



**FERMENTE SUCUKTAN İZOLE EDİLEN ANTİLİSTERİYAL *ENTEROCOCCUS MUNDTII* YB6.30 TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN KARAKTERİZASYONU\***

**Tuba Altıncaynak, Yasin Tuncer\*\***

Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

Geliş / Received: 08.06.2020; Kabul / Accepted: 15.09.2020; Online baskı / Published online: 25.09.2020

Altıncaynak, T., Tuncer, Y. (2020). Fermente sucuktan izole edilen antilisteriyal *Enterococcus mundtii* YB6.30 tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu. GIDA (2020) 45(5) 963-976 doi: 10.15237/gida.GD20081

Altıncaynak, T., Tuncer, Y. (2020). Characterization of bacteriocin produced by antilisterial *Enterococcus mundtii* YB6.30 isolated from fermented sucuk. GIDA (2020) 45(5) 963-976 doi: 10.15237/gida.GD20081

**ÖZ**

Bu çalışmada, fermente sucuktan izole edilen antilisteriyal aktiviteye sahip *Enterococcus mundtii* YB6.30 tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu amaçlanmıştır. YB6.30 izolatu *Listeria* türlerinin yanı sıra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* ve *Escherichia coli* gibi gıda patojenlerinin de dahil olduğu çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterileri inhibe etmiştir. Proteolitik enzim uygulaması sonucu YB6.30 izolatu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin bakteriyosin olduğu belirlenmiştir. *E. mundtii* YB6.30 suşunun tanısı 16S rRNA gen dizi analizi ve türe özgü primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yapılmıştır. Farklı sıcaklık ve pH uygulamaları sonucu bakteriyosinin ısı stabil olduğu ve geniş pH aralığında (2.0-10.0) aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bakteriyosin vankomisin dirençli *E. faecium* ATCC 51559 suşuna karşı bakterisidal etki göstermiştir. PZR denemesi sonucu *E. mundtii* YB6.30'da mundtisin KS geni varlığı tespit edilmiştir. Trisin-SDS-PAGE analizi sonucu aktif protein bandının moleküler büyüklüğü yaklaşık 7.56 kDa olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Enterococcus mundtii*, mundtisin KS, fermente sucuk, enterosin, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), Trisin-SDS-PAGE.

**CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN PRODUCED BY ANTILISTERIAL *ENTEROCOCCUS MUNDTII* YB6.30 ISOLATED FROM FERMENTED SUCUK**

**ABSTRACT**

In this study, the characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus mundtii* YB6.30 with antilisterial activity isolated from fermented sucuk was aimed. The YB6.30 inhibited various Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *Listeria* species, as well as food pathogens such as

\* Bu çalışma Tuba Altıncaynak'ın yüksek lisans tez çalışmasıdır. Bu çalışmanın bir kısmı International Young Researchers Student Congress (IYRSC 2019) Burdur/Türkiye'de sözlü sunum olarak sunulmuş ve kongre kitabında bildiri olarak basılmıştır. *This paper is MSc thesis of Tuba Altıncaynak. This study was presented as a oral presentation at the International Young Researchers Student Congress (IYRSC 2019) Burdur/Turkey, and a part of this study was published in the book of proceedings.*

\*\* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding Author

✉: yasintuncer@sdu.edu.tr

☎: (+90) 246 211 1713

☎: (+90) 246 237 0437

Tuba Altıncaynak; ORCID no: 0000-0002-6348-9662

Yasin Tuncer; ORCID no: 0000-0002-2075-5027

*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* and *Escherichia coli*. As a result of proteolytic enzyme treatment, the antimicrobial substance produced by YB6.30 was identified as bacteriocin. Identification of *E. mundtii* YB6.30 was done by 16S rRNA gene sequence analysis and polymerase chain reaction (PCR) using species-specific primers. As a result of different temperature and pH treatments, it was determined that bacteriocin is heat stable and shows activity in wide pH range (2.0-10.0). Bacteriocin showed a bactericidal activity against vancomycin resistant *E. faecium* ATCC 51559. As a result of the PCR experiment, the presence of mundtisin KS gene was detected in *E. mundtii* YB6.30. Molecular size of active protein band was determined as 7.56 kDa as a result of Tricine-SDS-PAGE analysis.

**Keywords:** *Enterococcus mundtii*, mundtisin KS, sucuk (Turkish dry-fermented sausage), enterocin, polymerase chain reaction (PCR), Tricine-SDS-PAGE

## GİRİŞ

Enterokoklar pastörizasyon sıcaklığına dayanıklı olmalarının yanı sıra yüksek-düşük sıcaklık, ekstrem pH ve tuz konsantrasyonlarında gelişebilme özellikleri nedeniyle hem hayvansal hem de bitkisel kökenli birçok fermente gıdadan sıklıkla izole edilebilen homofermentatif laktik asit bakterileridir (LAB) (Martín-Platero, 2009; Javed vd., 2011; Akpınar Kankaya vd., 2017). Enterokokların ekstrem çevresel koşullarda gelişebilmeleri, endüstriyel süreçlerde farklı gıda proseslerinde kullanılabilmesi açısından avantaj sağlamaktadır (Alvarez-Cisneros vd., 2011). Enterokoklar glikolitik, proteolitik, lipolitik ve nitrat redüktaz aktiviteleri ve sitrat yıkımı ile peynir ve sosis gibi fermente gıdaların üretiminde ürüne has karakteristik özelliklerin oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar (Giraffa, 2003; Franz vd., 2003; Foulquié Moreno vd., 2006). Enterokoklar fermente gıdaların raf ömrünü uzatmak için koruyucu starter kültürler olarak da kullanılmaktadırlar (Abriouel vd., 2005). Enterokoklar laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal maddeler üreterek fermente gıdaların raf ömrünü uzatıp son ürünün mikrobiyel güvenliğini artırır (Martín-Platero vd., 2009; Jaouani vd., 2015). Bakteriyosinler, farklı bakteri türleri tarafından ribozomal olarak sentezlenen antimikrobiyal peptitlerdir (Franz vd., 2007). Enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler enterosinler olarak adlandırılmaktadır. Enterokoklarda yaygın olarak karşılaşılan enterosinler; enterosin A, B, P, AS-48, L50A, L50B, 1071A, 1071B ve Q'dur (Edalatian vd., 2012; Özden Tuncer vd., 2013; Gök Charyyev vd., 2019). Başlıca enterosin üretici türler *E. faecium* ve *E. faecalis* olarak bilinse de düşük sıklıklarda olsa *E. mundtii*, *E. durans*, *E. hirae*

ve *E. avium* türleri de bakteriyosin üretmektedir (Cotter vd., 2005). Mundtisin (Bennik vd., 1998), mundtisin KS (Kawamoto vd., 2002), mundtisin CRL35 (Saavedra vd., 2004), mundtisin QU2 (Zendo vd., 2005) ve mundtisin L (Feng vd., 2009) *E. mundtii* suşları tarafından üretildiği bildirilmiş enterosinlerdir.

