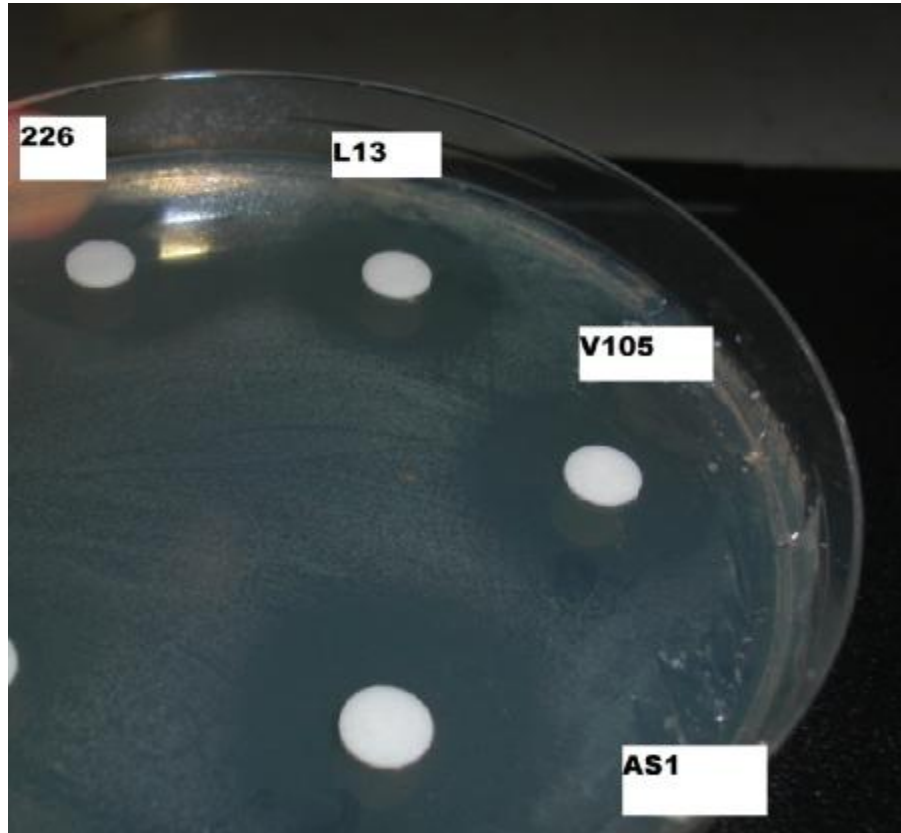
Şekil 4.4. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kaba bakteriyosinlerin *L. monocytogenes*'e karşı inhibisyon etkileri.

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilen kaba enterosinlerin, inhibisyon özellikleri değerlendirildiğinde, gıda kaynaklı enterosinlerin oluşturdukları zonlar, 10 ile 16 mm arasında değişirken, klinik kaynaklı enterosinlerin oluşturdukları inhibisyon zonları 11 ile 15 mm arasında saptanmıştır. Antimikrobiyel etki gösteren gıda ve klinik kaynaklı enterosinlerden, en iyi inhibisyon aktivitesini, gıda kaynaklı AS1 (*E. faecalis*) izolatından elde edilen bakteriyosin göstermiş olup, oluşturduğu inhibisyon zonu 16 mm'dir.

Bilgin (2008), yaptığı çalışmada, yöresel beyaz peynirden izole edilen *Enterococcus faecium*'un ürettiği enterosin HZ'nin, bazı laktik asit bakterileri ile *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus*'a karşı antimikrobiyel aktiviteye sahip

olduğunu ve bakteriyosinlerin oluşturdukları inhibisyon zonlarını, bu çalışmada olduğu gibi, 11-19 mm arasında belirlemiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, gıda ve klinik kaynaklı suşlardan elde edilen kaba bakteriyosinlerin inhibisyon etkilerinin, kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlere göre daha fazla inhibisyon etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, kısmi saflaştırılmış bakteriyosin ekstraktında amonyum sülfatla çöktürülmüş sadece protein yapılı antimikrobiyel aktiviteye sahip bileşikler bulunduğunu, kaba bakteriyosin ekstraktında ise, proteinleri çöktürme işlemi olmadığından bakteriyosinin yanı sıra, daha başka antimikrobiyel aktiviteye sahip bileşiklerin (organik asitler) bulunabileceği şeklinde izah edilebilir. Şekil 4.5’de AS1, V105, L13 ve 226 enterokok suşlarından elde edilen kaba bakteriyosinlerin indikatör mikroorganizmaya karşı oluşturdukları inhibisyon zonları görülmektedir.



Şekil 4.5. AS1, V105, L13 ve 226 enterokok suşlarından elde edilen kaba bakteriyosinlerin indikatör mikroorganizmaya karşı oluşturdukları inhibisyon zonları.

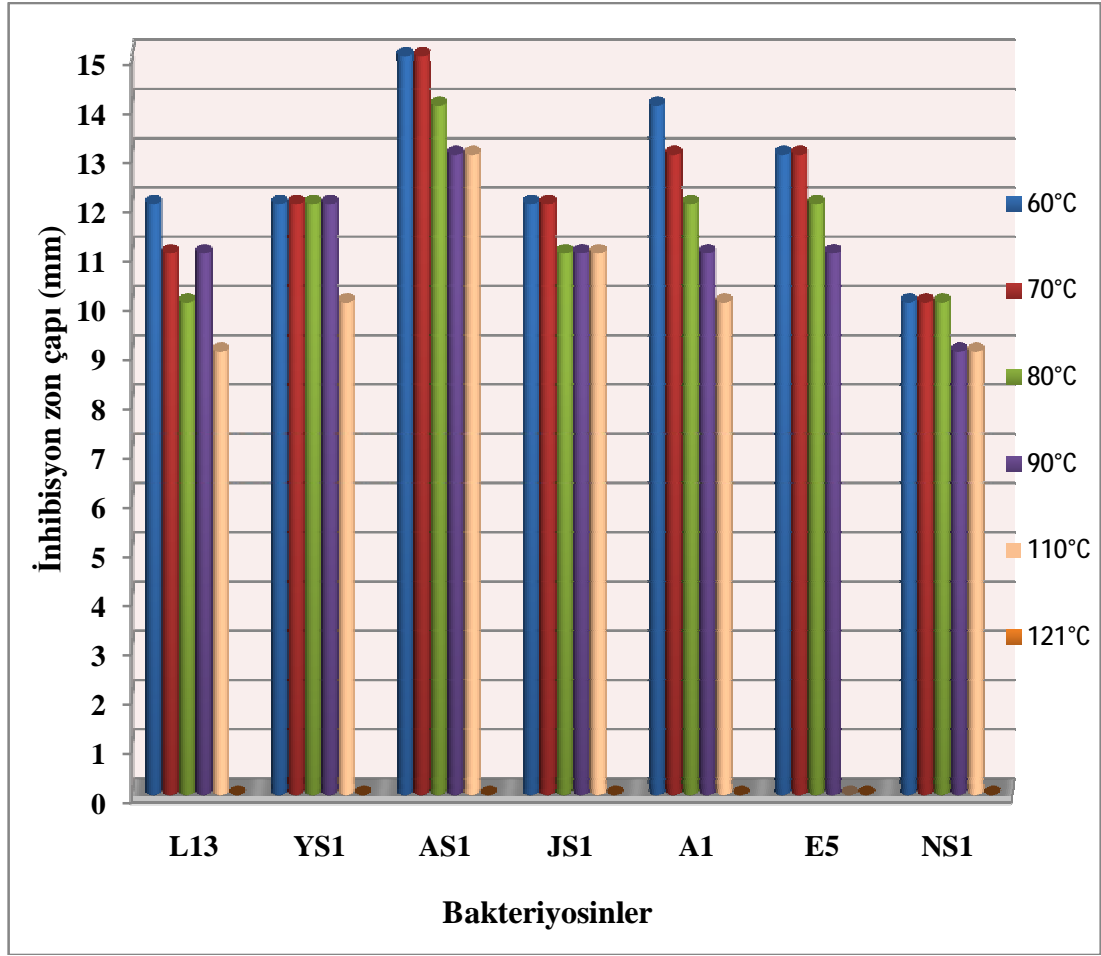
Uymaz (2009), Türkiye'nin farklı yörelerinden izole ettiği insan ve gıda kaynaklı 28 adet laktobasillerden elde edilen kaba bakteriyosinleri, birçok indikatör bakteriye karşı test etmiştir. İndikatör mikroorganizmalardan biri olan *Listeria monocytogenes*'e karşı oluşan inhibisyon zonları bu çalışmada olduğu gibi, 6-14 mm arasında belirlenmiştir.

