



Bursa Bölgesinden Toplanan Ekşi Mayalardan Elde Edilen Enterokok İzolatlarının Gıda Güvenliği ve Fonksiyonel Karakterizasyonu^A

Özen SÖKMEN^{1*}, Gamze DÜVEN², Mustafa AY³, Sine ÖZMEN TOĞAY¹

Öz: Bu çalışmada Bursa bölgesinden toplanan 30 adet ekşi mayadan izole edilen enterokokların gıda güvenliği ve fonksiyonel karakteristiğinin belirlenmesi amacıyla örneklerden elde edilen izolatların antibiyotik direnç ve antimikrobiyal aktivitesinin tespiti, virülens gen ve antibiyotik direnç genlerinin aranması, düşük pH ve safraya karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada, ekşi maya örneklerinden toplam 178 adet laktik asit bakteri suşu izole edilmiş ve bunların 7 tanesinin enterokok cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Bu suşların test bakterilerine (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus aureus* 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* M74, *Streptococcus pyogenes* ATCC 6538, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111) karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiş ve virülans (*agg*, *gelE*, *cylM*, *cylB*, *cylA*) ve antibiyotik direnç genlerini (*vanA*, *vanB*, *tetM*, *ermB*, *aac(6')-aph(2'')-la*) taşıma açısından güvenli bulunmuştur. İzolatların düşük pH ve safra direnç özelliklerinin incelendiğinde, pH 4' de 3. saatin sonunda canlılıklarını koruduklarını fakat pH 2 ve pH 3' de 3. saatin sonunda enterokokların canlı kalamadığı tespit

^A Yapılan bu çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir. Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) FHIZ-2022-1160 No'lu proje ile desteklenmiştir. Makale araştırma ve yayın etiğine uygun olarak hazırlanmıştır.

* **Sorumlu yazar/Corresponding Author:** ¹Ozen Sokmen, Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye, ozensokmen@gmail.com, [OrcID 0000-0002-2126-094X](https://orcid.org/0000-0002-2126-094X)

¹ Sine Özmen Toğay, Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye, sinetogay@uludag.edu.tr, [OrcID 0000-0002-8851-1803](https://orcid.org/0000-0002-8851-1803)

² Gamze Duven, Bursa Uludağ Üniversitesi, Karacabey Meslek Yüksekokulu, Bursa, Türkiye, gamzeduven@uludag.edu.tr, [OrcID 0000-0001-7418-5384](https://orcid.org/0000-0001-7418-5384)

³ Mustafa Ay, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Gıda Teknolojisi Bölümü, Çanakkale, Türkiye, maya@comu.edu.tr, [OrcID 0000-0002-1765-4858](https://orcid.org/0000-0002-1765-4858)

edilmiştir. %0.5 (w/v) safra derişimine direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları incelendiğinde 24. saatin sonunda 6.2-7.4 log-kob/g düzeylerinde canlı kaldıkları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ekşi maya, enterokok, antibiyotik direnç, virülens gen, antimikrobiyal aktivite, pH ve safra direnci.

Food Safety and Functional Characterization of Enterococci Strains Isolated from Sourdough Collected from Bursa Region

Abstract: In this study, the antibiotic resistance and antimicrobial activity of isolates obtained from 30 sourdough samples collected from the Bursa region were examined to determine the food safety and functional characteristics of the enterococci isolated from these samples. Additionally, the presence of virulence genes and antibiotic resistance genes, as well as resistance to low pH and bile, were investigated. A total of 178 lactic acid bacterial strains were isolated from the sourdough samples, and seven of these were identified as belonging to the *Enterococcus* genus. These strains exhibited antimicrobial activity against test bacteria (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus aureus* 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* M74, *Streptococcus pyogenes* ATCC 6538, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111) and were found to be safe in terms of carrying virulence (*agg*, *gelE*, *cylM*, *cylB*, *cylA*) and antibiotic resistance genes (*vanA*, *vanB*, *tetM*, *ermB*, *aac(6')-aph(2'')-la*). When the isolates' resistance to low pH and bile was examined, it was found that they remained viable at pH 4 after 3 hours, but did not survive at pH 2 and pH 3 after 3 hours. When examining their resistance to 0.5% (w/v) bile concentration, it was determined that they remained viable at levels of 6.2-7.4 log CFU/g after 24 hours.

Keywords: Sourdough, enterococcus, antibiotic resistance, virulence genes, antimicrobial activity, survival at pH and bile salt.

Giriş

Ekşi maya, yaklaşık 5000 yıldır kullanılan, buğday unu ve su karışımının laktik asit bakterileri (LAB) ve mayalar tarafından fermente edilmesiyle elde edilen bir üründür. Ekşi maya, farklı oranlarda ve bileşimlerde homo- ve heterofermentatif LAB'ler ile mayalar içermektedir. Homofermentatif LAB'ler şekeri fermente ederek laktik asit üretirken, heterofermentatif LAB'ler ise laktik asidin yanı sıra önemli miktarda CO₂, etil alkol, asetik asit ve diğer uçucu bileşenleri de üretir (Bakırcı ve Köse, 2017).