Bu çalışmada, fermente sucuktan izole edilen antilisterial aktiviteye sahip *Enterococcus mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Mikroorganizmalar

Cins düzeyinde tanısı yapılmış fermente sucuktan izole edilen antilisterial aktiviteye sahip *Enterococcus* spp. YB6.30 izolatu Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Bakteriyel Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. YB6.30 izolatu de Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS, LAB M, Lancashire, UK) ortamında 37 °C'de 18 saat inkübe edilerek kültüre edilmiştir. YB6.30 izolatının antibakteriyel aktivite spektrumunun belirlenmesinde kullanılan indikatör bakteriler, kültüre edildikleri besiyeri ortamları ve gelişme sıcaklıkları Çizelge 1'de verilmiştir. Stok kültürler % 20 (v/v) steril gliserol ilave edilerek -32 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışma kültürleri ise gliserol ilave edilmemiş besiyeri ortamlarında +4 °C'de saklanmıştır.

### Genomik DNA izolasyonu

YB6.30 izolatından genomik DNA Cancilla vd. (1992) tarafından önerilen yöntemde küçük değişiklikler yapılarak izole edilmiştir. 1 mL aktif YB6.30 kültürü 13000 g'de 5 dakika santrifüj

## E. mundtii YB6.30 tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu

(Sigma 2-16P, Almanya) edilmiş ve hücre peleti 0.5 mL liziz buffer ile çözülmüştür. 37 °C'de 1 saat inkübasyonun ardından, tüpe 30 µL sodyum dodesil sülfat (SDS, % 10 w/v) ilave edilmiş ve tüp 80 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Lizata 0.7 mL fenol-kloroform (1:10, v/v) ilave edilmiş ve 13000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Genomik DNA 0.7 mL 2-propanol ile presipitiye edilmiş ve 13000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet 50 µL Tris-EDTA (pH 8.0) ile çözülmüş ve

kullanılincaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. DNA örneğinin agaroz jel elektroforezi % 0.7 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jelde 65 volta 1.5 saat süreyle yapılmıştır. Jel etidyum bromit (0.2 µg/mL) (Amresco Inc., Solon, OH, ABD) içeren çözeltide boyanmış ve UV transilluminator (Vilber Lourmat, ECX-F20.M, Fransa) üzerinde incelenmiştir. Jel fotoğrafı Nikon D5100 dijital fotoğraf makinesi (Nikon Corp., Japonya) kullanılarak çekilmiştir.

Çizelge 1. İndikatör bakterilerin geliştirildiği besiyeri ve inkübasyon sıcaklığı ve *Enterococcus* spp. YB6.30 izolatının inhibitör spektrumu

Table 1. Growth medium and incubation temperature of indicator strains, and inhibitory spectrum of *Enterococcus* spp. YB6.30 isolate

İndikatör bakteriler Indicator bacteria	Gelişme besiyeri* ve inkübasyon sıcaklığı Growth medium* and incubation temperature	YB6.30 izolatının inhibisyon zonu (Ø mm) Inhibition zone of YB6.30 (Ø mm)
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 51559	MRS, 37 °C	19
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	MRS, 37 °C	11
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	MRS, 37 °C	11
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2602	MRS, 37 °C	3
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2708	MRS, 37 °C	20
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	TSBYE, 37 °C	14
<i>Staphylococcus carnosus</i> LMG 2709	TSBYE, 37 °C	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	TSBYE, 37 °C	13
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	TSBYE, 37 °C	15
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	TSBYE, 37 °C	4
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15813	TSBYE, 37 °C	17
<i>Listeria innocua</i> LMG 2813	TSBYE, 30°C	16
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	TSBYE, 37 °C	6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	TSBYE, 37 °C	7
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25828	TSBYE, 37 °C	6
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	TSBYE, 37 °C	7
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	TSBYE, 37 °C	6
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	TSBYE, 37 °C	6
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	TSBYE, 37 °C	-
<i>Micrococcus luteus</i> RSK 1123	GM17, 30 °C	9

\*MRS: de Man, Rogosa and Sharpe broth; GM17: M17 broth (% 0.5 glukoz); TSBYE: Triptone Soy broth (% 0.5 maya ekstraktı)

\*MRS: de Man, Rogosa and Sharpe broth; GM17: M17 broth (containing 0.5 % glucose); TSBYE: Triptone Soy broth (containing 0.5 % yeast extract)

### **Enterococcus** spp. YB6.30 izolatının tür düzeyinde tanısı

*Enterococcus* spp. YB6.30 izolatının tür düzeyinde tanısı 16S rRNA gen dizi analizi ile yapılmıştır. 16S rRNA gen bölgesinin PZR ile çoğaltılmasında Edwards vd. (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. İzolatın tür düzeyinde tanısı

Jackson vd. (2004) tarafından önerilen *E. mundtii* türüne özgü primer çifti kullanılarak desteklenmiştir. *Enterococcus* spp. YB6.30 izolatının tür düzeyinde tanısında kullanılan primer çiftleri, ürün büyüklükleri ve PZR koşulları Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan PZR primerleri, ürün büyüklükleri ve PZR koşulları  
 Table 2. PCR primers, product sizes and PCR protocols used in this study

Gen <i>Gene</i>	Primer sekansları (5'-3') <i>Primer sequences (5'-3')</i>	Ürün büyüklüğü (bç) <i>Product size (bp)</i>	PZR protokolü <i>PCR protocol</i>
<i>16S rDNA</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CCGTC AATTCCTTTGAGTTT	921	Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 2dk; 30 döngü 94°C'de 30 sn, 55°C'de 60 sn, 72°C'de 90 sn; son uzama 72°C'de 10 dk
<i>sodA</i> <i>E. mundtii</i>	CAGACATGGATGCTATTCCATCT GCCATGATTTTCCAGAAGAAT	98	Başlangıç denatürasyonu 95°C'de 5dk; 30 döngü 95°C'de 30 sn, 60°C'de 60 sn, 72°C'de 60 sn; son uzama 72°C'de 7 dk
<i>entA</i>	AAATATTATGGAAATGGAGTGTAT GCACITCCCTGGAATTGCTC	126	Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 5dk; 35 döngü 94°C'de 60 sn, 56°C'de 60 sn, 72°C'de 40 sn; son uzama 72°C'de 10 dk
<i>entB</i>	GAAAATGATCACAGAATGCCTA GTTGCAITTTAGAGTATACATTTG	162	Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 5dk; 35 döngü 94°C'de 60 sn, 50°C'de 60 sn, 72°C'de 40 sn; son uzama 72°C'de 10 dk
<i>entP</i>	TATGGTAATGGTGTITTTATTGTAAT ATGTCCCATACTGCCAAAAC	120	Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 5dk; 35 döngü 94°C'de 60 sn, 50°C'de 60 sn, 72°C'de 40 sn; son uzama 72°C'de 10 dk
<i>entL50A/B</i>	TGGGAGCAATCGCAAAAATTAG ATTGCCCATCCTTCTCCAAT	98	Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 5dk; 35 döngü 94°C'de 60 sn, 52°C'de 60 sn, 72°C'de 40 sn; son uzama 72°C'de 10 dk
<i>bac31</i>	TATTACGGAAATGGTTTATATTGT TCTAGGAGCCCAAGGGCC	123	Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 5dk; 35 döngü 94°C'de 60 sn, 50°C'de 60 sn, 72°C'de 40 sn; son uzama 72°C'de 10 dk
<i>entAS48</i>	GAGGAGTTTCATGATTTAAAAGA CATATIGTTAAATTACCAAGCAA	340	Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 5dk; 35 döngü 94°C'de 60 sn, 50°C'de 60 sn, 72°C'de 40 sn; son uzama 72°C'de 10 dk
<i>entQ</i>	ATGAATTTTCTTCTTAAAAATGGTATCGCA TTAACAAGAAATTTTTCCTATGGCAA	105	Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 5dk; 35 döngü 94°C'de 60 sn, 56°C'de 60 sn, 72°C'de 40 sn; son uzama 72°C'de 10 dk
<i>ent1071A/B</i>	CCTATTGGGGGAGAGTCGGT ATACATTCCTCCACTTATTTTT	343	Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 5dk; 35 döngü 94°C'de 60 sn, 51°C'de 60 sn, 72°C'de 40 sn; son uzama 72°C'de 10 dk
<i>munKS</i>	TGAGAGAAGGTTTAAAGTTTTGAAGAA TCCACTGAAATCCATGAATGA	380	Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 5dk; 35 döngü 94°C'de 60 sn, 55°C'de 60 sn, 72°C'de 40 sn; son uzama 72°C'de 10 dk
<i>entCRL35</i>	GCAAACCGATAAGAATGTGGGAT TATACATTTGTCCCCACAACC	490	Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 5dk; 35 döngü 94°C'de 60 sn, 55°C'de 60 sn, 72°C'de 40 sn; son uzama 72°C'de 10 dk