4.3. Sıcaklığın Bakteriyosinin Antimikrobiyel Aktivitesi Üzerine Etkisi

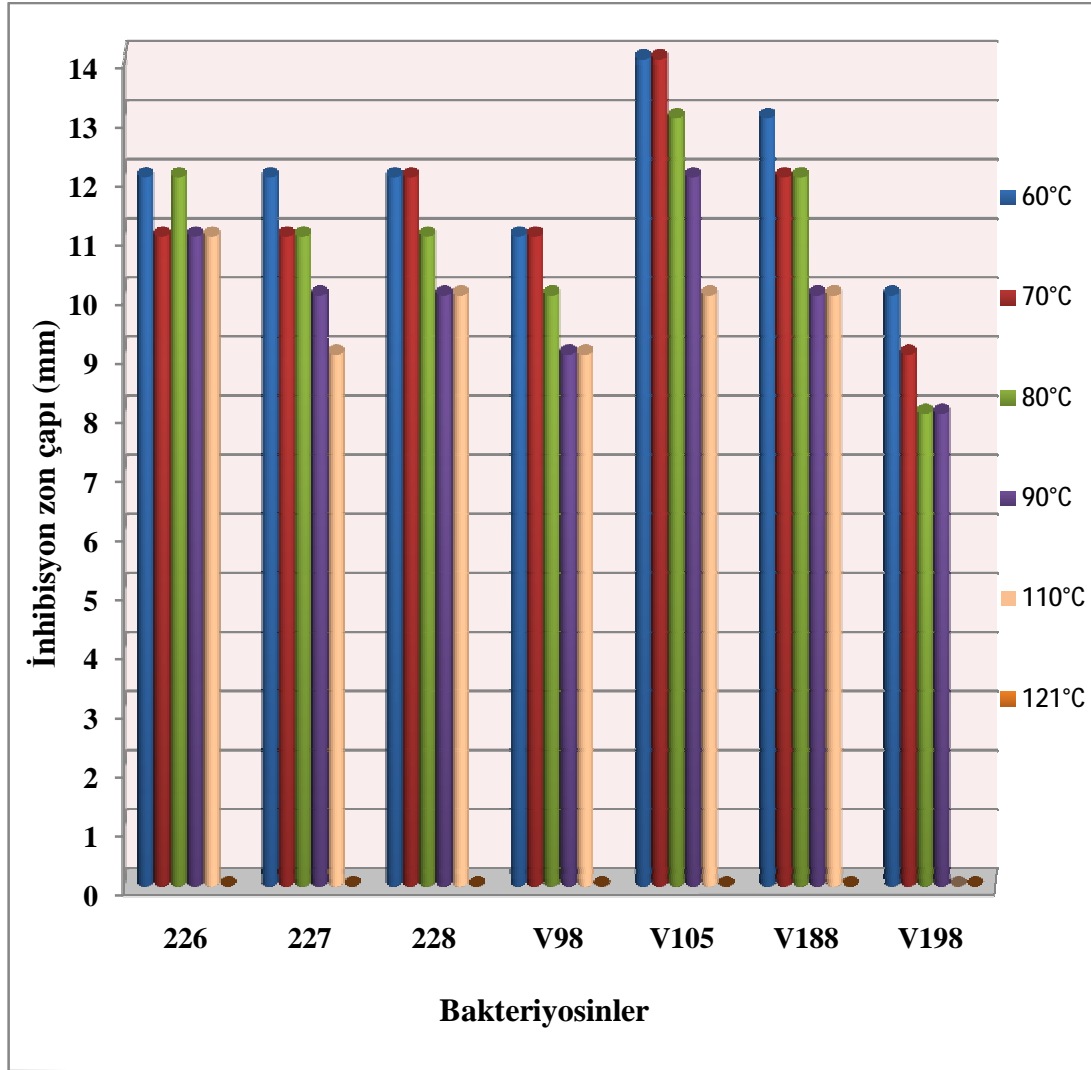
Gıda ve klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kaba ve kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerden, indikatör mikroorganizmaya karşı antimikrobiyel aktivite gösteren suşların (L13, YS1, AS1, JS1, A1, E5, NS1, 226, 227, 228, V98, V105, V188, V198), antimikrobiyel etkileri üzerine sıcaklığın etkisi araştırılmıştır.

Hem gıda, hem de klinik kaynaklı enterosinlerin çoğunun 60, 70, 80, 90 ve 110°C'de, 15 dakika ısıl işleme dayanıklı oldukları ve indikatör mikroorganizmaya karşı bu sıcaklıklarda da aktivite gösterdikleri, ancak, 121°C'de 15 dakika otoklav koşullarında ise, hem gıda hem de klinik kaynaklı bütün bakteriyosinlerin inhibitör aktivitelerini tamamen kaybettikleri belirlenmiştir.

Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de enterosinlerin farklı sıcaklıklara tabi tutulduktan sonraki, *Listeria monocytogenes*'e karşı, inhibisyon etkileri verilmiştir.



Şekil 4.6. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi.



Şekil 4.7. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi.

Doğan (2009), yaptığı benzer bir çalışmada *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen bakteriyosinin, 90°C de 5, 15, 30, 60 dakika ısıtılma sonucunda, bakteriyosinin antimikrobiyel aktivite kaybına uğramadığını belirlemiştir. Diğer yandan, çalışmamızın 121°C'deki uygulama sonucu elde ettiğimiz sonuçların aksine, söz konusu çalışmada bakteriyosinin 121°C'de 15 dakika ısıtılma uygulanması sonucunda, antimikrobiyel aktivite kaybına uğramadığını belirlenmiştir.

Gıda ve klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen enterosinlerin, inhibisyon aktivitesi üzerine, farklı sıcaklıkların etkisi incelendiğinde, bakteriyosinlerin tabii tutuldukları sıcaklık dereceleri yükseldikçe inhibisyon zon

çaplarında da azalma görülmüştür. Gıda kaynaklı E5 (*E. faecium*) ve klinik kaynaklı V198 (*E. faecium*) suşlarına ait enterosinler, 110°C'de 15 dakika ısıtılma işlemine dayanıklı olmadığı, diğer tüm enterosinlerin 110°C'de 15 dakika ısıtılma işlemine tabi tutulduktan sonra inhibisyon aktivitelerini korudukları belirlenmiştir.

Sabia ve ark (2004), *E. casseliflavus* ve *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosinler üzerine yaptıkları bir çalışmada, ısıtılma işlem uygulamaları sonucunda *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosinin ısıya duyarlı olduğu, *E. casseliflavus* tarafından üretilenin ise, 121°C'de 15 dakika otoklav işleminden sonra bile, antimikrobiyel aktivitesini koruduğu görülmüştür. Çalışmamızda ise, *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosinlerin 110°C'de 15 dakika ısıtılma işlemine tabi tutulduktan sonra bile inhibitör etkilerini kaybetmediklerini, ancak 121°C'de ise aktivitelerini tamamen kaybettikleri saptanmıştır.

Ghrai ve ark (2008), tarafından yapılan bir çalışmada enterosin MMT21'in 100°C'de 15 dakika ısıtılma işlemine tabi tutulduğunda *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. Çalışmamızda ise, gıda ve klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde ettiğimiz bakteriyosinlerin büyük çoğunluğu 110°C 15 dakika ısıtılma işlemi sonucu *Listeria monocytogenes*'e karşı inhibitör aktivitelerini kaybetmedikleri görülmüştür. Diğer yandan, Bilgin (2008), yaptığı benzer bir çalışmada, enterosin HZ'nin 90°C'de 30 dakikaya kadar uygulanan ısıtılma işlemleri sonucunda aktivitesini koruduğu, ancak 110 ve 121°C'de 15 dakika ısıtılma işlemine tabi tutulduğunda ise aktivitesinde sırasıyla %50 ve %100'lük bir azalmanın olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde, gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin, klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlere göre, farklı sıcaklık uygulamaları sonrası, inhibisyon etkileri daha fazla bulunmuştur. Gıda kaynaklı AS1 (*E. faecalis*) suşundan elde edilen bakteriyosin, farklı sıcaklık uygulamalarına tabi tutulan bütün bakteriyosinlere göre en fazla inhibisyon etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, en az inhibisyon etkiyi, klinik kaynaklı V198 (*E. faecium*) suşundan elde edilen bakteriyosin göstermiştir.