Laktik asit bakterileri grubunda yer alan enterokoklar insan ve hayvanların sindirim sisteminde doğal olarak bulunmaktadır. İnsan bağırsağında *Enterococcus faecalis* baskın olmakla birlikte bazı bireylerde ve bazı ülkelerde *Enterococcus faecium* sayıca üstün gelmektedir. Enterokoklar sadece sıcak kanlı hayvanlarda değil, toprak, yüzey suları, bitkiler, sebzeler ve böceklerde de bulunmaktadır (Franz ve ark., 1999; Franz ve ark., 2003; Foulquie Moreno ve ark., 2006). Ekşi mayadan izole edilen *Enterococcus faecium* YF5 suşunun güvenliği ve probiyotik potansiyeli incelendiğinde, toksik olmadığı ve amoksisilin, vankomisin ve kloramfenikole duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Düşük pH, safra tuzları, mide ve bağırsak sıvılarında stabil kaldığı ve insan kolon kanseri hücre hattına yapıştığı gözlenmiştir. Patojenik organizmaların çoğunu inhibe ettiği, bu nedenle *Enterococcus faecium* YF5 güvenli bir suş olarak probiyotik veya mikroekolojik ürünlerde kullanılabilirliği ifade edilmektedir (Tan ve ark., 2013). Enterokoklar, proteolitik ve lipolitik aktiviteleri ile diasetil gibi önemli uçucu bileşikler üretme yetenekleri sayesinde fermente gıdalarda büyük önem taşır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, enterokokların starter ve yardımcı kültür olarak kullanımının arttığını göstermektedir (Sarantinopoulos ve ark., 2001; Hugas ve ark., 2003; Foulquie Moreno ve ark., 2006). Enterokoklar bazı ülkelerde probiyotik olarak da kullanılmaktadır (Franz ve ark., 1999; Franz ve ark., 2003; Foulquie Moreno ve ark., 2006). Ancak enterokokların özellikle de *Enterococcus faecium* ve *E. faecalis*'in bazı suşlarının fırsatçı patojen olduğu bilindiğinden bu bakterilerin probiyotik olarak kullanımı tartışma konusudur. Enterokoklar, bazı suşlarının faydalı etkileri bilinmesine rağmen, hastane ortamında enfeksiyonlara neden olan önemli patojenlerdir. Bakteriyemi, endokardit, üriner sistem enfeksiyonları ve diğer doku enfeksiyonlarına yol açabilirler. Ayrıca, enterokoklar antibiyotiklere karşı artan direnç göstermektedir. Bu durum, hastane ortamında hayatta kalmalarını ve dirençli suşların yayılmasını kolaylaştırmaktadır.

Yapılan çalışmalarda probiyotik olarak kullanılan suşların dahi antibiyotiklere dirençli olabileceği, bu sebeple gıdalarda kullanılan yardımcı ya da starter enterokok kültürlerinin suş spesifikliği göz önüne alınarak kazanılmış antibiyotik dirençliliği yönünden güvenli olup olmadığının kontrol edilmesinin gereği üzerinde durulmaktadır (Franz ve ark., 1999; Klein, 2003; Peters ve ark., 2003; Foulquie Moreno ve ark., 2006; Valenzuela ve ark., 2010). Enterokoklar, sadece antibiyotiklere karşı dirençleri ile değil, aynı zamanda virülens faktörleri ile de hastalığa neden olan patojenlerdir. Bu bakterilerin enfeksiyona yol açabilmeleri için konakçı dokuda yerleşebilmeleri, konakçının savunma sistemine karşı direnç gösterebilmeleri ve dokularda hasara yol açabilecek patolojik değişikliklere neden olabilmeleri gereklidir (Franz ve ark., 1999). Virülens faktörü, mikroorganizmaların hastalık oluşturabilme yeteneğini arttıran efektör moleküllerdir. Sitolizin, agregasyon materyalleri, jelatinaz, ekstraselüler yüzey proteini bunlara tipik örneklerdir (Foulquie Moreno ve ark., 2006). Enterokokların virulenslikle ilgili bazı genlerinin (*agg*, *geE*, *cyIM*, *cyIB*, *cyIA*, *espsf*, *espfm*, *efaAfs*, *efaAfm*, *cpd*, *cop*, *ccf*, *cad*) patojenlikteki fonksiyonları aşağıda açıklanmıştır (Eaton ve Gasson, 2001; Reviriego ve ark., 2005):

- *agg*: Hücre agregasyonu ve konjugasyon, ökaryotik hücrelere tutunmada görevli agregasyon proteininin sentezi.
- *geE*: Jelatin, kollajen, hemoglobin ve diğer biyoaktif bileşikler hidrolize eden toksik ekstraselüler metalloendopeptidaz enziminin sentezi.

- *cyM*: Gram-pozitif bakteriler ile ökaryotik hücreleri hidrolize eden sitolizinin (hemolizin/bakteriyosin) translasyon sonrası modifikasyonu.
- *cyB*: Sitolizinin transportu
- *cyA*: Sitolizinin aktivasyonu