PZR işlemleri TurboCycler 2 (Blue-Ray Biotech. Corp., Taipei city, Tayvan) termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin PZR fragmentinin elektroforezi % 1 (w/v), *E. mundtii* türüne özgü primer çifti kullanılarak çoğaltılan PZR fragmentinin elektroforezi ise % 2 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Elektroforez işlemlerinde Thermo Minicell®Primo EC320 tank sistemi kullanılmıştır. Jeller etidyum bromit ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır. Fragment büyüklükleri O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo, #SM1153) ve Genesta™ 100 bp DNA marker (GeneAll Bldg, GA-010, Seul, Kore) kullanılarak belirlenmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin PZR fragmentinin sekans analizi Oligomer Biyoteknoloji Ltd. Şti. (ODTÜ Teknokent, Ankara)'inde yaptırılmış ve dizi benzerliği Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programında analiz edilmiştir.

#### **Antibakteriyel aktivite spektrumu**

*E. mundtii* YB6.30 suşunun antibakteriyel aktivite spektrumu Çizelge 1'de verilen 20 indikatör bakteriye karşı test edilmiştir. Antibakteriyel aktivite testi için, YB6.30 kolonileri MRS agar ortamına steril kürdan aracılığı ile inoküle edilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen koloninin üzeri uygun besiyeri ortamında geliştirilmiş 100 µL indikatör bakteri içeren 5 mL yumuşak agar ile kaplanmıştır. Petri kutuları indikatör bakterilerin geliştiği uygun sıcaklıkta 18 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda YB6.30 kolonisi etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüştür (van Belkum vd., 1989).

#### **Antibakteriyel maddenin protein doğasının belirlenmesi**

*E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen antibakteriyel maddenin protein doğası proteolitik enzim uygulaması ile belirlenmiştir. MRS brtoh ortamında 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek geliştirilen *E. mundtii* YB6.30 kültürü 10000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve 0.45 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Almanya) geçirilerek steril kültür üst sıvısı elde edilmiştir. MRS agar ortamına 20 µL steril kültür üst sıvısı ve yaklaşık 1 cm uzağına enzim konsantrasyonu 50 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış pepsin (pH

3.0), tripsin (pH 7.0), proteinaz K (pH 7.0), α-kemotripsin (pH 7.0) veya katalaz (pH 7.0) enzim çözeltisinden 20 µL damlatılmış ve petri kutuları oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda petri kutuları 100 µL *E. faecium* ATCC 51559 inoküle edilmiş MRS yumuşak agar ortamı ile kaplanmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyon süresi sonunda, yarım ay şeklinde görülen inhibisyon zonları kültür üst sıvısının proteolitik enzimlere duyarlı olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Ryan vd., 1996).

#### **Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, enzim ve sıcaklık uygulamalarının etkisi**

Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, enzim ve sıcaklık uygulamalarının etkisi Franz vd. (1997) tarafından önerilen yöntemle belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için kültür üst sıvısının pH'sı 2.0-11.0 değerleri arasında ayarlanmıştır. pH'sı ayarlanmamış kültür üst sıvısı kontrol olarak kullanılmıştır. Bakteriyosin aktivitesi üzerine enzim uygulamasının etkisinin belirlenmesi için steril kültür üst sıvısına son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde proteinaz K (pH 7.0), tripsin (pH 7.0), α-kemotripsin (pH 7.0), pepsin (pH 3.0), α-amilaz (pH 7.0), lipaz (pH 7.0), katalaz (pH 7.0) veya lizozim (pH 7.0) çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler 37 °C'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve enzim aktiviteleri 100 °C'de 5 dakika ısı uygulaması ile sonlandırılmıştır. Denemelerde enzim uygulanmamış kültür üst sıvısı kontrol olarak kullanılmıştır. Sıcaklık uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi steril kültür üst sıvılarının 100 °C'de 5, 10, 15 ve 20 dakika ısı işleme tabi tutulmasıyla belirlenmiştir. Kontrol olarak sıcaklık uygulanmamış kültür üst sıvısı kullanılmıştır. pH, enzim ve sıcaklık uygulaması sonucu kalan bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesinde kritik dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Kritik dilüsyon yönteminde indikatör bakteri olarak *E. faecium* ATCC 51559 kullanılmıştır.

#### **Bakteriyosin yapısal genlerinin PZR ile belirlenmesi**

*E. mundtii* YB6.30 suşunda bilinen enterosin yapısal genlerinin varlığı, enterosin A (*entA*), B

(*entB*), P (*entP*), Q (*entQ*), L50A/B (*entL50A/B*), 1071A/B (*ent1071A/B*), AS48 (*entAS48*), CRL35 (*entCRL35*), bakteriyosin 31 (*bac31*) ve mundtisin KS (*munKS*) bakteriyosinlerine özgü primer çiftleri kullanılarak PZR ile araştırılmıştır (Saavedra vd., 2004; Yousif vd., 2005; Zendo vd., 2005; Ben Belgacem vd., 2010). Bakteriyosin yapısal genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR primerleri, ürün büyüklükleri ve PZR protokolleri Çizelge 2'de verilmiştir. PZR fragmentlerinin elektroforezi % 2 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jelde yapılmıştır. Denemelerde enterosin üreticisi *E. faecium* EYT31 (*entA*<sup>+</sup>, *entB*<sup>+</sup>, *entP*<sup>+</sup>) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Özden Tuncer vd., 2013).

### Bakteriyosin üretimi

Bakteriyosin üretiminin belirlenmesi için *E. mundtii* YB6.30 suşu 100 mL MRS broth ortamına inoküle (%1, v/v) edilmiş ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan kültürden her saat başı olmak üzere 12 saat boyunca örnek alınmış ve kültürün optik yoğunluğu ve bakteriyosin üretim miktarı belirlenmiştir. Kültürün optik yoğunluğu Shimadzu 1600 UV/VIS spektrofotometre (Japonya) kullanılarak 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bakteriyosin üretim miktarı kritik dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. İndikatör bakteri olarak *E. faecium* ATCC 51559 suşu kullanılmıştır (Todorov ve Dicks, 2005).