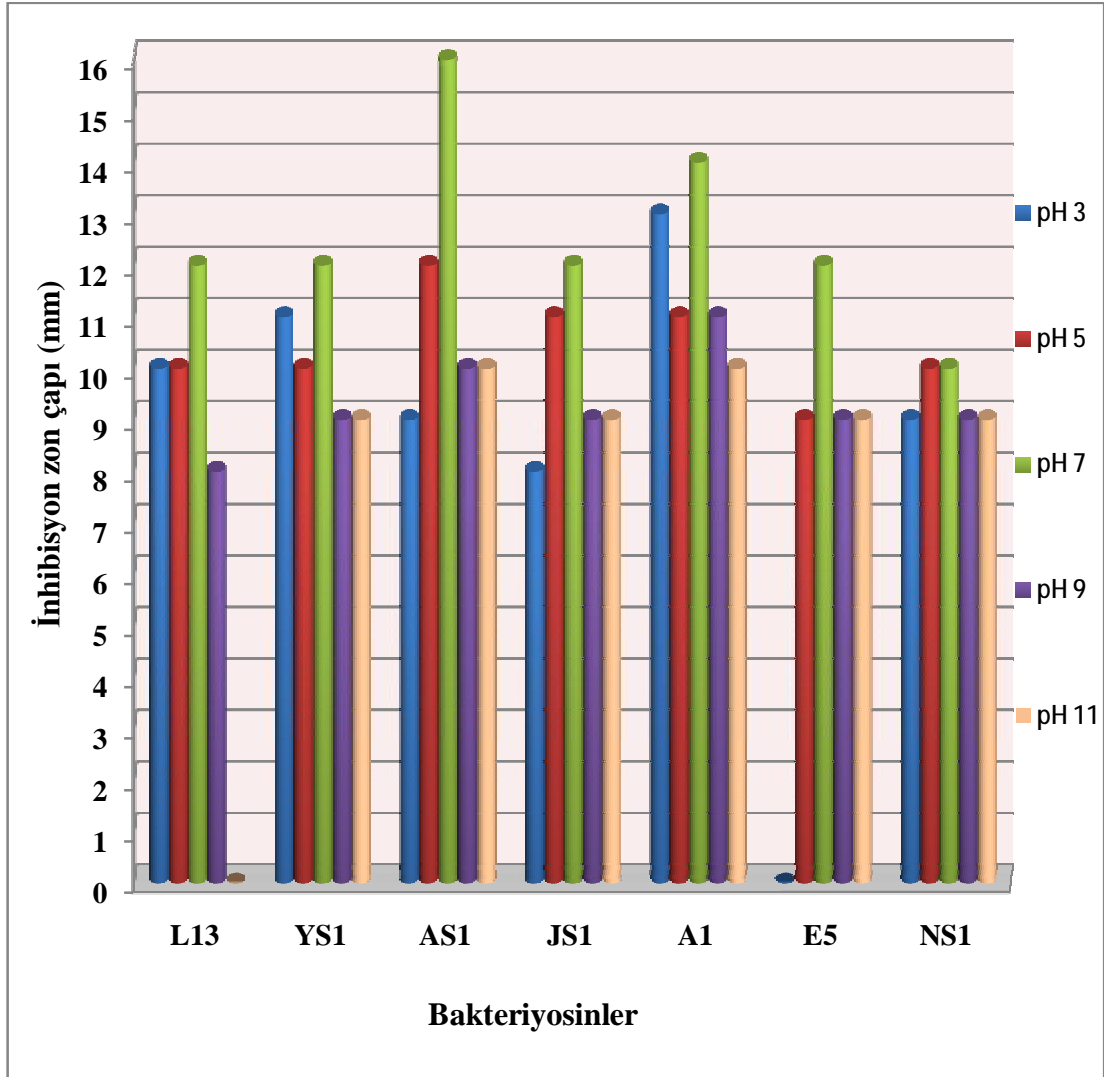
Uymaz (2009), insan kaynaklı *P. pentosaceus* BH105 suşu ile gıda kaynaklı *L. brevis* BG18 suşundan elde ettiği bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine, farklı sıcaklıkların etkilerini araştırmıştır. İnsan kaynaklı *P. pentosaceus* BH105 suşunun ürettiği bakteriyosin, değişik sürelerde ve 80, 90 ve 100°C'de yürütülen sıcaklık denemelerinden hiç etkilenmediği, sadece 121 °C'de 15 dakika sürdürülen uygulamada, %75 oranında aktivite kaybı meydana geldiği tespit edilmiştir. Gıda kaynaklı *L. brevis* BG18 suşunun ürettiği bakteriyosinde, 80, 90 ve 100°C'de yürütülen sıcaklık denemelerinden hiç etkilenmediği, 121°C'de 15 dakika sıcaklık uygulamasında ise, %50 aktivite kaybına uğradığı saptanmıştır. Bu çalışmada ise, söz konusu araştırmanın aksine, gıda ve klinik kaynaklı bütün bakteriyosinlerinin 121°C'de aktivitelerini tamamen kaybettiği, ancak, benzer bir şekilde, klinik kaynaklı bakteriyosinlerin ısı işlem uygulamalarından, gıda kaynaklı bakteriyosinlere göre daha fazla etkilendikleri belirlenmiştir. Benzer bir başka çalışmada ise, *L. lactis* subsp. *lactis* MA23 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin 100 °C'ye kadar 15 dakika ısı muamele sonucunda herhangi bir aktivite kaybına uğramadığını, 121°C 15 dakika ısı muamele sonucunda ise %75 oranında aktivite kaybı olduğunu saptanmıştır (Ghamat, 2010).

4.4. pH'nın Bakteriyosinin Antimikrobiyel Aktivitesi Üzerine Etkisi

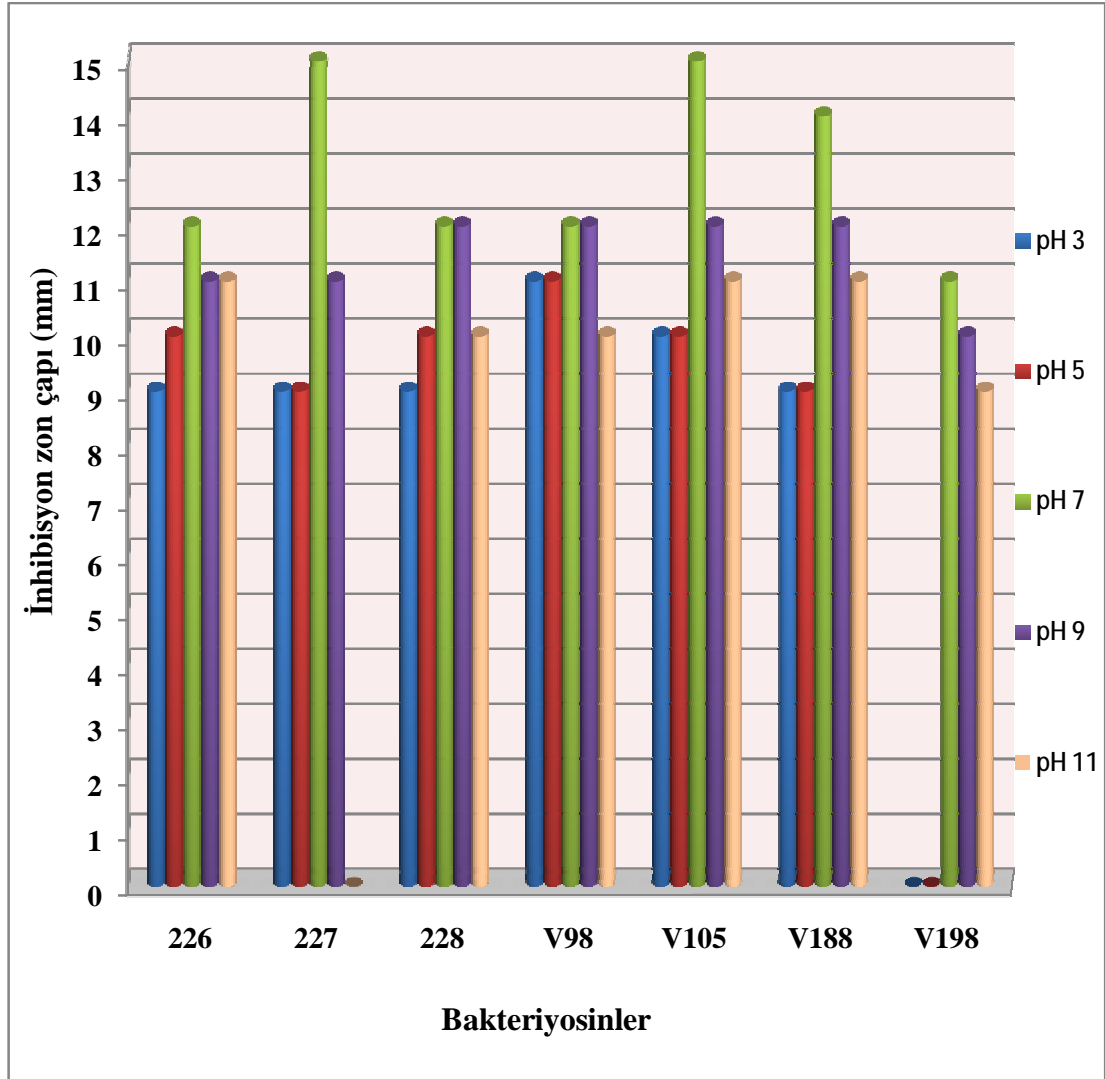
Bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine etkili en önemli faktörlerden bir diğeri de, pH'dır. Gıda ve klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen, kaba ve kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerden, indikatör mikroorganizmaya karşı aktivite gösterenlerin (L13, YS1, AS1, JS1, A1, E5, NS1, 226, 227, 228, V98, V105, V188, V198) antimikrobiyel etkileri üzerine farklı pH'ların etkisi araştırılmıştır.