Gıda ve klinik ortamlardan izole edilen enterokokların antibiyotik direnç ve virülens gen profilleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Franz ve ark., 1999; Eaton ve Gasson, 2001; Hugas ve ark., 2003; Reviriego ve ark., 2005; Foulque Moreno ve ark., 2006; Aslam ve ark., 2012; Oladipo ve ark., 2014; Hammad ve ark., 2015; Pieniz ve ark., 2015). Buna karşın, ekşi maya kaynaklı enterokok izolatlarının antibiyotik direnç ve virülens gen profilleri ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır (Tan ve ark., 2013). Laktik asit bakterileri, *Listeria* spp. gibi patojen ve gıda bozulma etkeni Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip bakteriyosinler üreterek antimikrobiyal koruma sağlayabilmektedir (Harris ve ark., 1989; Leroy ve ark., 2002; Coşansu ve ark., 2007; Altuntaş ve ark., 2010). Enterosinler ve bakteriyosin oluşturma özelliğindeki enterokoklar ve diğer laktik asit bakteri suşları geleneksel kimyasal koruyuculara alternatif olarak gıda ürünlerinde patojenlerin kontrolü için kullanılabilir. Antimikrobiyal aktivite potansiyeli, probiyotik özellikteki bakterilerde de aranan bir özelliktir (Hugas ve ark., 2003; Foulque Moreno ve ark., 2006). Geleneksel fermente gıdalar, kendine özgü mikrobiyotalarında önemli fizyolojik özelliklere sahip probiyotik ve fonksiyonel mikroorganizmaları barındırabilmektedir (Bellici ve ark., 2019). Ekşi maya kaynaklı laktik asit bakteri izolatlarının probiyotik potansiyelinin araştırıldığı ulusal ve uluslararası literatürde çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte ekşi maya kaynaklı enterokokların fonksiyonel özelliklerinin ve antibiyotik direnç ve virülens gen varlığı gibi gıda güvenliği yönünden irdelenmesi gerekli önemli özelliklerine ilişkin kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konu ile ilgili yapılan tek çalışmada (Tan ve ark., 2013) ekşi maya kaynaklı bir adet enterokok suşunun probiyotik potansiyeli çeşitli analizlerle değerlendirilmiş ve virülens genlerden *cylA*, *gelE*, *ace*, *agg*, *esp* ve antibiyotik direnç genlerinden de sadece vankomisin direnci kodlayan *vanA* gen varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada aktarılabılır antibiyotik direnç genleri ve virülens genler yönünden çok daha kapsamlı analizler ekşi maya kaynaklı her enterokok suşu için değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada Bursa bölgesinden toplanan ekşi maya örneklerinden elde edilen enterokok izolatlarının gıda endüstrisi ve insan sağlığı açısından bazı fonksiyonel (antimikrobiyal aktivite, safra ve asit direnci) ve gıda güvenliği yönünden önemli özellikleri (antibiyotik direnç genleri ve virülens genlerini taşıma potansiyeli) karakterize edilmiştir. Çalışma sonucunda fonksiyonel kültür potansiyeli bulunan ve gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından güvenli olduğu tespit edilen izolatların, gıda endüstrisinde yeni fonksiyonel ürün geliştirilmesi çalışmalarında kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmada Bursa bölgesinde ticari maya katılmadan üretilen ekşi hamur örnekleri (30 adet) farklı üretim yerlerinden aseptik koşullarda steril kaplara toplanıp soğuk koşullarda muhafaza edilerek Bursa Uludağ Üniversitesine getirilmiştir. Toplanan ekşi hamurların bir kısmı -18°C'de depolanmıştır. Diğer kısmı bir hafta içerisinde analiz edilmek üzere buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir.

Yöntem

Ekşi Maya Hamurlarından Enterokokların İzolasyonu

Ekşi hamur örnekleri öncelikli olarak 25 g tartılarak içinde 225 mL steril serum fizyolojik bulunan stomacher poşetine aseptik şartlar altında aktarılmış ve homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Ardından bu karışımdan 1 mL örnek alınarak %0.85'lik serum fizyolojik ile ondalık seyreltilmeler gerçekleştirilmiştir. Enterokok izolasyonu amacıyla KAA (Kanamycin Azide Aeskuline) agar besiyerine yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmış ve Petri kutuları 30°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda farklı morfolojiye sahip kolonilerden seçilerek MRS agar besiyerinde tek koloni ekim yöntemi ile saf kültür elde edilmiştir. Saf kültürlerle Gram boyama ve katalaz testleri uygulanmıştır, Gram pozitif, katalaz negatif bakteriler gliserol (%30), ve MRS broth içeren tüplerde -80°C'de muhafaza edilmiştir.

İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Enterokok izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi amacıyla *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus aureus* 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* M74, *Streptococcus pyogenes* ATCC 6538, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 bazı bakteri türlerinin referans suşları kullanılmıştır. İzolatların aktifleştirilmesinde ve antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde MRS broth ve MRS agar, test bakterileri için ise NA (Nutrient Agar) ve NB (Nutrient Broth) besiyerleri kullanılmıştır. İzolatların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için "agar damlatma" tekniği uygulanmıştır (Harris ve ark., 1989; Saavedra ve ark., 2003; Hajikhani ve ark., 2007; Bağcı ve ark., 2019).

-Agar Damlatma Testi: Antimikrobiyal etki spektrumları belirlenecek olan izolatların 24 saatlik sıvı kültürlerinden, MRS agar besiyerine damla şeklinde 2 µL inokule edilmiştir. Petri kutuları daha sonra 30°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. NA besiyerinde 37°C'de 24 saat aktifleştirilmiş test bakterisi kültürlerinden %0.75 agar içeren 10 mL NA besiyerine 10 µL miktarda eklenip karıştırılmış ve bu karışım NA besiyerinde geliştirilen

damlatma kültürlerin üzerine dökülmüştür. Petri kutuları daha sonra 37°C'de 24 saat daha inkübe edilmiştir. LAB izolatlarının test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri, inkübasyon sonunda damlatma kültürler etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonları yönüyle değerlendirilmiştir.

İzolatların Antibiyotik Direnç Genlerini Taşıma Durumlarının Araştırılması

İzolatların taşıyabileceği kazanılmış antibiyotik (vankomisin, tetrasiklin, eritromisin, gentamisin) direnç genleri (sırasıyla *vanA*, *vanB*, *tetM*, *ermB*, *aac(6')-aph(2'')-la*) Çataloluk ve Gögebakan (2004) ile Ouoba ve ark., (2008) tarafından belirtilen primerler (Çizelge 1) ve yöntemler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği ile genotipik olarak belirlenmiştir.

İzolatların Virülens Gen Taşıma Potansiyellerinin Araştırılması

Elde edilen enterokok izolatlarının virülens genlerini (*agg*, *gelE*, *cylM*, *cylB*, *cylA*) taşıma potansiyelleri Reviriego ve ark. (2005) tarafından uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) protokolü kullanılarak (Çizelge 1) belirlenmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Reviriego ve ark., 2005).