### Hücre liziz

Hücre liziz denemesi için 20 mL *E. mundtii* YB6.30 steril kültür üst sıvısı erken gelişme fazına kadar geliştirilen 100 mL *E. faecium* ATCC 51559 kültürüne ilave edilmiş ve 12 saat süreyle inkübe edilmiştir. Kültürün optik yoğunluğu birer saat arayla spektrofotometre (Shimadzu) ile 600 nm'de ölçülmüştür. *E. mundtii* YB6.30 steril kültür üst sıvısı ilave edilmemiş *E. faecium* ATCC 51559 kültürü kontrol olarak kullanılmıştır (Todorov ve Dicks, 2005).

### Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması

MRS broth ortamında 37 °C'de bir gece kültüre edilmiş 100 mL *E. mundtii* YB6.30 kültürü 15000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve kültür üst sıvısının pH'sı 6.5'e ayarlanmıştır. Nötralize

edilmiş kültür üst sıvısına 40 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Almanya) yavaş yavaş ilave edilmiş ve 4 °C'de bir gece karıştırılmıştır. Ertesi gün doyurulmuş kültür üst sıvısı 4 °C'de 15000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Yüzey peletleri ve dip peleti 5 mL sodyum fosfat tampon (pH 7.0) ile çözülmüştür. Karışım üzerine 75 mL metanol/kloroform (1:2, v/v) çözeltisi ilave edilerek 4 °C'de 1 saat ekstrakte edilmiştir. Daha sonra örnek 4 °C'de 15000 g'de 45 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan pelet oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulmuş pelet 1 mL steril ultra saf suda çözülerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Foulquié Moreno vd., 2003).

### Trisin-SDS-PAGE ve aktif protein bandının tespiti

Bakteriyosinin moleküler büyüklüğü Schagger ve von Jagow, (1987) tarafından önerilen Trisin-SDS-PAGE yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Elektroforez işlemi Thermo OWL™ P81 dikey tank sisteminde % 9.8'lik toplayıcı jel ve % 16.5'lik ayırıcı jel hazırlanarak tris-trisin-SDS tamponu (Sigma, T1165, Steinheim, Almanya) eşliğinde gerçekleştirilmiştir. Toplayıcı jel için 30 volt, ayırıcı jel için 90 volt elektrik akımı uygulanmıştır. Jel kuyularına kısmi saflaştırılması yapılmış bakteriyosin örneğinden 10 µL aktarılmıştır. Elektroforez işlemi sonrası jel iki ayrı parçaya ayrılmış ve parçalardan biri peptid bantlarının büyüklüğünün belirlenmesi için Coomassie brilliant blue R250 (Merck) çözeltisi ile boyanmıştır. Boyanmamış jel parçası aktif protein bandının tespiti için kullanılmıştır. Bunun için jel steril ultra saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkanan jel, besiyeri ile jel arasında boşluk kalmayacak şekilde MRS agar bulunan petri kutusuna (Ø 14 cm) yerleştirilmiş ve yüzeyi *E. faecium* ATCC 51559 inoküle edilmiş 20 mL MRS yumuşak agar ile kaplanmıştır. Petri kutusu 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda jel üzerinde oluşan inhibisyon zonu incelenmiştir (Tuncer ve Özden, 2010).

### SONUÇ VE TARTIŞMA

Fenotipik yöntemlerle cins düzeyinde tanısı yapılmış olan antilisterial aktiviteye sahip *Enterococcus* spp. YB6.30 izolatının tür düzeyinde tanısı 16S rRNA gen dizi analizi ve türe özgü

primer çifti kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yapılmıştır. *Enterococcus* spp. YB6.30 izolatında 16S rRNA gen bölgesinin PZR ile çoğaltılmış ampikonunun DNA dizisi BLAST programında analiz edilmiş ve *Enterococcus mundtii* ile % 96 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. YB6.30 izolatının tür düzeyinde tanısı *E. mundtii* türüne özgü primer çifti kullanılarak PZR ile desteklenmiştir. Türe özgü PZR analizi sonucu YB6.30 suşunun *E. mundtii* türüne özgü primer çifti ile 98 bç büyüklüğünde ampikonlar verdiği agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular ışığında antilisterial aktiviteye sahip *Enterococcus* spp. YB6.30 izolatı *Enterococcus mundtii* olarak tanımlanmıştır. Geçmiş yıllarda yapılan benzer çalışmalarda da başta geleneksel peynir (Parada vd., 2007; İşleroglu vd., 2012; Özden Tuncer vd., 2013; Favaro vd., 2014; Avcı ve Özden Tuncer, 2017) ve fermente sosis (Paramithiotis vd., 2014) olmak üzere çiğ süt (Tuncer vd., 2014) ve boza (Gök Charyyev vd., 2019) gibi farklı gıda örneklerinden antilisterial aktiviteye sahip *Enterococcus* türleri izole edilmiştir. Ancak söz konusu çalışmalarda bakteriyosin üretimi *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinde daha sık tanımlanan bir özellik olarak dikkati çekmektedir. Bu nedenle çalışma kapsamında kullanılan antilisterial aktiviteye sahip *Enterococcus* spp. YB6.30 izolatının *E. mundtii* olarak tanımlanması önemlidir. Günümüze kadar bakteriyosin üreticisi olduğu belirlenmiş sınırlı sayıda *E. mundtii* suşu rapor edilmiştir (Kawamoto vd., 2002; De Kwaadsteniet vd., 2005; Ferreira vd., 2007; Espeche vd., 2014; Settanni vd., 2014). Söz konusu çalışmalarda kullanılan *E. mundtii* suşları genellikle bitkisel kökenli izolatlardır. İstisnai olarak Ferreira vd. (2007) tarafından kullanılan *E. mundtii* suşları insan dışkısu izolatı, Espeche vd. (2014) tarafından kullanılan *E. mundtii* CRL1656 suşu ise sağlıklı sığır izolatıdır. *E. mundtii* YB6.30 suşu fermente sucuktan izole edilen ilk bakteriyosin üreticisi *E. mundtii* suşudur.

Aktivite spektrumu belirleme çalışması sonucu *E. mundtii* YB6.30 suşunun *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* ve *Escherichia coli* gibi gıda patojenlerinin de dahil

olduğu çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterileri inhibe ettiği belirlenmiştir (Çizelge 1). *E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen antibakteriyel maddenin Gram-pozitif gıda patojenlerinin yanı sıra *Salmonella* ve *E. coli* suşlarına karşı da inhibitör etki göstermesi dikkat çekicidir. LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin Gram-negatif bakteriler üzerine inhibitör etki gösterdiğini bildiren sınırlı sayıda çalışma bulunmasına rağmen bazı *Enterococcus* türleri tarafından üretilen enterosinlerin Gram-pozitif bakterilerin yanı sıra Gram-negatif bakterilere karşı da antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (De Kwaadsteniet vd., 2005; Ferreira vd., 2007; Alvarez-Cisneros vd., 2011; M'hir vd., 2011; H-Kittikun vd., 2014; Schelegueda vd., 2015; Avcı ve Özden Tuncer, 2017).