Hem gıda, hem de klinik kaynaklı enterosinlerin tamamı, indikatör bakteriye karşı, maksimum aktiviteyi pH 7,0'de gösterirken, asidik ve bazik pH'larda, antimikrobiyel aktivitede düşüşler olduğu saptanmıştır. Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'de verilen sonuçlar incelendiğinde, gıda kaynaklı bakteriyosinlerin çoğunun, asidik pH'lardaki inhibisyon aktivitelerinin, bazik pH'lardaki aktivitelerine göre daha

yüksek olduğu belirlenmiştir. Klinik kaynaklı bakteriyosinlerde ise, bazik pH'larda, asidik pH'lara göre daha iyi inhibisyon aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı pH'ların etkisi.



Şekil 4.9. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı pH'ların etkisi.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, genel olarak hem gıda kaynaklı hemde klinik kaynaklı bakteriyosinlerin çoğu pH 3, 5, 7, 9 ve 11'de, *Listeria monocytogenes*'e karşı inhibitör aktivite gösterebilmektedir. Benzer sonuçlar, Ghrairi ve ark (2008) tarafından bulunmuş olup, Tunus "Rigouta" peynirinden izole edilen *E. faecium*'un MMT21 suşunun ürettiği enterosin MMT21 inhibitör etkisini, *Listeria monocytogenes*'e karşı pH 2-10 arasında kaybetmediğini belirlemişlerdir.

Klinik kaynaklı V198 (*E. faecium*) bakteriyosini, asidik ortamda, yani pH 3,0 ve 5,0'de antimikrobiyel aktivitesini tamamen kaybetmiş olup, pH 7,0, 9,0 ve 11,0 değerlerinde inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Gıda kaynaklı E5 (*E. faecium*)

bakteriyosini ise, pH 3,0'de antimikrobiyel aktivite gösteremezken, pH 5,0'de inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Doğan (2009), yaptığı çalışmada, *Pediococcus acidilactici* PBF tarafından üretilen antimikrobiyel maddenin etkisinin, pH 3 ile 7 arasında en etkili olduğu, pH 3 altında ve 7 üzerinde kısmen kaybolduğu, pH 9 ve 10 üzerinde ise tamamen kaybolduğu bulmuşlardır. Bu çalışmada da, gıda kaynaklı L13 (*E. faecium*) bakteriyosini ile klinik kaynaklı 227 (*E. faecalis*) bakteriyosini, pH 11,0 antimikrobiyel aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Şekil 4.10'da klinik kaynaklı V105 suşundan elde edilen bakteriyosinin farklı pH'larda *Listeria monocytogenes*'e karşı oluşturduğu inhibitör etkisi görülmektedir.



Şekil 4.10. V105 suşundan elde edilen bakteriyosinin aktivitesi üzerine farklı pH'ların *L. monocytogenes*'e karşı oluşturduğu inhibisyon zonları.

Farklı pH'lardaki bakteriyosinlerin inhibisyon aktiviteleri incelendiğinde, gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinler ile klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin, aynı oranlarda etkilendikleri görülmektedir. Ayrıca, hem gıda, hem de klinik kaynaklı bakteriyosinlerin

tamamının en iyi inhibisyon etkiyi nötr pH'da gösterdikleri saptanmış olup, asidik ve bazik ortamların inhibisyon aktivitesini azaltıcı yönde etki yaptığı bulunmuştur.

Bilgin (2008), yöresel beyaz peynirden izole edilen *Enterococcus faecium*'un ürettiği enterosin HZ'nin antimikrobiyel aktivitesini pH 2-9 arasındaki değerlerde koruduğunu, pH 10'da aktivitesinin yarısını, pH 11'de aktivitenin büyük bir kısmının kaybolduğunu, pH 12'de ise, inhibisyon aktivitesinin tamamının kaybolduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda ise, gıda ve klinik kaynaklı *E. faecium* suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin çoğunun, pH 3, 5, 7, 9 ve 11'de inhibitör aktivitesinin büyük bir kısmını koruduğu belirlenmiştir.

Demirpençe (2008), yaptığı benzer bir çalışmada, *Enterococcus faecalis* KP tarafından üretilen enterosin KP'nin *Lb. plantarum* ve *L. monocygenes*'e karşı antimikrobiyel aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 ve 7,5 pH değerleri kullanılmıştır. Bu pH aralıklarında enterosinin her iki bakteriye karşı antimikrobiyel aktivitesinin değişmediği, yani bakteriyosinin hem asidik hem de nötral pH değerlerinde aynı aktiviteyi gösterdiğini belirtmiştir. Çalışmamızda ise gıda ve klinik kaynaklı *E. faecalis* suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin çoğunun hem asidik hem de bazik ortamlarda *L. monocygenes*'e karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiği görülmüştür. Uymaz (2009), insan kaynaklı *P. pentosaceus* BH105 suşunun ürettiği bakteriyosin, pH 2,0-7,0 arasında stabilitesini koruduğu, pH 8,0-10,0 arasında %50 ve pH 11,0'de %87,5 oranında aktivite kaybı gösterdiği belirlenmiştir. Gıda kaynaklı *L. brevis* BG18 suşunun ürettiği bakteriyosinde ise, pH 2,0-9,0 arasında stabilitesini koruduğu, pH 10,0 ve 11,0'de ise %50 oranında aktivite kaybına uğradığı tespit etmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, 10 adet gıda kaynaklı ve 10 adet klinik kaynaklı enterokok suşlarının bakteriyosin üretebilme özellikleri, *Listeria monocytogenes*'e karşı oluşturdukları inhibitör etkileri ile belirlenmiş olup, üretilen bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine farklı sıcaklık ve pH'ların etkisi araştırılmıştır. 20 adet enterokok suşundan, 14 tanesinin *Listeria monocytogenes*'i belirli düzeylerde inhibe ettiği saptanmıştır.

Çalışmamızdaki gıda ve klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin antimikrobiyel etkinlikleri, gerek izole edildikleri kaynak ve gerekse de izole edildikleri bakteri suşunun türü bakımından farklılık göstermemiştir. Gıda ve klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin, antimikrobiyel etkileri karşılaştırıldığında, en yüksek inhibitör etkiyi, klinik kaynaklı 226 (*E. faecalis*) suşunun ürettiği bakteriyosinin gösterdiği saptanmıştır. Kaba bakteriyosinlerde ise, en yüksek antimikrobiyel etkiyi, gıda kaynaklı AS1 (*E. faecalis*) suşunun ürettiği bakteriyosinin gösterdiği belirlenmiştir. Gıda kaynaklı enterokok suşları olan, LS1 (*E. faecalis*), H8 (*E. faecium*) ve P18 (*E. faecium*) ile klinik kaynaklı 225 (*E. faecalis*), V65 (*E. faecium*) ve V150 (*E. faecium*) enterokok suşları, *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etki göstermemiştir.

Gıda ve klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin aktiviteleri üzerine farklı sıcaklık ve pH'ların etkileri belirlenmiştir. Farklı sıcaklık uygulamalarına tabi tutulan ve indikatör mikroorganizmaya karşı aktivite gösteren 14 adet (L13, YS1, AS1, JS1, A1, E5, NS1, 226, 227, 228, V98, V105, V188, V198) suştan elde edilen bakteriyosinlerin tamamı, 60, 70, 80, ve 90°C'de 15 dakika, sıcaklığa maruz bırakıldıktan sonra *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. E5 ve V198 suşlarına ait bakteriyosinler, 110°C'de 15 dakikaya maruz bırakıldıklarında aktivitelerini tamamen kaybetmelerine rağmen, diğer 12 adet enterokok suşuna (L13, YS1, AS1, JS1, A1, NS1, 226, 227, 228, V98, V105, V188) ait bakteriyosinler, 110°C'de 15 dakikada muameleden sonra inhibisyon aktivitesi göstermişlerdir. Ancak, 121°C'de 15 dakika otoklav koşullarında ise, hem gıda hem

de klinik kaynaklı bütün bakteriyosinlerin inhibitör aktivitelerini tamamen kaybettikleri belirlenmiştir.