Çizelge 1. Virülans ve antibiyotik direnç genleri için primerler

Gen	Primer Dizisi (5'-3')	Ürün Boyutu (bp)
<i>agg2</i>	F-5' GTT GTT TTA GCA ATG GGG TAT R-5' TCC TGT CAC TCC TCT TCT CAG	1210
<i>gelE</i>	F-5' ACC CCG TAT CAT TGG TTT R-5' ACG CAT TGC TTT TCC ATC	419
<i>cylM</i>	F-5' TGC TTC TCC ACT GTG ACC T R-5' ATC TAG TAA ATG TTA AGA AAT ACA	742
<i>cylB</i>	F-5' TGG AAG CAT TAC TTC CAG CT R-5' AAC TGC AAC CTC AAG ATT GG	843
<i>cylA</i>	F-5' AAT CCT ATC GGT TAC TGC TTA R-5' AGC ATC ACA ACC ATC CTA AC	517
<i>vanA</i>	F-5' GTA CAA TGC GGC CGT TA R-5' GGG ACA GTT ACA ATT GC	732
<i>vanB</i>	F-5' GTG CTG CGA GAT ACC ACA GA R-5' CGA ACA CCA TGC AAC ATT TC	1145
<i>tetM</i>	F-5' GTT AAA TAG TGT TCT TGG AG R-5' CTA AGA TAT GGC TCT AAC AA	657
<i>aac(6')-aph(2'')-la</i>	F-5' GAG CAA TAA GGG CAT ACC AAA AAT C R-5' CCG TGC ATT TGT CTT AAA AAA CTG G	505
<i>ermB</i>	F-5' CAT TTA ACG ACG AAA CTG GC R-5' GGA ACA TCT GTG GTA TGG CG	425

İzolatların Düşük pH ve Safra Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Düşük pH'ya karşı direnç özellikleri sadece antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenen izolatlar uygulanmış ve düşük pH'ya karşı direnç özelliği pH 2.0, 3.0 ve 4.0'te belirlenmiştir. Çalışılan izolatlar 5000g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet iki kez PBS tamponu ile yıkandıktan sonra orijinal hacmine PBS tamponu ile tamamlanmış ve homojen bir süspansiyon elde edilene kadar karıştırılmıştır. Çalışmada, 1 N steril HCl çözeltisi kullanılarak pH 2.0, 3.0 ve 4.0'e ayarlanarak, 50 mL steril serum fizyolojik çözeltisi içerisine enterokok izolat süspansiyonlarının %2 (v/v) oranında inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. İnoküle edilen örnekler daha sonra 37°C'de 1 ve 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0., 1. ve 3. saatlerinde her bir örnekten 1 mL alınıp seri seyreltmeleri yapılarak MRS agar besiyerine, dökme plak yöntemiyle ekimleri gerçekleştirilmiş ve 37 °C'de 48-72 saat, inkübe edilen Petri kutularından sayım sonuçları alınmıştır. Kontrol amacıyla enterokok süspansiyonlarından %2 (v/v) oranında steril serum fizyolojik (pH 6.5) içine inoküle edilip 37°C'deki inkübasyonun 0., 1. ve 3. saatlerinde yukarıda sözü edilen şekilde ekimler yapıp sayım sonucu alınmıştır. (Lian ve ark., 2003; Şener, 2009; Bağcı ve ark., 2019).

Bu çalışmada, enterokok izolatlarının safra direnci araştırılmıştır. Bu amaçla, %0.5 safra konsantrasyonuna karşı dirençli olup olmadıkları test edilmiştir. İlk olarak, izolatlar 10 ml MRS broth besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Oluşan kültürler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve bakteri hücreleri 7 ml steril serum fizyolojisi ile süspansiyon edilmiştir. Suşların safra direnci, %0.5 (w/v) safra (Oxgall, Merck) konsantrasyonu içeren steril bir çözeltiye %2 (v/v) oranında inokülasyon yapılarak test edilmiştir. Çözelti, 121°C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir. İnokulasyondan sonra örnekler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 0., 6. ve 24. saatlerde her örnekten 1 ml alınarak seri seyreltmeler yapılmış ve MRS agar besiyerine ekilmiştir. Koloniler 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra sayılmıştır. Her suş için kontrol olarak, bakteri süspansiyonundan %2 (v/v) oranında steril serum fizyolojisine inokülasyon yapılarak 0., 6. ve 24. saatlerde ekim ve sayım işlemi tekrarlanmıştır. Çalışma iki tekrarlı olarak yürütülmüştür (Lian ve ark., 2003; Şener ve Temiz, 2008; Şener, 2009).

Bulgular ve Tartışma

Çalışma kapsamında KAA besiyerlerinden izole edilerek Gram boyama ve katalaz reaksiyonu ve mikroskopik morfoloji değerlendirmesi sonucunda enterokok şüpheli olarak değerlendirilip gliserol stoğuna alınan ve antimikrobiyal aktivite özellikleri değerlendirilen izolatlar ilişkin sonuçlar Çizelge 2'de verilmektedir. Buna göre 7 adet enterokok şüpheli izolatında referans test bakterilerine (*Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *E.coli* ATCC 25922, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus aureus* 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* M74, *Streptococcus pyogenes* ATCC 6538, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111) karşı 8 mm ile 13 mm arasında antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir.