Proteolitik enzim uygulaması sonucu, *E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen antibakteriyel maddenin katalaz enziminden etkilenmediği ancak proteinaz K, pepsin,  $\alpha$ -kemotripsin ve tripsin ile aktivite kaybına uğradığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular antibakteriyel aktivitenin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı olmadığını, YB6.30 suşu tarafından üretilen antibakteriyel maddenin protein yapıda (bakteriyosin) olduğunu göstermiştir. Bakteriyosinler protein doğaları nedeniyle proteolitik enzim uygulamaları sonucu kısmen veya tamamen aktivitelelerini kaybetmektedirler (Ben Belgacem vd., 2010). Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin proteinaz K, tripsin,  $\alpha$ -kemotripsin ve pepsin gibi proteolitik enzimlerle muamele edilmeleri sonucunda aktivitelelerini kısmen ya da tamamen kaybettikleri rapor edilmiştir (Kawamoto vd., 2002; De Kwaadsteniet vd., 2005; Ferreira vd., 2007; H-Kittikun vd., 2014; Gök Charyyev vd., 2019).

Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH, enzim ve sıcaklık uygulamalarının etkisi Çizelge 3'de verilmiştir. Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin test edildiği denemeler sonucu *E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin pH 2.0-9.0 aralığında aktivitesini koruduğu, pH 10.0'da aktivitesinin % 50 oranında azaldığı ve pH

11.0'de ise aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. Benzer olarak farklı çalışmalarda da enterosinlerin genellikle pH 2.0 ile 10.0 arasında aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Zendo vd., 2005; Ferreira vd., 2007; Strompfová ve Lauková, 2007; Javed vd., 2011; Ahmadova vd., 2013; Gök Charyyev vd., 2019). Enzim uygulaması sonucu bakteriyosinin katalaz, lizozim ve lipaz enzimlerine karşı aktivitesini korurken proteinaz K, pepsin,  $\alpha$ -kemotripsin, tripsin ve  $\alpha$ -amilaz enzimleri ile muamele edildiğinde aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir. Enterosinlerin protein doğaları nedeniyle proteolitik enzimler ile muamele edildiklerinde aktivite kaybına uğradığı, lipaz, katalaz ve lizozim enzimlerinden ise etkilenmediği bildirilmiştir (Kawamoto vd., 2002; Parada vd., 2007; Javed vd., 2011; Chen vd., 2013; Ahmadova vd., 2013; Gök Charyyev vd., 2019). *E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivitesi üzerine lipaz enziminin etkisiz olması üretilen bakteriyosinin yapısında lipid bulunmadığını göstermektedir. Diğer taraftan üretilen bakteriyosinin  $\alpha$ -amilaz enzimi uygulaması sonucu aktivitesini kaybetmesi bakteriyosin aktivitesi için karbonhidrat yapının gerekli olduğunu göstermektedir. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda da  $\alpha$ -amilaz'a duyarlı glikoprotein bakteriyosinler bildirilmiştir (Tuncer ve Özden, 2010; Seo vd., 2014; Heredia-Castro vd., 2015; Gök Charyyev vd., 2019). Sıcaklık uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı denemeler sonucu, bakteriyosinin 100 °C'de 5, 10, 15 ve 20 dakika sıcaklık uygulamalarında aktivitesini koruduğu (ısı stabil olduğu) belirlenmiştir. Enterosinler ısı stabil bakteriyosinlerdir. Çoğu enterosinin 121 °C'de 15 dakika ısı işlem uygulaması sonucu aktivite kaybına uğramadığı rapor edilmiştir (Kawamoto vd., 2002; Parada vd., 2007; H-Kittikun vd., 2014; Schelegueda vd., 2015; Gök Charyyev vd., 2019). *E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin geniş pH aralığında aktivite göstermesi ve ısı stabil olması gıda proseslerinde kullanımı açısından önemli bir avantajdır.

Bilinen enterosin primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR denemeleri sonucunda *E. mundtii* YB6.30 suşundan mundtisın KS üretiminden sorumlu *munKS* genine özgü 380 bp

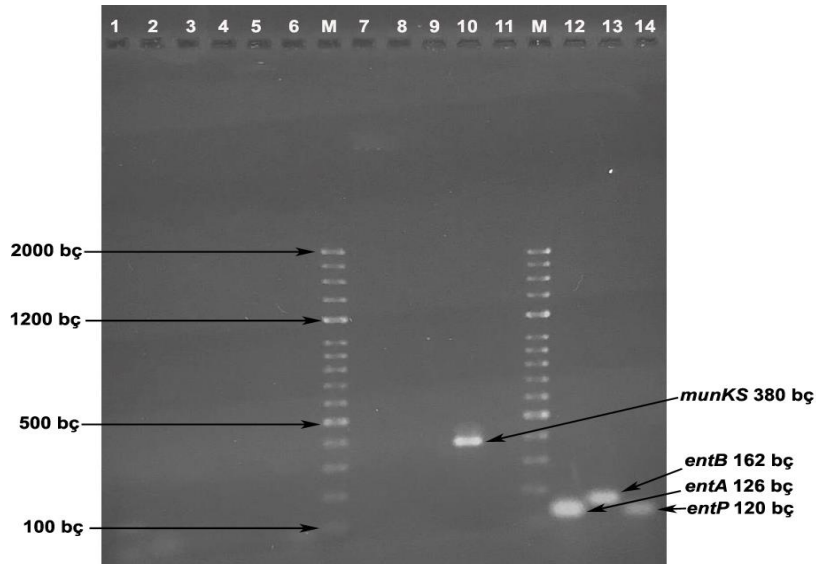
büyükliğünde ampikon elde edilmiştir. PZR denemelerinde kullanılan diğer primer çiftleri ile herhangi bir ampikon elde edilememiştir (Şekil 1). Bu bulgular *E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin mundtisın KS olduğunun güçlü delili olarak kabul edilmiştir. Günümüze kadar *E. mundtii* suşlarında mundtisın (Bennik vd., 1998), mundtisın KS (Kawamoto vd., 2002), mundtisın CRL35 (Saavedra vd., 2004), mundtisın QU2 (Zendo vd., 2005) ve mundtisın L (Feng vd., 2009) olmak üzere sınırlı sayıda bakteriyosin tanımlanmıştır.

Çizelge 3. *E. mundtii* YB6.30 tarafından üretilen bakteriyosinin aktivitesi üzerine pH, enzim ve sıcaklık uygulamalarının etkisi

Table 3. The effects of pH, enzyme and heat treatments on the activity of the bacteriocin produced by *E. mundtii* YB6.30

Muamele <i>Treatment</i>	Bakteriyosin Aktivitesi (AU/mL) <i>Bacteriocin activity</i> (AU/mL) <i>E. mundtii</i> YB6.30
Kontrol/ <i>Control</i>	800
pH	
2	800
3	800
4	800
5	800
6	800
7	800
8	800
9	800
10	400
11	0
Enzim/ <i>Enzyme</i>	
Proteinaz K/ <i>Proteinase K</i>	0
Pepsin/ <i>Pepsin</i>	0
Lizozim/ <i>Lysozyme</i>	800
$\alpha$ -Kemotripsin/ <i><math>\alpha</math>-Chymotrypsin</i>	0
Tripsin/ <i>Trypsin</i>	0
$\alpha$ -Amilaz/ <i><math>\alpha</math>-Amylase</i>	0
Lipaz/ <i>Lipase</i>	800
Katalaz/ <i>Catalase</i>	800
Sıcaklık/ <i>Heat</i>	
100°C 5 dk /100°C 5 min	800
100°C 10 dk /100°C 10 min	800
100°C 15 dk /100°C 15 min	800
100°C 20 dk /100°C 20 min	800