Farklı pH uygulamalarında ise, gıda ve klinik kaynaklı bakteriyosinlerin çoğu, pH 3, 5, 7, 9 ve 11'de antimikrobiyel etki göstermiştir. pH 11'de L13 ve 227 enterokok suşlarına ait bakteriyosinler, tamamen inhibisyon aktivitelerini kaybetmişlerdir. E5 suşuna ait bakteriyosin pH 3'de aktivitesini kaybederken, V198 suşuna ait bakteriyosin pH 3 ve 5'de antimikrobiyel etki gösterememiştir.

Çalışmamızın sonuçlarından da anlaşıldığı üzere, kullandığımız 20 adet enterokok suşlarından 14 tanesi, *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etki göstermiş olup, enterokok suşlarının çoğunun ürettikleri bakteriyosinlerin yüksek sıcaklıklarda ve geniş pH aralıklarında aktivitelerini kaybetmedikleri sonucuna varılmıştır.

Daha önce de değindiğimiz gibi enterokoklar, bakteriyosin üretimleri ve bazı patojen bakteriler üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olmaları nedeniyle, yararlı mikroorganizmalar arasında sayılmaktadır. Ancak, burada ihmal edilmemesi gereken durum, özellikle de klinik kaynaklarda sıkça karşımıza çıkan virülans genlerinin, gıda kaynaklı olanlarda da taşıyor olabilme ihtimalidir. Nitekim, şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, hem klinik hem de gıda kaynaklı enterokokların bazılarında, bu virülans genlerin bulunduğu bildirilmiştir.

Yukarıda da bahsettiğimiz bilgiler ışığında, gerek gıda, gerekse de klinik kaynaklardan izole edilen enterosinlerin tamamı için sadece antimikrobiyel özellik göstermelerinden dolayı "gıdalarda kullanımı uygundur" demek doğru değildir. Kullanılacak enterosinlerin izole edildiği enterokokların, virülans geni taşımaları durumunda, gıdaya zararlı bir aktarım yapılmış olmaktadır. Bu nedenle, enterosinlerin endüstriyel alanda potansiyellerini belirlemek için, gerek gıda, gerekse klinik kaynaklı enterosinler, hem antimikrobiyel etkileri bakımından, hem de gıda güvenliği açısından ayrıntılı olarak incelenmeli ve aralarındaki ilişkiler test edilmelidir.

KAYNAKLAR

- ADETUNJI, V. O., and ADEGOKE, G. O., 2007. Bacteriocin and Cellulose Production by Lactic Acid Bacteria Isolated From West African Soft Cheese. African Journal of Biotechnology Vol., 6 (22), pp. 2616-2619, 19 November.
- AKKOÇ, N., ŞANLIBABA, P., ve AKÇELİK, M., 2009. Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucular. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 25 (1-2) 59 – 70.
- ALTUNTAŞ, E.G., AYHAN, K., OKUCU, G., ERKANLI, K., BALCI, M.H., ve SONAKIN, S., 2010. Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Aktiviteleri. GIDA, 35 (3) 197-203.
- ANANOÛ, S., VALDIVIA, E., MARTINEZ-BUENO, M., and GALVEZ, A., 2004. Effect of Combined Physico-Chemical Preservatives on Enterocin AS-48 Activity Against the Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 Strain. Journal Applied Microbiology, 97, 48-56.
- ANANOÛ, S., GALVE, A., MARTINEZ-BUENO, M., MAQUEDA, M., and VALDIVIA, E., 2005a. Synergistic Effect of Enterocin AS-48 in Combination with Outer Membrane Permeabilizing Treatments Against *Escherichia coli* O157:H7. Journal Applied Microbiology, 99, 1364–1372.
- ANANOÛ, S., MAQUEDA, M., MARTINEZ-BUENO, M., GÁLVEZ, A., and VALDIVIA, E., 2005b. Control of *Staphylococcus aureus* In Sausages By Enterocin AS- 48. Meat Sci., 71: 549–556.
- ANANOÛ, S., GARRIGA, M., HUGAS, M., MAQUEDA, M., MARTINEZ-BUENO, M., GALVEZ, A., and VALDIVIA, E. 2005c. Control of *Listeria monocytogenes* In Model Sausages By Enterocin AS-48. Inter. J. Food Microbiology, 103:179–190.
- ANANOÛ, S., MAQUEDA, M., MARTINEZ-BUENO, M., GALVEZ A., and VALDIVIA, E., 2007. Bactericidal Synergism Through Enterocin AS-48 and Chemical Preservatives Against *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology, 45, 19-23.

- ASUTAY, D., 2007. Yöresel Bir Gıdadan İzole Edilen Bakteriyosin Üreten Bakterinin Teşhisi ve Bakteriyosinin Karakterizasyonu. Gazi Osman Paşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 6-18 s.
- AYGÜN, H., MEMİKOĞLU, O.K., TEKELİ, A., AZAP, A., ve YÖRÜK, F., 2008. Hastanede Yatan Riskli Hasta Gruplarında Vankomisine Dirençli Enterokok Kolonizasyonunun Sürveyansı. Türk Anest Rean Der Dergisi, 36: 168-173.
- AYMERICH, T., ARTIGAS, M.G., GARRIGA, M., MONFORT, J.M., and HUGAS, M., 2000. Effect of Sausage Ingredients And Additives On The Production Of Enterocins A and B By *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization Of In Vitro Production And Anti- Listerial Effect In Dry Fermented Sausages. J. Of Appl. Microbiol., 88: 686–694.
- BASANTA, A., SANCHEZ, J., GOMEZ-SALA, B., HERRANZ,C., HERNANDEZ, and P.E., CINTAS, L.M., 2008. Antimicrobial Activity of *Enterococcus faecium* L50, A Strain Producing Enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, Against Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria in Broth, Wort (hopped and unhopped), and Alcoholic and Non-alcoholic Lager Beers. Int. J. Food Microbiol., 125, 293–307.
- BAUER, R., and DİCKS, L.M.T., 2005. Mode of Action of Lipid II-Targeting Lantibiotics. Int. J. Food Microbiol., 101, 201– 216.
- BEN BELGACEM, Z., ABRIOUEL, H., BEN OMAR, N., LUCAS, R., MARTINEZ-CANAMERO, M., GALVEZ, A., and MANAI, M., 2010. Antimicrobial Activity, Safety Aspects, and Some Technological Properties of Bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from Artisanal Tunisian Fermented Meat. Food Control, 21, 462–470.
- BENKERROUM, N., GHOUATI, Y., GHALFI, H., ELMEJDOUB, T., ROBLAIN, D., JACOQUES, P., and THONART, P., 2002. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in The Model Cultured Milk (Iben) by in Situ Bacteriocin Production from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. Int. J. Dairy Techonol., 55 (3) 145-151.

- BHATTI, M., VEERAMACHANENI, A., and SHELEF, N.A., 2004. Factors Affecting The Antilisterial Effects of Nisin in Milk. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 215-219.
- BİLGİN, H., 2008. Fermente Süt Ürünüden İzole Edilen Bakteriyosinogenik Bir Bakterinin Antimikrobiyal Aktivitesi. Gazi Osman Paşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 5-24 s.
- BIROLLO, G.A., REINHEIMER, J.A., and VINDEROLA, C.G., 2001. Enterococci vs Non-Lactic Acid Microflora as Hygiene Indicators for Sweetened Yoghurt. *Food Microbiology*, 18, 597-604.
- BUDDE, B.B., HORNBAEK, T., JACOBSEN, T., BARKHOLT, V., and KOCH, A.G., 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 Has The Potential for Use as a Protective Culture for Vacuum-packed Meats: Culture Isolation, Bacteriocin Identification and Meat Application Experiments. *Int. J. Food Microbiol.*, 83 (2): 171–84.
- CALLEWAERT, R., HUGAS, M., and VUYST, L.D., 2000. Competitiveness and Bacteriocin Production of Enterococci in The Production of Spanish-Style Dry Fermented Sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 57 (1-2), 33-42.
- CAMPOS, C.A., RODRIGUEZ, O., MATA, P.C., PRADO, M., and VELAZQUEZ, J.B., 2006. Preliminary Characterization of Bacteriocins From *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* Strains Isolated From Turbot (Psetta Maxima). *Food Research Intern.*, 39: 356–364.
- CEBRIAN, R., BANOS, A., VALDIVIA, E., PEREZ-PULIDO, R., MARTINEZ-BUENO, M., and MAQUEDA, M., 2012. Characterization of Functional Safety and Probiotic Properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a New AS-48-Producer Strain. *Food Microbiology*, 30, 59-67.
- CHEN, H., and HOOVER, D.G., 2003. Bacteriosins and Their Food Applications. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 2: 82-100.