Tan ve ark. (2013)'nin yaptıkları çalışmada, ekşi hamurdan izole edilen *Enterococcus faecium* YF5 suşu güvenlik ve probiyotik potansiyeli açısından değerlendirilmiştir. Patojen organizmalarla (*Enterobacter sakazakii* CMCC45402, *Escherichia coli* CMCC44102, enterohemorajik *Escherichia coli* O157: H7 CMCC44828, *Salmonella Typhimurium* CMCC50071, *Shigella flexneri* 301 ve *Shigella sonnei* ATCC 29930) ve 2 gram-pozitif suşla (*Listeria monocytogenes* CMCC54001 ve *Staphylococcus aureus* CMCC 26003) birlikte kültürlendiğinde, *S. aureus* dışında bu gıda kaynaklı patojenleri engellediği tespit edilmiş, bu nedenle, *Enterococcus faecium* YF5 güvenli bir suş olarak değerlendirilmiştir. Sáez ve ark. (2018) Arjantin bölgesinden ekşi mayalı nohuttan izole edilen *Enterococcus durans* CRL2194 suşunun *Escherichia coli*, *B. cereus* patojenlerine karşı antimikrobiyal etkili olduğu tespit edilmiştir. Salvucc ve ark. (2016) Arjantin pazarlarından tahıllar ve tohumlardan izole ettiği *E. mundtii* ES151 ve ES198 ile *Enterococcus faecium* ES194, ES195 ve ES216 suşlarının *Listeria* ve *Pediococcus*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmiştir. Nespolo ve Brandelli (2010)'nin yaptıkları çalışmada koyun sütü ürünlerinin LAB'larında *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'e karşı inhibisyon zon çapının, 6.5 ila 10.5 mm arasında değiştiği belirtilmiştir. (Nespolo ve Brandelli, 2010). Bir başka çalışmada spontan olarak fermente edilmiş sığır sütünün %15.01'i (n=56), *Listeria monocytogenes*'e karşı 1-4 mm arasında zon çapları göstermiştir (Akabanda ve ark., 2014). Tuncer ve ark. (2008)'nin Isparta, Antalya, İstanbul ve Ankara illerinden temin ettikleri boza örneklerinde (15 adet) yapılan çalışmada, izole edilen toplam 30 adet laktik asit bakterisi içerisinde, 6 adedi antibakteriyel (*Listeria innocua* LMG 2813, *Bacillus cereus* LMG 2732, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* LMG 2708, *Enterococcus faecalis* LMG 2602, *Staphylococcus aureus* LMG 3022, *Staphylococcus carnosus* LMG 2709 ve *Pediococcus pentosaceus* LMG 2001 karşı) madde üretme yeteneğinde bulunmuştur. Çalışma kapsamında, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus aureus* 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* M74, *Streptococcus pyogenes* ATCC 6538, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 patojenlerine karşı inhibisyon çapı, 1.5 ila 4 mm arasında değişmektedir.

Tan ve ark. (2013)'nin ekşi hamurdan izole ettikleri *Enterococcus faecium* YF5 suşunun virülans ve antibiyotik dirençli fenotipleri (sitolizin ve jelatinaz üretimi, antibiyotik duyarlılığı) ve genleri (*cylA*, *gelE*, *ace*, *agg*, *esp* ve *vanA*) incelenmiştir. 6 virülans ve antibiyotik direnç geninin (*cylA*, *gelE*, *ace*, *agg*, *esp*, *vanA*) hiçbirine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *Enterococcus faecium* YF5'in virülans fenotipleri ve antibiyotiğe dirençli genler taşımadığını göstermiştir. Bu nedenle, *Enterococcus faecium* YF5'in probiyotik ve mikrobiyolojik olarak güvenli olduğu sonucuna varılmıştır.

Yangılar ve ark. (2023) yaptıkları çalışmada, farklı maya hammaddeleri kullanılarak üretilen kara sakı elma sirkelerinin çeşitli patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi belirlenmiş ve genel olarak tüm sirke örneklerinin antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. En güçlü antibakteriyel etkinin ticari sirke örneğinde olduğu, en zayıf etkinin ise %0.3 *Saccharomyces cerevisiae* içeren sirke örneğinde görüldüğü bulunmuştur. Ayrıca, *Escherichia coli* ATCC 8739 suşuna karşı en düşük MIC değerini gösteren organik ev sirkesi olmuştur.

Bursa Bölgesinden elde edilen ekşi maya kaynaklı enterokok izolatlarının virulens gen ve antibiyotik direnç genleri yönüyle negatif bulunduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, ekşi maya kaynaklı enterokok izolatlarının test edilen virülens genler ve antibiyotik direnç genleri yönüyle güvenli olduklarını ortaya koymaktadır.

Çizelge 2. İzolatların, Gram boyama, katalaz, mikroskopik morfolojive antimikrobiyal (mm) aktivite sonuçları

Kodu	Gram boyama	Katalaz	Morfoloji	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<i>Streptococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Enterococcus faecium</i> M74	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 6538	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111
23K1	+	-	Kok	9.8	10.4	9.6	10.2	11	8.8	12	9.8	9.4
23K2	+	-	Kok	8.4	8.8	8.6	11.8	10.8	9.4	9.4	8.8	8.4
23K3	+	-	Kok	9.6	10	10.2	13	12.4	10.2	11.6	9.6	9.4
23K4	+	-	Diplokok	9.2	10.2	10.2	11.6	11.8	9.6	10.6	10.2	10.4
23K5	+	-	Kok	8.8	8	9.2	8.4	10.4	9	10	9.2	8.8
24K1	+	-	Kok	9	10	8.8	9	11	9.2	10.4	9.4	11
24K2	+	-	Kok	9.4	10.4	10.4	9.6	12	10	11	13	10.4

*23K1: 23 numaralı ekşi hamur/enterokok (k)/ 1.koloni +: Pozitif -: Negatif

Fermente gıdalarda kullanılan LAB, doğal probiyotiklerin büyük bir kaynağıdır çünkü bunların genellikle güvenli ve konakçıya faydalı olduğu düşünülmektedir. Ancak bazı LAB'lerin, özellikle de *Enterococcus*'un virülans genleri barındırabildiğini bildiren çeşitli araştırmalar mevcuttur (Weckx ve ark., 2009; Toğay, 2010; Leisner ve ark., 2011). Bu nedenle güvenlik değerlendirmesi önemli bir kriterdir ve potansiyel probiyotik türlerinin seçiminde ilk adımdır. Ek olarak, bakteri suşlarının probiyotik potansiyelini değerlendirmek için, virülans genlerinin bulunmaması, safra tuzlarında, mide ve bağırsak sıvılarında hayatta kalma yeteneği, bağırsak hücrelerine yapışma yeteneği, gıda bozucu bakterileri içeren geniş bir inhibitör spektrumda olması ve antibiyotik duyarlılığı gibi bazı temel özelliklerin dikkate alınması gerekmektedir (Corsetti ve ark., 2007; Nueno-Palop ve Narbad, 2011).