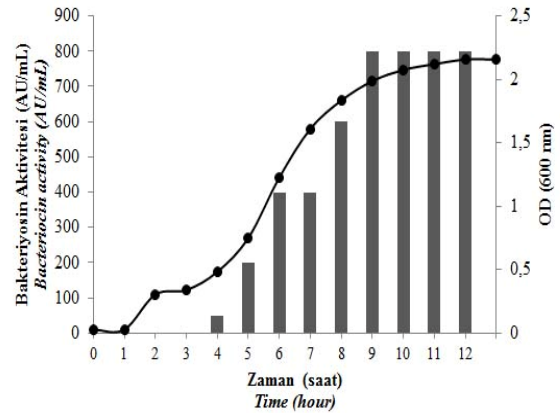
Şekil 1. *E. mundtii* YB6.30 suşunda bilinen enterosin yapısal genlerinin PZR ile tespiti (1-10: *E. mundtii* YB6.30, 12-14: *E. faecium* EYT31 (pozitif kontrol))

1: *entA*; 2: *entB*; 3: *entP*; 4: *entL50A/B*; 5: *bac31*; 6: *entAS48*; M: Genesta™ 100 bp DNA marker (GeneAll, Kore); 7: *entQ*; 8: *ent1071A/B*; 9: *entCRL35*; 10: *munKS* (380 bp); 11: negatif kontrol (su); M: Genesta™ 100 bp DNA marker (GeneAll, Kore); 12: *entA* (126 bp); 13: *entB* (162 bp); 14: *entP* (120 bp)

Figure 1. Detection of known enterocin structural genes in *E. mundtii* YB6.30 strain by PCR (1-10: *E. mundtii* YB6.30, 12-14: *E. faecium* EYT31 (positive control))

1: *entA*; 2: *entB*; 3: *entP*; 4: *entL50A/B*; 5: *bac31*; 6: *entAS48*; M: Genesta™ 100 bp DNA marker (GeneAll, Korea); 7: *entQ*; 8: *ent1071A/B*; 9: *entCRL35*; 10: *munKS* (380 bp); 11: negative control (water); M: Genesta™ 100 bp DNA marker (GeneAll, Korea); 12: *entA* (126 bp); 13: *entB* (162 bp); 14: *entP* (120 bp)

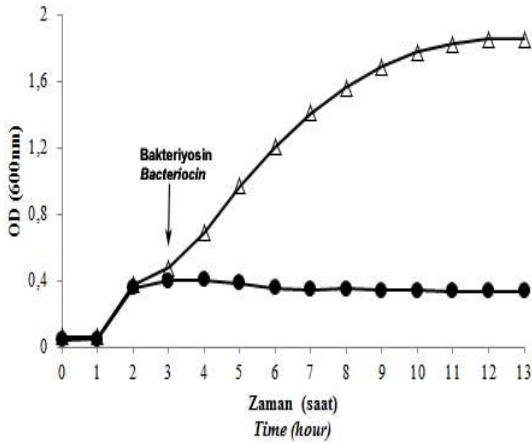
Bakteriyosin üretiminin belirlenmesi üzerine yapılan denemelerde *E. mundtii* YB6.30 suşunun inkübasyonun 4. saati sonunda 50 AU/mL düzeyinde bakteriyosin ürettiği tespit edilmiştir. İnkübasyonun ilerleyen saatlerinde bakteriyosin aktivitesinin hücre yoğunluğunun artışına paralel olarak arttığı belirlenmiştir. En yüksek bakteriyosin aktivitesi olan 800 AU/mL kültür yoğunluğunun 1.987 değerine ulaştığı 9. saatin sonunda tespit edilmiştir (Şekil 2). Bakteriyosin üretiminin gelişme fazında başlamış ve gelişme fazının sonunda maksimum seviyeye ulaşmış olması *E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin primer metabolit kinetiğine sahip olduğunu işaret etmektedir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da *Enterococcus* türleri tarafından üretilen bakteriyosinlerin primer metabolit kinetiğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Ferreira vd., 2007; Martín-Platero vd., 2009; Chen vd., 2013; Espeche vd., 2014; Gök Charyyev vd., 2019).



Şekil 2. *E. mundtii* YB6.30 suşunun 37°C'de kontrolsüz pH'da bakteriyosin üretimi (optik yoğunluk 600 nm'de (içi dolu daire), bakteriyosin üretimi AU/mL cinsinden (içi dolu sütun)).

Figure 2. Bacteriocin production of *E. mundtii* YB6.30 strain at uncontrolled pH at 37°C (optical density at 600 nm (filled circle), bacteriocin production as AU/mL (filled column)).

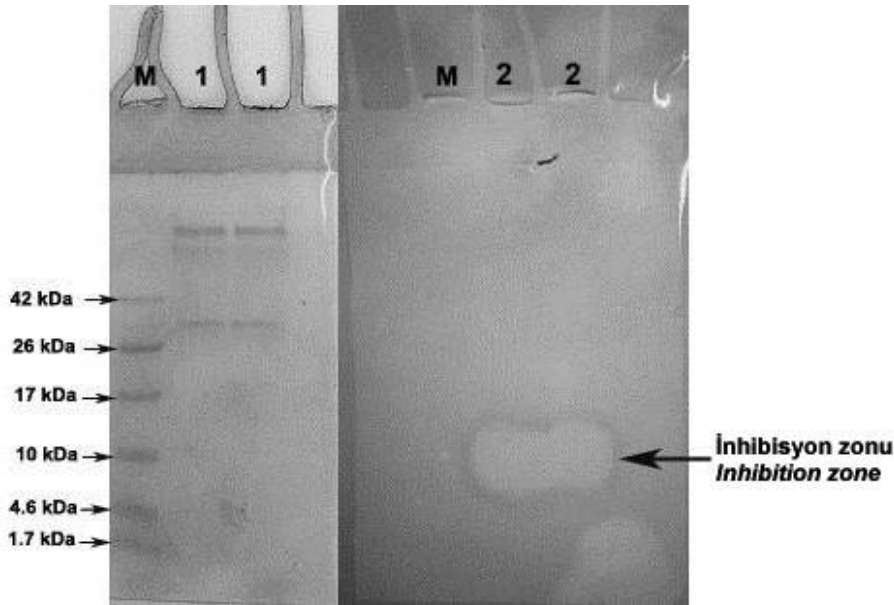
Hücre liziz çalışması ile *E. faecium* ATCC 51559 kültürünün optik yoğunluğunun bakteriyosin içeren kültür üst sıvısının ilave edilmesini takiben düşmeye başladığı ve bu inhibisyonun 12. saatin sonuna kadar devam ettiği tespit edilmiştir (Şekil 3). Elde edilen bulgular ışığında *E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin *E. faecium* ATCC 51559 suşuna karşı bakterisidal etki gösterdiği belirlenmiştir. *Enterococcus* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin duyarlı indikatör bakterilere karşı bakterisidal etki gösterdiği farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da tespit edilmiştir (Alvarez-Cisneros vd., 2011; Javed vd., 2011; Ahmadova vd., 2013; Favaro vd., 2014; Ndlovu vd., 2015; Gök Charyyev vd., 2019).