- CHEIGH, C.I., CHOI, H.J., PARK, H., KIM, S.B., KOOK, M.C., KIM, T.S., HWANG, J.K., and 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. Of Biotech.*, 95: 225–235.
- CINTAS, L. M., CASAUS, P., FERNANDEZ, M. F., and HERNANDEZ, P. E., 1998. Comparative Antimicrobial Activity of Enterocin L50, Pediocin PA-1, Nisin A And Lactocin S Against Spoilage And Foodborne Pathogenic Bacteria. *Food Microbiol.*, 15: 289-298.
- CINTAS, L.M., CASAUS, M.P., HERRANZ, C., NES, I.F., and HERNANDEZ, P.E., 2001. Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International* 7 (4): 281–305.
- CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F., and CHIKINDAS, M.L., 2001. Bacteriocins: Safe, Naturel Antimicrobials for Food Preservation. *Int. J.Food Microbiol.*, 71, 1–20.
- COTTER, P.D., HILL, C., and ROSS, R.P., 2005. Bacterial Lantibiotics: Strategies to Improve Theurapotic Potential. *Curr. Prot. Pept. Sci.*, 6 (1): 61-75.
- CRANDALL, A.D., and MOONTVILLE, T.J., 1998. Nisin Resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a Complex Phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (1): 231– 237.
- DAVIES, E.A., BEVIS, H.E., and DELVES-BROUGHTON, J., 1997. The Use of The Bacteriocin Nisin as a Preservative in Ricotta Type Cheeses to Control the Food-borne Pathogens *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Micobiol.*, 24, 343–346.
- DE KWAADSTENIET, M., TODOROV, S.D., KNOETZE, H., and 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 MARTINIS, E.C.P., ALVES, V.F., and FRANCO, B.D.G.M., 2002. Fundamentals and Perspectives for The Use of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria In Meat Products. *Food Reviews International*, 18(2-3): 191-208.

- DEMİRPEŇE, Y., 2008. Enterosin KP'nin Aktivitesi ve İnhibitör Spektrumu Üzerine Ekolojik ve Sub-Letal Faktörlerin Etkisi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 23-52 s.
- DEVLIEGHERE, F., VERMEIREN, L., and DEBEVERE, J., 2004. New Preservation Technologies: Possibilities And Limitations. Inter. Dairy J., 14: 273-285.
- DOĞAN, P., 2009. *Pediococcus acidilactici* PBF Suşunda Bakteriyosin Üretiminden Sorumlu Genin Aktarımı. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 64-79 s.
- DROSINOS, E.H., MATARAGAS, M., and METAXOPOULOS, J., 2006. Modeling of Growth and Bacteriocin Production By *Leuconostoc mesenteroides* E131. Meat Science Article In Pres., Vol 74, 690-696.
- ERDEN, C., 2012. Türkiye'de Gıda Güvenliğinde Karşılaşılan Sorunlar ve Gıda Güvenliğinin Benimsenmesinde Eğitim Yöntemlerinin Uygulanabilirliği. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, 1-81 s.
- ERGİNKAYA, Z., YURDAKUL, N.E., ve KARAKAŞ, A., 2007. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*'in Starter ve Probiyotik Kültür Özellikleri. Gıda, 32 (3) : 137-142.
- EVİRGEN, Ö., 2005. *Listeria monocytogenes* İnfeksiyonu; Kliniği, Tanı ve Tedavi Özellikleri. Van Tıp Dergisi, 12 (1):32-35.
- FISHER, K., and PHILLIPS, C., 2009. The Ecology, Epidemiology and Virulence of *Enterococcus*. Microbiology, 155 (6):1749-1757.
- FRANZ, C., HOLZAPFEL, W.H., and STILES, M.E., 1999. Enterococci At The Crossroads of Food Safety. Int. J. of Food Microbiol., 47: 1-24.
- FRANZ, C., STILES, M.E., SCHLEIFER, K.H., and HOLZAPFEL, W. H., 2003. Enterococci In Foods a Conundrum for Food Safety. Int. J. Food Microbiol., 88: 105122.

- FOULQUIE, M.R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., and DE VUYST, L., 2006. The Role And Application of Enterococci In Food And Health. *Inf. J. Food Microbiol.*, 106: 1-24.
- GALVEZ, A., ABRIOUEL, H., LOPEZ, R.L., and OMAR, N.B., 2007. Bacteriocin Based Strategies for Food Biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.
- GALVEZ, A., LUCAS, L. R., and ABRIOUEL, H., 2008. Application of Bacteriocins In the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Critical Rev. in Biotechnology*, 28: 125-152.
- GARCIA, M.T., BEN OMAR, N., LUCAS, R., PEREZ-PULIDO, R., CASTRO, A., GRANDE, M.J., MARTINEZ-CANAMERO, M., and GALVEZ, A., 2003. Antimicrobial Activity of Enterocin EJ97 on *Bacillus coagulans* CECT 12. *Food Microbiology*, 20, 533–536.
- GARNEAU, S., MARTIN, N. I., and VEDERAS, J.C. 2002. Two-Peptide Bacteriocins Produced By Lactic Acid Bacteria. *Biochimie.*, 84: 577–592.
- GHAMAT, A., 2010. Bozadan İzole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA23 Suşunun Ürettiği Bakteriyosinin Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 21-54 s.
- GHRAIRI, T., FRERE, J., BERJEAUD, J.M., and MANAI, M., 2005. Lactococcin MMT24, a Novel Two-peptide Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* Isolated from Rigouta Cheese. *Inter. J. Food Microbiol.*, 105:389-398.
- GHRAIRI, T., FREE, J., BERJEAUD, J.M., and MANAI, M., 2008. Purification and Characterisation of Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian Rigouta Cheese. *Food Control*, 19, 162-169.
- GIRAFFA, G., PICCHIONI, N., NEVIANI, E., and CARMINATI, D., 1995. Production and Stability of An *Enterococcus faecium* Bacteriocin During Taleggio Cheesemaking And Ripening. *Food Microbiology*, 12: 301–307.
- GIRAFFA, G., 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26. 163-171.
- GIRAFFA, G., 2003. Functionality of Enterococci in Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2-3):215-222.

- GRANDE, M.A.J., LUCAS, R., ABRIOUEL, H., OMAR, N.B., MAQUEDA, M., MARTINEZ BUENO, M., MARTINEZ-CANAMERO, M., VALDIVIA, E., and GALVEZ, A., 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* In Fruit Juices By Enterocin AS-48, Inter. J. of Food Microbiol., 104 289– 297.
- HAMPIKYAN, H., 2006. Fermente Sucuklarda Nisin Kullanımının *Listeria monocytogenes* Üzerine Etkileri. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilimdalı Doktora Tezi, 8-24 s.
- HAMPIKYAN, H., and UĞUR, M., 2007. The Effect of Nisin on *Listeria monocytogenes* in Turkish Fermented Sausages (Sucuks)., Meat Science, 76, 327-332 s.
- HOWARD, B.J., KEISER, J.F., SMITH, T.F., WEISSFELD, A.S., and TILTON. R.C. 1994. Clinical And Pathogenic Microbiology 2nd Edition A.C.V. Mosby. Imprint of Mosby-Year Book Inc. St. Louis.
- HUGAS, M., GARRIA, M., and AYMERICH, M.T., 2003. Functionality of Enterococci in Meat Products. International Journal of Food Microbiology., 88(2-3):223-233.
- İŞLEROĞLU, H., YILDIRIM, Z., DEMİRPEACE, Y., ve YILDIRIM, M. 2008. Enterokoklar: Biyokimyasal, Fizyolojik Ve Fonksiyonel Özellikleri İle Patojenitesi. Akademik Gıda Bilini ve Teknolojisi Dergisi, 6(3), 16 – 26.
- JACK, R.W., TAGG, J.R., and RAY, B. 1995. Bacteriocins of Gram positive Bacteria. Microbiol. Rev., 171-200.
- KLAENHAMMER, T.R., 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12, 39–86.
- KLEIN, G., 2003. Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of Enterococci From Food And The Gastrointestinal Tract. Int.J. Food Microbiol., 88: 123-131.
- KLİBİ, N., JOUİNİ, A., ROJO-BEZARES, B., MASMOUDİ, A., RUIZ-LARREA, F., BOUDABOUS, A., and TORRES, C., 2008. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacteriocins in Clinical Enterococcal Isolates of Tunisia. World J Microbiol Biotechnol., 24:653–657.