Çizelge 3'te suşların düşük pH ortamına direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları verilmiş, test edilen üç suşun da pH 2 ortamında 1. ve 3. saatin sonunda canlı kalamadıkları, pH 3 ortamında ise 23K4, 24K1, 24K2 izolatlarının canlı bakteri sayısında 1. saat sonunda sırasıyla 3.2-3.3-2.8 log birimlik azalma olurken, 3. saat sonunda canlılıklarının tamamen kaybedildiği görülmüştür. İzolatlar pH 4 ortamında canlılıklarını korumuşlardır.

Toğay (2010) tarafından yapılan "Doğal fermente gıdalardan ve anne sütünden enterokok izolasyonları, karakterizasyonları ve probiyotik kültür olarak kullanılma potansiyelleri" adlı çalışmada, üç enterokok suşunun pH 2 ortamında 1. ve 3. saatlerde canlılığını yitirdiği gözlemlenmiştir. pH 3 ortamında ise *Enterococcus faecium* S1-5 izolatının canlı bakteri sayısı 3. saatte 5.6 log birim azalırken, *Enterococcus faecium* M74 kontrol suşunun sayısı 1. saatte 4.5 log birim azalmış ve 3. saatte tamamen canlılığını kaybetmiştir. Probiyotik kontrol suşu *L.*

acidophilus ATCC 4356 ise pH 3 ortamına en dirençli suş olmuş ve 3. saatte 2.1 log birimlik bir azalma göstermiştir. Her üç suşun da pH 4 ortamında 3 saat boyunca canlılığını koruduğu belirlenmiştir.

Tan ve ark. (2013)'nin yaptıkları çalışmada, ekşi hamurdan izole edilen *Enterococcus faecium* YF5 suşunun düşük pH, safra tuzları, gastrik ve intestinal sıvılarda *in vitro* ortamda stabil bir şekilde hayatta kaldığı bulunmuştur. Onur ve Önlü (2022) farklı gıda kaynaklarından (peynir, kaşar, sucuk) izole ettiği enterekokların düşük pH denemeleri sonucunda pH 2 birinci saat sonunda 3 farklı izolatin canlılığını koruduğu buna karşın 3. saat sonunda tüm suşların canlılığını kaybettiği tespit edilmiştir. pH 3 testlerinde ise 3. saat sonunda tüm suşların canlılığını kaybettiği, pH 4 testlerinde ise en az canlılık gösteren suşun 24K2 numaralı izolat olduğu en fazla canlılık oranının ise 23K4 numaralı izolatta görüldüğü tespit edilmiştir. Probiyotik bakterilerin düşük pH ve safra tuzlarına karşı direnci büyük ölçüde türe bağlıdır (Muñoz-Quezada ve ark., 2013).

Çizelge 3. Suşların düşük pH ortamına direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları [log (kob/mL)]

Kodu	Canlı hücre sayısı [log (kob/mL)]*											
	pH 2			pH 3			pH 4			Kontrol (pH 6.5)		
	0.saat	1.saat	3.saat	0.saat	1.saat	3.saat	0.saat	1.saat	3.saat	0.saat	1.saat	3.saat
23K4	7.6±0.15	< 1	< 1	7.6±0.12	4.4±0	< 1	7.6±0	7.5±0.19	7.5±0	7.6±0.24	7.5±0.15	7.6±0.12
24K1	7.0±0.04	< 1	< 1	7.0±0.10	3.7±0.15	< 1	7.0±0.07	7.0±0.08	7.1±0	7.1±0.14	7.0±0	7.0±0.21
24K2	6.3±0	< 1	< 1	6.3±0.05	3.5±0.7	< 1	6.3±0.35	6.3±0.16	6.3±0.12	6.3±0.08	6.4±0.04	6.4±0

* Sayılar iki tekrar çalışmanın ortalamasıdır

Çizelge 4'te suşların %0.5 (w/v) safra derişimine direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları verilmiştir. Buna göre üç bakteri suşunun safra asidine karşı direnci incelendiğinde, 23K4, 24K1, 24K2 suşlarının %0.5 (w/v) safra konsantrasyonuna dirençli olduğu ve suşlardaki canlı bakteri sayısının, safra içinde 6 veya 24 saatlik inkübasyon sonrası önemli ölçüde azalmadığı görülmüştür.

Sakandar ve ark. (2019) ferment edilmiş ekşi hamurdan (Khamir) potansiyel probiyotik suşlar olan gluten parçalayan *Enterococcus mundtii* ve *Wickerhamomyces anomalus*'un izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirmiştir. *E. mundtii* QAUSD01, %0.4'lük bir safra tuzu konsantrasyonunda hayatta kalma yeteneğini en yüksek sergilerken, *E. faecalis* QAUSD04, bahsedilen suşla arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. *E. faecalis* QAUSD02, *B. megaterium* QAUSD03, *E. faecalis* QAUSD05 ve *E. faecalis* QAUSD06'nın suşlarında canlı hücre sayısında anlamlı bir azalma söz konusu olmamıştır (Nueno-Palop ve Narbad, 2011). Toğay (2010)'ın yaptığı çalışmada, *L. acidophilus* ATCC 4356 suşu safra asinine çok dirençli olmadığı ve safra içinde 6 saat sonra 3.4 log birim azaldığı, 24 saat sonra 2.3 log birim azaldığı belirtilmiştir. *Enterococcus faecium* M74 ve *L. acidophilus* ATCC 4356 suşlarının kontrol grup çalışmalarında da 24 saatlik inkübasyon sonrası canlı bakteri sayısında azalma görülmüştür. Bu azalma, *Enterococcus faecium* M74 suşu için 2 log birim ve *L. acidophilus* ATCC 4356 suşu için 3.3 log birim olarak belirtilmiştir. Onur ve Önlü (2022)'nin yaptıkları çalışmada safra tuzuna karşı direncin belirlenmesi için yapılan testler sonucunda tüm suşların safra tuzlarına karşı canlılıklarını (4 log kob/mL ile 10 log kob/mL arasında) koruduğu görülmüştür.