Şekil 3. *E. mundtii* YB6.30 kültür üst sıvısının, kültür üst sıvısı ilave edilmemiş (içi dolu daire) ve edilmiş (içi boş üçgen) *E. faecium* ATCC 51559'un gelişmesi üzerine etki şekli. Ok bakteriyosin içeren kültür üst sıvısının ilave edildiği noktayı göstermektedir.

Figure 3. Mode of action of cell free supernatant of *E. mundtii* YB6.30 on growth of *E. faecium* ATCC 51559 without cell free supernatant (filled circle) and with cell free supernatant (open triangle). The arrow indicates the point at which cell free supernatant containing active bacteriocin was added.

*E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen kısmi saflaştırılması yapılmış bakteriyosinin moleküler büyüklüğü Trisin-SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir (Schägger ve von Jagow, 1987). Aktif protein bandının moleküler büyüklüğü yaklaşık 7.56 kDa olarak tespit edilmiştir (Şekil 4). Yapılan çalışmalar günümüze kadar tanımlanmış grup IIa üyesi enterosinlerin moleküler büyüklüklerinin 10 kDa'dan küçük olduğunu göstermiştir (Eijsink vd., 2002; Ferreira vd., 2007; Gök Charyyev vd., 2019). Elde edilen sonuç da bunu destekler niteliktedir. Kawamoto vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada *E. mundtii* NFRI 7393 suşu tarafından üretilen amonyum sülfat çöktürmesi, katyon-değişim kromatografisi, aseton çöktürmesi ve sıvı-faz ekstraksiyonu ile saflaştırılmış mundtisın KS'nin Trisin-SDS-PAGE ile tek aktif protein bandı verdiği belirlenmiştir. Araştırmacılar amino asit ve nükleotit dizilerini esas alarak mundtisın KS'nin yaklaşık 4290 Da moleküler büyüklüğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada *E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin saflaştırılmasında sadece amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış olması bakteriyosinin Trisin-SDS-PAGE'de göçünü etkilemiş olabileceği düşünülmektedir. Benzer olarak Huang vd. (2016), sadece amonyum sülfat çöktürmesi yaparak kısmi saflaştırmasını yaptıkları *Bacillus thuringiensis* BRC-ZYR2 suşu tarafından üretilen thurisin BtCspB bakteriyosininin moleküler büyüklüğünü Trisin-SDS-PAGE ile <14.4 kDa olarak tespit etmişken, anyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmış bakteriyosinin moleküler ağırlığını Trisin-SDS-PAGE ile 7 kDa olarak tespit etmişlerdir. Bu nedenle ileride yapılacak çalışma ile *E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin moleküler büyüklüğünün kesinlik kazanması için amonyum sülfat çöktürmesini takiben kromatografik saflaştırma proseslerinin de uygulanması gerekmektedir.



Şekil 4. Kısmi saflaştırılmış bakteriyosinin Trisin-SDS-PAGE ile ayrımı. M: multicolour low range protein marker (fermentas), 1: protein bantları; 2: TSBYE yumuşak agarda *E. faecium* ATCC 51559'in inhibisyonu (ok).

Figure 4. Separation of partially purified bacteriocin by tricine-SDS-PAGE. M: multicolour low range protein ladder (fermentas), 1: protein bands; 2: inhibition of *E. faecium* ATCC 51559 (arrow), embedded in TSBYE soft agar.

## SONUÇ

Bu çalışmada antilisterial aktiviteye sahip *E. mundtii* YB6.30 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu yapılmıştır. Geniş aktivite spektrumuna sahip mundtisin KS üreticisi olduğu tespit edilen *E. mundtii* YB6.30 suşu gıda güvenliğini geliştirmek amaçlı fermente gıda üretiminde starter ya da yardımcı starter kültür olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Kasap ve Tuncer (2019) tarafından yapılan çalışmada, mundtisin KS üreticisi *E. mundtii* YB6.30 suşunun gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanımının güvenli olduğu belirtilmiştir. İleride yapılacak çalışmalar ile mundtisin KS üreticisi *E. mundtii* YB6.30 suşunun gıda üretim proseslerinde starter/yardımcı starter kültür olarak kullanımının test edilmesi gerekmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı FYL-2018-5761 nolu proje ile maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkür ederiz.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## YAZAR KATKILARI

YT, çalışma konusunu belirlemiş ve deneysel çalışma düzenini planlamıştır. TA ve YT deneysel çalışmalarını gerçekleştirmiştir. TA makalenin taslağını oluşturmuş, YT makalenin inceleme-düzenleme aşamalarında danışman olarak katkı sağlamıştır. Yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamıştır.

## KAYNAKLAR

Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A. (2005). Bacteriocin production, plasmid content and plasmid location of enterocin P structural gene in *Enterococci* isolated from food sources. *Lett Appl Microbiol*, 42(4), 331-337.

Ahmadova, A., Todorov, S.D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T.M., Kuliyeu, A., de Melo Franco, B.D.G., Chobert, J.M., Haertle, T. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic

- properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani motal cheese. *Food Control*, 30(2), 631-641.
- Akpınar Kankaya, D., Özden Tuncer, B., Tuncer, Y. (2017). Gıda kaynaklı enterokokların potansiyel risk faktörleri. *GIDA*, 42(1), 8-19.
- Alvarez-Cisneros, Y.M., Sáinz Espuñes, T.R., Wachter, C., Fernandez, F.J., Ponce-Alquicira, E. (2011). Enterocins: bacteriocins with applications in the food industry. In: *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. Méndez-Vilas, A. (ed.), Formatex Research Center, Badajoz, Spain, pp. 1330-1341.
- Avcı, M., Özden Tuncer, B. (2017). Safety evaluation of enterocin producer *Enterococcus* sp. strains isolated from traditional Turkish cheeses. *Pol J Microbiol*, 2, 223-233.
- Ben Belgacem, Z., Abriouel, H., Omar, N.B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., Manai, M. (2010). Antimicrobial activity, safety aspects and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21(4), 462-470.
- Bennik, M.H.J., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L.G.M., Smid, E.J. (1998). A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim Biophys Acta*, 1373, 47-58.
- Cancilla, M.R., Powell, I.B., Hillier, A.J., Davidson, B.E. (1992). Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with 32P and fluorescent labels. *Appl Environ Microbiol*, 58(5), 1772-1775.
- Chen, Y., Yu, C., Ji, S., Liou, M., Leong, K., Pan, S., Wu, H., Lin, Y., Yu, B., Yanagida, F. (2013). Enterocin T, a novel class IIa bacteriocin produced by *Enterococcus* sp. 812. *Arch Microbiol*, 195:655-660.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, 3, 777-788.
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H., Dicks, L.M.T. (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*, 105, 433-444
- Edalatian, R.M., Najafi, M.B.H., Mortazavi, S.A., Alegria, A., Delgado, S., Bassami, M.R., Mayo, B. (2012). Production of bacteriocins by *Enterococcus* spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. *Eur Food Res Technol*, 234, 789-796.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Bottger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 17, 7843-7853.
- Eijsink, V. G.H., Axelsson, L., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Holo, H., Nes, I. F. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Anton Leeuw*, 81, 639-654.
- Espeche, M.C., Tomás, M.S.J., Wiese, B., Bru, E., Nader-Macias, M.E.F. (2014). Physicochemical factors differentially affect the biomass and bacteriocin production by bovine *Enterococcus mundtii* CRL1656. *J Dairy Sci*, 97, 789-797.
- Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X., Franco, B.D.G.de M. (2014). Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiol*, 38, 228-239.
- Feng, G., Guron, G.K., Churey, J.J., Worobo, R.W. (2009). Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Appl Environ Microbiol*, 75, 5708-5713.
- Ferreira, A.E., Canal, N., Morales, D., Fuentesfria, D.F., Corção, G. (2007). Characterization of enterocins produced by *Enterococcus mundtii* isolated from humans feces. *Braz Arch Biol Technol*, 50(2), 249-258.
- Foulquié Moreno, M.R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Vuyst, L. (2003).

- Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J Appl Microbiol*, 94, 214-229.
- Foulquié Moreno, M.R, Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol*, 106(1), 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Du Toit, M., von Holy, A., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. (1997). Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *J Basic Microbiol*, 37, 187-196.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. (2003). *Enterococci* in foods-a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol*, 88, 105-122.
- Franz, C.M.A.P., van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H., Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev*, 31(3), 293-310.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol*, 88(2-3), 215-222.
- Gök Charyyev, M., Özden Tuncer, B., Akpınar Kankaya, D., Tuncer, Y. (2019). Bacteriocinogenic properties and safety evaluation of *Enterococcus faecium* YT52 isolated from boza, a traditional cereal based fermented beverage. *J Consum Prot Food Saf*, 14(1), 41-53.
- Heredia-Castro, P.Y., Méndez-Romero, J.I., Hernández-Mendoza, A., Acedo-Félix, E., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B. (2015). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *J Dairy Sci*, 98, 8285-8293.
- H-Kittikun, A., Biscola, V., El-Ghaish, S., Jaffres, E., Dousset, X., Pillot, G., Haertle, T., Chobert, J., Hwanhlem, N. (2014). Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: purification, characterization and safety evaluation. *Food Control*, 54, 126-134.
- Huang, T., Zhang, X., Pan, j., Su, X., Jin, X., Guan, X. (2016). Purification and characterization of a novel cold shock protein-like bacteriocin synthesized by *Bacillus thuringiensis*. *Sci Rep*, 6, 35560.
- İşleroglu, H., Yıldırım, Z., Tokatlı, M., Öncül, N., Yıldırım, M. (2012). Partial characterisation of enterocin KP produced by *Enterococcus faecalis* KP, a cheese isolate. *Int J Dairy Technol*, 65(1), 90-97.
- Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Barrett, J.B. (2004). Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol*, 42(8), 3558-3565.
- Jaouani, I., Abbassi, M.S., Ribeiro, S.C., Khemiri, M., Mansouri, R., Messadi, L., Silva, C.C.G. (2015). Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. *J Appl Microbiol*, 119(4), 1089-1100.
- Javed, A., Masud, T., ul Ain, Q., Imran, M., Maqsood, S. (2011). Enterocins of *Enterococcus faecium*, emerging natural food preservatives. *Ann Microbiol*, 6, 699-708.
- Kasap, M., Tuncer, Y. (2019). Fermente sucuktan izole edilen mundtisin KS üreticisi *Enterococcus mundtii* YB6.30 suşunun teknolojik özellikleri ve güvenlik değerlendirmesi. *GIDA*, 44(5), 866-880.
- Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K., Sameshima, T. (2002). Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *J Appl Microbiol*, 68, 3830-3840.
- M'hir, S., Minervini, F., Di Cagno, R., Chammem, N., Hamdi, M. (2011). Technological, functional and safety aspects of enterococci in fermented vegetable products: a mini-review. *Ann Microbiol*, 62, 469-481.
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. (2009). Characterization and safety evaluation of *Enterococci* isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int J Food Microbiol*, 132(1), 24-32.
- Ndlovu, B., Schoeman, H., Franz, C.M.A.P., du Toit, M. (2015). Screening, identification and

- characterization of bacteriocins produced by wine-isolated LAB strains. *J Appl Microbiol*, 118(4), 1007-1022.
- Özden Tuncer, B., Ay, Z., Tuncer, Y. (2013). Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance in 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Turk J Biol*, 37(4), 443-449.
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Socol, C.R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Braz Arch Biol Technol*, 50(3), 521-542.
- Paramithiotis, S., Vlontartzik, E., Drosinos, E.H. (2014). Enterocin production by *Enterococcus faecium* strains from Greek spontaneously fermented sausages. *Ital J Food Sci*, 26, 11-17.
- Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C., Ross, R.P. (1996). An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad spectrum bacteriocin lacticin 3147. *Appl Environ Microbiol*, 62, 612-619.
- Saavedra, L., Minahk, C., de Ruiz Holgado, A.P., Sesma, F. (2004). Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH<sub>2</sub>-terminal sequence. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 2778-2781.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987). Tricine-SDS-PAGE for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166, 368-379.
- Schelegueda, L.I., Vallejo, M., Gliemmo, M.F., Marguet, E.R., Campos, C.A. (2015). Synergistic antimicrobial action and potential application for fish preservation of bacteriocin produced by *Enterococcus mundtii* isolated from *Odontesthes platensis*. *Food Sci Technol*, 64, 794-801.
- Seo, S.H., Jung, M., Kim, W.J. (2014). Antilisterial and amylasesensitive bacteriocin producing *Enterococcus faecium* SH01 from Mukeunji, a Korean over-ripened kimchi. *Food Sci Biotechnol*, 23, 1177-1184.
- Settanni, L., Guarcello, R., Gaglio, R., Francesco, N., Aleo, A., Felis, G.E., Moschetti, G. (2014). Production, stability, gene sequencing and in situ anti-*Listeria* activity of mundtisin KS expressed by three *Enterococcus mundtii* strains. *Food Control*, 35, 311-322.
- Strompfová, V., Lauková, A. (2007). *In vitro* study on bacteriocin production of *Enterococci* associated with chickens. *Anaerobe*, 13, 228-237.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. (2005). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentasacens* ST18 isolated from Boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochem*, 40, 365-370.
- Tuncer, M., Özden Tuncer, B., Tuncer, Y. (2014). Çiğ süttten izole edilen enterosin B üreticisi *Enterococcus faecalis* MYE58 suşunun güvenlik değerlendirmesi. *GIDA*, 39(5), 275-282.
- Tuncer, Y., Özden, B. (2010). Partial biochemical characterization of nisin-like bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YBD11 isolated from boza, a traditional fermented Turkish beverage. *Rom Biotechnol Lett*, 15, 4940-4948.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J., Venema, G. (1989). Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl Environ Microbiol*, 55, 1187-1191.
- Yousif, N.M.K., Dawyndt, P., Abriouel, H., Wijaya, A., Schillinger, U., Vancanneyt, M., Swings, J., Dirar, H.A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P. (2005). Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from "Hussuwa", an African fermented sorghum product. *J Appl Microbiol*, 96, 216-228.
- Zendo, T., Eunggruttanagorn, N., Fujioka, S., Tashiro, Y., Nomura, K., Sera, Y., Kobayashi, G., Nakayama, J., Ishizaki, A., Sonomoto, K. (2005). Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU2 isolated from soybean. *J Appl Microbiol*, 99, 1181-1190.