- KOÇAN, D., ve HALKMAN, A.K., 2006. *Listeria monocytogenes* ve Listeriozis. Gıda Dergisi, 31 (3) : 133-140.
- KORAL, G., 2011. Bozadan İzole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GYL32 Suşu Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 29-63 s.
- KRUSZEWSKA, D., SAHL, H.G., BIERBAUM, G., PAG, U., HYNES, S.O., and LJUNGH, A.S., 2004. Mersacidin Eradicates Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Mouse Rhinitis Model. J. Antimicrob. Chemother., 54 (3): 648–653.
- KUM, E., YILDIRIM, Y., ve ERTAŞ, N., 2011. Kayseri’de Satışa Sunulan Peynir Örneklerinde *Listeria monocytogenes* Varlığının Klasik Kültür Yöntemi ile Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi, 8(2) 105-109.
- KWON, D. Y., KIM, W.J., and ELEGADO, F.B., 1997. Rapid Purification Partial Characterization and Antimicrobial Spectrum of the Bacteriocin Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. International J. Food Microbiol., 37:1-11.
- KUHN, I., IVERSEN, A., BURMAN, L., G.; OLSSON-LIJEQUIST, B.; FRANKLIN, A.; FINN, M.; AARESTRUP, F.; SEFRTH, A., M.; BLANCH, A., R.; VILANOVA, X.; TAYLOR, H.; CAPLIN, J.; MORENO, M., A.; DOMÍNGUEZ, L.; HERRERO, H., and MOLLBY, R., 2003. Comparison of Enterococcal Populations in Animals, Humans and The Environment-A European Study. International Journal of Food Microbiology, 88, 2-3, 133-145.
- KURT, Ş., ve ZORBA, Ö., 2005. Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. YYÜ Vet. Fak. Dergisi, 2005, 16 (1):77-83.
- LAUKOVA, A., CZIKKOVA, S., DOBRANSKY, T., and BURDOVA, O. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by Enterocin CCM4231 In Milk Products. Food Microbiol., 16: 93-99.

- LEE, N.K., and 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., and 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., MORENO, M.R.F., and 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., and 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., DE VUYST, D.L., SKAUGEN, M., and NES, I.F., 2003. Partial Characterization of Bacteriocins Produced by Environmental Strain *Enterococcus faecium* EK13. *J. Appl. Microbiol.*, 94(3):523-30.
- MORENO, I., LERAYER, A.L.S., BALDINI, V.L.S., LEITAO, and M.F.F., 2000. Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian J. Microbiol.*, 31, 183-191.
- MORENO, F., CALLEWAERT, R., DEVREESE, B., BEEUMEN, J.V, and VUYST, D.L., 2003. Isolation and Biochemical Characterisation of Enterocins Produced By Enterococci From Different Sources. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 214– 229.
- MORENO, M.R.F., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., and VUYST, D.L., 2006. The Role and Application of Enterococci In Food and Health. *Inter. J. Food Microbiol.*, 106: 1–24.
- NAGAO, J., ASADUZZMAN, S.M., ASO, Y., OKUDA, K., NAKAYAMA, J., and SONOMOTO, K., 2006. Lantibiotics: Insight and Foresight for New Paradigm. *J. Biosci. Bioeng.*, 102 (3): 139–149.
- NAMDARI, H., 1998. Application of PCR for the Characterisation of Enterococci. *Clinical Microbiology Newsletter*, Vol. 20, No.11, 91-93.

- NEMADE, S.P., and MUSADDIQ, M., 2012. Preliminary Detection of Bacteriocin-Like Inhibitory Substances Produced by *Enterococcus* species Isolated From Different Sources. *Bioscience Discovery*, June 3(2): 149-154.
- NES, I. F., HOLO, H., FIMLAND, G., HAUGE, H., and NISSEN-MEYER, J., 2002. Unmodified Peptide-bacteriocins (ClassII) Produced by Lactic Acid Bacteria. In: *Peptide Antibiotics; Discovery, Modes of Action and Applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, 81-115.
- NES, I.F., MAREKOVA, M., LAUKOVA. A., VUYST, D.L., and SKAUGEN, M., 2003. Partial Characterization of Bacteriocins Produced by Environmental Strain *Enterococcus faecium* EK13. *J of Appl. Microbiol.*, 94:52-530.
- NES, I.F., DIEP, D.B., and HOLO, H., 2007. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* And *Enterococcus*. *J. Bacteriol* 189: 1189-1198.
- OHMOMO, S., MURATA, S., KATAYAMA, N., NITISINPRASART, S., KOBAYASHI, M., NAKAJIMA, T., YAJIMA, M., and 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.
- ONDA, T., YANAGIDA, F., TSUJI, M., SHINOHARA, T., and YOKOTSUKA, K., 2003. Production and Purification of a Bacteriocin Peptide Produced By *Lactococcus* sp. Strain GM005 Isolated From Miso-Paste. *Inter. J. of Food Microbiol.*, 87: 153– 159.
- O'KEEFFE, T., and HILL, C., 1999. Bacteriocins: Potential in Food Preservation. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, Robinson RK (chief ed.), Volume 1, Academic Press, New York, 183-191.
- ORTOLANI, M.B.T., MORAES, P.M., PERIN, L. M., VICOSA, G.N., CARVALHO, K.G., JUNIOR, A.S., and NERO, L.A., 2010. Molecular Identification of Naturally Occurring Bacteriocinogenic and Bacteriocinogenic-like Lactic Acid Bacteria in Raw Milk and Soft Cheese, *J. Dairy Sci.*, 93: 2880-2886.

- ÖZDEMİR, G.B., ORYAŞIN, E., BIYIK, H.H., ÖZTEBER, M., and BOZDOĞAN, B., 2011. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacteriocins in Enterococcal Isolates of Different Sources. *Indian J Microbiol* (Apr-June), 51(2):182–187.
- PARK, S.H., ITOH, K., and FUJISAWA, T., 2003. Characteristics and Identification of Enterocins Produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 294–300.
- PHILLIPS, C.A., and DUGGAN, J., 2002. The Effect of Temperature and Citric Acid, Alone, and in Combination with Nisin, of the Growth of *Arcobacter butzleri* in Culture. *Food Control*, 13, 463–468.
- POWELL, J.E., WITTHUN, R.C., TODOROV, S.D., and DICKS, L.M.T., 2007. Characterization of Bacteriocin ST8KF Produced by a Kefir Isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal*, 17 (3): 190-198.
- RINKINEN, M., JALAVA, K., WESTEMARCK, E., SALMINEN, S., and OUWEHAND, AC., 2003. Interaction Between Probiotic Lactic Acid Bacteria and Canine Enteric Pathogens: A Risk Factor for Intestinal *Enterococcus faecium* Colonization. *Vet Microbiol.*, 20,92(1-2):111-9.
- ROCHE, S.M, KEROUANTON, A., MINET, J., LE MONNIER, A., BRISABOIS, A., and VELGE, P., 2009. Prevalence of Low-virulence *Listeria monocytogenes* Strains from Different Foods and Environments. *International Journal of Food Microbiology*, 130: 151–155.
- RODRIGUEZ, J.M., MARTINEZ, M.I., HORN, N., and DODD, H.M., 2003. Heterologous Production of Bacteriocins by Lactic Acid bacteria. *Int. J.Food Microbiol.*, 80:101-116.
- RODRIGUEZ, E., CALZADA, J., ARQUES, L., RODRIGUEZ, J.M., NUNEZ, M., and MEDINA, M., 2005a. Antimicrobial Activity of Pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in Cheese. *Int. Dairy J.*, 15. 51–57.

- RODRIGUEZ, E., ARQUES, J.L., NUNEZ, M., GAYA, P., and MEDINA, M., 2005b. Combined Effect of High-pressure Treatments and Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria on Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Raw-milk Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (7): 3399–404.
- ROSS, PR, MORGAN, S., and HILL, C., 2002. Preservation and Fermentation: Past, Present and Future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2):3-16.
- ROSSI, E.A., VENDRAMINI, R.C., CARLOS, L.Z., PEI, Y.C., and DE VALDEZ, G.F., 1999. Development of a Novel Fermented Soymilk Product With Potential Probiotic Properties. *Eur. Food Res. Technol.*, 209, 305-307.
- SAAVEDRA, L., TARANTO, MP., SESMA, F., and VALDEZ, GF., 2003. Homemade Traditional Cheeses for The Isolation of Probiotic *Enterococcus faecium* Strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 88:241-245.
- SABIA, C., MESSI, P., DE NIEDERHAUSERN, S., MANICARDI, G., and BONDI, M., 2004. Study of Two Bacteriocins Produced by *E. casseliflavus* and *E. faecalis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38, 99-105.
- SABIA, C., NIEDERHAUSERN, S., GUERRIERI, E., MESSI, P., ANACARSO, I., MANICARDI, G., and BONDI, M., 2007. Detection of Bacteriocin Production and Virulence Traits in Vancomycin-Resistant Enterococci of Different Sources. *Journal of Applied Microbiology* ISSN, 1364-5072.
- SANCAK, Y.C., İŞLEYİCİ, Ö., ve SAĞUN, E., 2007. Van'da Tüketime Sunulan Bazı Et Ürünlerinde *Listeria monocytogenes* Varlığı. *Y.Y.Ü. Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 18(1):93-99.
- SAVADOGO, A., OUATTARA, C.A.T., BASSOLE, I.H.N., and TRAORE, A.S., 2004. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3 (3): 174-179.
- SAVADOGO, A., OUATTARA, C.A.T., BASSOLE, I.H.N., and TRAORE, A.S., 2006. Bacteriocins and Lactic Acid Bacteria a Minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5(9), 678-683.