Safra tuzu toleransı, probiyotik suşların değerlendirilmesinde önemli bir kriterdir, çünkü bu suşların insan bağırsak ortamında canlı kalma yeteneklerini belirlemektedir.

Çizelge 4. Suşların %0.5 (w/v) safra derişimine direnç özelliklerini gösteren sayım sonuçları [log (kob/mL)]

Kodu	Canlı hücre sayısı [log (kob/mL)]*					
	Safra (% 0.5)			Kontrol		
	0.saat	6.saat	24.saat	0.saat	6.saat	24.saat
23K4	7.7±0.11	7.5±0	7.4±0.03	7.6±0.24	7.5±0.08	7.6±0
24K1	7.0±0	6.7±0.19	6.6±0.13	7.0±0.1	7.0±0	7.0±0.09
24K2	6.4±0.08	6.4±0.02	6.2±0.2	6.3±0.15	6.3±0.1	6.2±0.08

Sonuç

Fermente gıda ürünleri, endüstride teknolojik ve besinsel özellikleri geliştirme yeteneğine sahip laktik asit bakterisi suşlarının izolasyonu için her zaman zengin bir ortam oluşturmaktadır. Laktik asit bakterilerinin çeşitliliği, sadece tür düzeyinde değil, aynı zamanda suşa bağlı teknolojik özellikler nedeniyle de önemlidir. Çalışmada Bursa bölgesinden temin edilen 30 adet ekşi mayadan izole edilen enterokokların gıda güvenliği ve fonksiyonel karakterizasyonu değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, elde edilen enterokok izolatlarının antimikrobiyal aktivitesinin ve antibiyotik direnç özelliklerinin belirlenmesi, virülens gen ve antibiyotik direnç genlerinin aranması, düşük pH ve safra direnç özelliklerinin belirlenmesi, analizleri yapılmıştır. Enterokok izolatlarının test edilen virülens ve antibiyotik direnç genleri yönüyle negatif bulunduğu ve dolayısıyla güvenli olduğu tespit edilmiştir. İzolatların referans test bakterilerine karşı ise antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca enterokok izolatlarının safra ve asit direnç özellikleri incelenmiş ve izolatların pH 2'de canlı kalamadıkları, ancak pH 3-4 ortamında canlılıklarının 1-3 saat kadar devam edebildiği belirlenmiştir. İzolatların safra direnci özelliğinin ise safra ortamında 24 saat inkübasyona karşın 6 log kob/mL ve üstü düzeyinde canlılığın devam edebildiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, Bursa bölgesi ekşi hamurlarından elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının gıda endüstrisinde probiyotik ve fonksiyonel kültür yönünden kullanılma potansiyeline sahip olabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, izole edilen suşların *in vitro* ortamda probiyotik potansiyel taşıdığını göstermektedir. Fakat, probiyotik olarak kabul edilebilmeleri için daha kapsamlı değerlendirmelere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu izolatların yapılacak ileri çalışmalarla bakteriyosin üretme potansiyellerinin değerlendirilmesi ve elde edilip saflaştırılacak bu bakteriyosin preparatlarının gıda endüstrisinde alternatif koruyucu olarak kullanımının değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir. Araştırma ve yayın etik ilkelerine uygun olarak yürütülmüş ve bu makaleyi hazırlayan yazarlar araştırmaya eşit katkıda bulunmuştur. Yazarlar arasında herhangi bir çıkar

çatışması bulunmamaktadır. Çalışma, FHIZ-2022-1160 No'lu Proje ile Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Kaynakça

- Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Parkouda, C. and Jespersen, L. 2014. The use of lactic acid bacteria starter culture in the production of Nunu, a spontaneously fermented milk product in Ghana. *International Journal of Food Sciences*, 2014(2014): 721067
- Altuntaş, E.G., Ayhan, K., Okcu, G., Erkanlı, K., Balci, M. and Sonakın, S.S. 2010. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria isolated from raw milk and cheese samples. *GIDA - Journal of Food*, 35(3): 197-203.
- Aslam, M., Diarra, M. S., Checkley, S. and Bohaychuk, V. 2012. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3): 222–230.
- Bagci, U., Ozmen Togay, S., Temiz, A. and Ay, M. 2019. Probiotic characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from human milk and colostrum. *Folia Microbiologica*, 64(6): 735–750.
- Bakırcı, F. ve Köse, E. 2017. Ekşi hamurlardan laktik asit bakterileri ve mayaların izolasyonu ve tanımlanması. *Akademik Gıda*, 15(2): 149-154.
- Bellici, A. E., Karasu-Yalcin, S., Eryasar-Orer, K. and Yalçın, E. 2019. MALDI-TOF/TOF mass spectrometry for determination of yeast diversity in traditional cornelian cherry tarhana produced with different cereal/pseudocereal flours. *Annals of Microbiology*, 69, 613-625.
- Corsetti, A., Settanni, L., Valmorri, S., Mastrangelo, M. and Suzzi, G. 2007. Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory-scale fermentations. *Food Microbiology*, 24(6): 592-600.
- Coşansu, S., Kuleaşan, H., Ayhan, K. and Materon, L. A. 2007. Antimicrobial activity and protein profiles of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish “SUCUK”. *Journal of Food Processing and Preservation*, 31: 190-200.
- Eaton, T. J. and Gasson, M. J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4): 1628-1635.
- Foulquie Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1): 1–24.
- Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H. and Stiles, M. E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47(1-2): 1–24.

- Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. and Holzapfel, W. H. 2003. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2-3): 105–122.
- Hajikhani, R., Beyath, Y. ve Aslim, B. 2007. Antimicrobial activity of *Enterococcus* strains isolated from white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 60: 105-108.
- Hammad, A. M., Hassan, H. A. and Shimamoto, T. 2015. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control*, 50: 815-820.
- Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E. and Klaenhammer, T. R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52(6): 384-387.
- Hugas, M., Garriga, M. and Aymerich, M. T. 2003. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3): 223-233.
- Klein, G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3): 123-131.
- Leisner, J., Hansen, M., Larsen, M., Hansen, L., Ingmer, H. and Sørensen, S. 2011. The genome sequence of the lactic acid bacterium, *Carnobacterium maltaromaticum* ATCC 35586 encodes potential virulence factors. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3): 107–115.
- Leroy, F., Verluypen, J., Messens, W. and Vuyst, L. D. 2002. Modelling contributes to the understanding of the different behaviour of bacteriocin-producing strains in a meat environment. *International Dairy Journal*, 12(2-3): 247-253.
- Lian, W., Hsiao, H. and Chou, C. 2003. Viability of microencapsulated *Bifidobacteria* in simulated gastric juice and bile solution. Short communication. *International Journal of Food Microbiology*, 86(3): 293–301.
- Muñoz-Quezada, S., Chenoll, E., Vieites, J. M., Genovés, S., Maldonado, J., Bermúdez-Brito, M., Gomez-Llorente, C., Matencio, E., Bernal, M. J., Romero, F., Suárez, A., Ramón, D. and Gil, A. 2013. Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *British Journal of Nutrition*, 109 Suppl 2, S51–S62.
- Nespolo, C. R. and Brandelli, A. 2010. Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4): 1009-1018.
- Nueno-Palop, C. and Narbad, A. 2011. Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2–3): 390–394.
- Oladipo, I. C., Sanni, A. I. and Swarnakar, S. 2014. Virulence potential of *Enterococcus gallinarum* strains isolated from selected Nigerian traditional fermented foods. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 3(2): 97-104.
- Onur, M. ve Önlü, H. 2022. Farklı Gıda Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi. *European Journal of Science and Technology*, 32, 562 – 572.

- Peters, J., Mac, K., Wishmann-Shauer, H., Klein, G. and Ellerbroek, L. 2003. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 311-314.
- Pieniz, S., de Moura, T. M., Vaz Cassenego, A. P. and reazza, R., Guedes Frazzon, A. P., Flavio Anastacio de Oliveira Camargo, F. A. and Brandelli, A. 2015. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control*, 51, 49-54.
- Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M. J. and Rodríguez, J. M. 2005. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*, 21(2): 131-138.
- Saavedra, L., Taranto, M. P., Sesma, F. and de Valdez, G. F. 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3): 241-245.
- Sález, G. D., Saavedra, L., Hebert, E. M. and Zárate, G. 2018. Identification and biotechnological characterization of lactic acid bacteria isolated from chickpea sourdough in northwestern Argentina. *LWT*, 93, 249-256
- Sakandar, H. A., Hussain, R., Kubow, S., Sadiq, F. A., Huang, W. and Imran, M. 2019. Sourdough bread: A contemporary cereal fermented product. *Journal of Food Processing and Preservation*, 302, 103–113.
- Salvucci, E., LeBlanc, J. G. and Pérez, G. T. 2016. Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 185-191.
- Sarantinopoulos, P. and righetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., ... and Tsakalidou, E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11(8): 621-647.
- Şener, A. 2009. Serbest ve Mikroenkapsüle Probiyotik Bakterilerin Ticari Dondurma Üretiminde Kullanılabilirliği Üzerine Bir Araştırma, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 139s.
- Şener, A. and Temiz, A. 2008. The effects of Certain Prebiotics on the Resistance to Acid, Bile and Cold Storage of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. Presented at the First European Food Congress, Ljubljana, Slovenia.
- Tan, Q., Xu, H., Aguilar, Z. P., Peng, S., Dong, S., Wang, B., Li, P., Chen, T., Xu, F. and Wei, H. 2013. Safety Assessment and Probiotic Evaluation of *Enterococcus Faecium* YF5 Isolated from Sourdough. *Journal of Food Science*, 78, M587-M593.
- Toğay, S. Ö. 2010. Doğal fermente gıdalar ve anne sütünden enterokokların izolasyonu, karakterizasyonu ve bunların probiyotik kültür olarak kullanılabilme potansiyelinin araştırılması. *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(1): 19-25.

- Tuncer, Y., Özden, B. ve Avşaroğlu, M. D. 2008. Bozanın Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin ve Laktik Asit Bakterisi İzolatlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(1): 19-25.
- Valenzuela, A. S., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M. M. and Gálvez, A. 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology*, 27(7): 955-961.
- Weckx, S., Allemeersch, J., Van der Meulen, R., Vrancken, G., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P. and De Vuyst, L. 2009. Development and validation of a species-independent functional gene microarray that targets lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20): 6488-95.
- Yangılar, F., Gülhan, B. and Kılıçgün, H. 2023. Determination of Antimicrobial Properties of Endemic Black Sakı Apple Vinegar Produced by Traditional Method Using Different Yeast Raw Materials. *Bursa Uludag Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 37(1): 79-99.