- TODOROV, S.D., and 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.
- TODOROV, S.D., NYATI, H., MEINCKEN, M., and DICKS, L.M.T., 2007. Partial Characterization of Bacteriocin AMA-K, Produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K Isolated from Naturally Fermented Milk from Zimbabwe. *Food Control*, 18, 656–664.
- TOIT, M., FRANZ, C.M.A.P., DICKS, L.M.T., and HOLZAPFEL, W.H., 2000. Preliminary Characterization of Bacteriocins Produced By *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolated From Pig Faeces. *J. of Appl. Microbiol.*, 88: 482–494.
- TOME, E., TODOROV, S.D., GIBBS, P.A., and TELXELRA, P.C., 2009. Partial Characterization of Nine Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Cold- Smoked Salmon With Activity Against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnology*, 23:50-73.
- TWOMEY, D., ROSS, R.P., RYAN, M., MEANY, B., and HILL, C., 2002. Lantibiotics Produced by Lactic Acid Bacteria: Structure, Function and Application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 165-185.
- TUNCER, Y., 2005. Laktokok Suşları Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Tanısı ve Özelliğın Genetik Doğasının Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 1-3 s.
- UYMAZ, B., 2009. Probiyotik Özellik Taşıyan Gıda ve İnsan Kaynaklı Laktobasillerin İzolasyonu Tanımlanması ve Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 54-126 s.
- VADYVALOO, V., AROUS, S., GRAVESEN, A., HECHARD, Y., CHAUHAN-HAUBROCK, R., HASTINGS, J.V., and RAUTENBACH, M., 2004. Cell-Surface Alterations in Class IIa Bacteriocinresistant *Listeria monocytogenes* Strains. *Microbiology*, 150: 3025–3033.

- VALENZUELA, A.S., OMAR, N.B., LOPEZ, R.L., ABRIOUEL, H., LOPEZ, R.L., VELYOVIC, K., CANAMERO, M.M., TOPISIRROVIC, M.K.L., and GALVEZ, A., 2009. Virulence Factors, Antibiotic Resistance and Bacteriocins in Enterococci from Artisan Foods of Animal Origin. Food Control Volum 20, Issue 4, pages 381-385.
- VILAS, A.M., 2011. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Microbiology Book Series Number 3 Vol. 2, 1330-1339.
- VUYST, D.L., MORENO, M.R., and REVETS, H., 2003. Screening for Enterocins and Detection of Hemolysin and Vancomycin Resistance in Enterococci of Different Origins. International Journal of Food Microbiology, 84, 299– 318.
- VON MOLLENDORFF, J.W., TODOROV, S. D., and DICKS, L. M. T., 2006. Comparison of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Boza, a Cereal-based Fermented Beverage from the Balkan Peninsula. Curr. Microbiol., 53(3): 209-216.
- XIE, Y., AN, H., HAO, Y., QIN, Q., HUANG, Y., LUO, Y., and ZHANG, L., 2011. Characterization of an Anti-*Listeria* Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 Isolated From Koumiss, a Traditionally Fermented Dairy Product From China. Food Control 22, 1027-1031.
- YALÇIN, A.N., 2009. Yoğun Bakım Ünitesinde Antibiyotik Kullanımı ve Direnç Sorununa Genel Bakış. Ankem Dergisi 23(Ek 2):136-142.
- YAMATO, M., OZAKI, K., and OTA, F., 2003. Partial Purification and Characterization of the Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. Microbiology Res., 158, 169–172.
- YAVUZ, M., ve KORUKLUOĞLU, M., 2010. *Listeria monocytogenes*'in Gıdalardaki Önemi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 24, Sayı 1, 1-10.
- YILDIRIM, M. 2007. Enterokoklar ve Enterokoklarla Gelişen İnfeksiyonlar. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2: 46-52.

YOON, M.Y., KIM, Y.J., and HWANG, H.J., 2008. Properties and Safety Aspects of *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Chungkukjang, a Fermented Soy Product. Food Science and Technology, Vol., 41, 925-933.

ÖZGEÇMİŞ

19/05/1987 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans eğitime başladı ve 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitime başladı. 2008-2009 yılları arasında Adana Seyhan Başkent Hastanesinde ve 2010-2011 yılları arasında Adana Acıbadem Hastanesinde biyolog olarak çalıştı.

EKLER

Ek-Çizelge 1. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin *L. monocytogenes*'e karşı inhibisyon etkileri

Kısmi saflaştırılmış bakteriyosin	İnhibisyon zonu (mm)
L13	8
YS1	10
AS1	9
P18	(-)
JS1	10
A1	10
H8	(-)
E5	9
LS1	(-)
NS1	8

(-): İnhibisyon zonu oluşmamıştır.

Ek-Çizelge 2. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin *L. monocytogenes*'e karşı inhibisyon etkileri

Kısmi saflaştırılmış bakteriyosin	İnhibisyon zonu (mm)
225	(-)
226	11
227	8,5
228	8
V98	9
V65	(-)
V105	8
V188	10
V150	(-)
V198	8

(-): İnhibisyon zonu oluşmamıştır.

Ek-Çizelge 3. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kaba bakteriyosinlerin *L. monocytogenes*'e karşı inhibisyon etkileri

Kaba bakteriyosin	İnhibisyon zonu (mm)
L13	12
YS1	12
AS1	16
P18	(-)
JS1	12
A1	14
H8	(-)
E5	13
LS1	(-)
NS1	10

(-):İnhibisyon zonu oluşmamıştır.

Ek-Çizelge 4. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen kaba bakteriyosinlerin *L. monocytogenes*'e karşı inhibisyon etkileri

Kaba bakteriyosin	İnhibisyon zonu (mm)
225	(-)
226	12
227	15
228	12
V98	12
V65	(-)
V105	15
V188	14
V150	(-)
V198	11

(-):İnhibisyon zonu oluşmamıştır.

Ek-Çizelge 5. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi

Farklı sıcaklık uygulamaları sonucu oluşan inhibisyon zonu (mm)						
Bakteriyosin	60°C	70°C	80°C	90°C	110°C	121°C
L13	12	11	10	11	9	(-)
YS1	12	12	12	12	10	(-)
AS1	15	15	14	13	13	(-)
JS1	12	12	11	11	11	(-)
A1	14	13	12	11	10	(-)
E5	13	13	12	11	(-)	(-)
NS1	10	10	10	9	9	(-)

(-):İnhibisyon zonu oluşmamıştır.

Ek-Çizelge 6. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi

Farklı sıcaklık uygulamaları sonucu oluşan inhibisyon zonu (mm)						
Bakteriyosin	60°C	70°C	80°C	90°C	110°C	121°C
226	12	11	12	11	11	(-)
227	12	11	11	10	9	(-)
228	12	12	11	10	10	(-)
V98	11	11	10	9	9	(-)
V105	14	14	13	12	10	(-)
V188	13	12	12	10	10	(-)
V198	10	9	8	8	(-)	(-)

(-):İnhibisyon zonu oluşmamıştır.

Ek-Çizelge 7. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı pH'ların etkisi

Farklı pH uygulamaları sonucu oluşan inhibisyon zonu (mm)					
Bakteriyosin	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11
L13	10	10	12	8	(-)
YS1	11	10	12	9	9
AS1	9	12	16	10	10
JS1	8	11	12	9	9
A1	13	11	14	11	10
E5	(-)	9	13	9	9
NS1	9	10	10	9	9

(-):İnhibisyon zonu oluşmamıştır.

Ek-Çizelge 8. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi üzerine farklı pH'ların etkisi

Farklı pH uygulamaları sonucu oluşan inhibisyon zonu (mm)					
Bakteriyosin	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11
226	9	10	12	11	11
227	9	9	15	11	(-)
228	9	10	12	12	10
V98	11	11	12	12	10
V105	10	10	15	12	11
V188	9	9	14	12	11
V198	(-)	(-)	11	10	9

(-):İnhibisyon zonu oluşmamıştır.