





Gıda sistemlerinde etil lauroil arjinat'ın antimikrobiyal aktivitesi, etki mekanizması ve kullanım potansiyeli

Antimicrobial activity, mechanism of effect and usage potential of ethyl lauroyl arginate in food systems

Bahar DEMİRCAN¹ , Özgül ÖZDESTAN OCAK^{2*} 

^{1,2}Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova İzmir, Türkiye.
bahardemircan@gmail.com, ozgulozdestan@gmail.com,

Geliş Tarihi/Received: 03.09.2018, Kabul Tarihi/Accepted: 21.12.2018
* Yazışılan yazar/Corresponding author

doi: 10.5505/pajes.2018.54765
Derleme Makalesi/Research Article

Öz

Etil lauroil arjinat (LAE), yeni gıda katkı maddeleri arasında en güçlü antimikrobiyal maddelerden biri olarak kabul edilen katyonik bir yüzey aktif maddedir. Ayrıca, insan vücudunda doğal bileşenlere hızla metabolize olduğundan toksik olmayan bir katkı maddesi olarak sınıflandırılmış ve gıdalarda kullanımına belirli sınırlamalar getirilerek izin verilmiştir. Antimikrobiyal gıda koruyucu olarak etil lauroil arjinat (LAE) kullanımı sırasıyla Gıda ve İlaç Dairesi ve Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı tarafından onaylanmıştır. Bu nedenle, son yıllarda, bu bileşiğin gıda sistemlerine uygulanmasına odaklanılmıştır. LAE, esterleşme ve yoğunlaşma adımları ile sentezlenen stabil bir bileşiktir. Ayrıca küf, maya, gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler dahil olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalara karşı güçlü antimikrobiyal aktivitesi bulunmaktadır. Katyonik bir yüzey aktif madde olan LAE'nin antimikrobiyal etkisindeki ana hedef hücre zarıdır. LAE'nin antimikrobiyal bir ajan olarak gıdalardaki potansiyel kullanımı geniş bir ürün çeşitliliğini kapsayabilmektedir. Bu bağlamda, ambalajlanmış gıda ürünlerinin güvenliğini ve kalitesini arttırmak amacıyla geliştirilen antimikrobiyal ambalajlama sistemlerinde LAE'nin uygulanması ile ilgili olarak çeşitli çalışmalar yapılmış ve sonucunda ise bu maddenin birçok sistem üzerinde etkili bir antimikrobiyal olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Son yıllarda, LAE'yi bir gıda koruyucu olarak kullanmak için gıdaya doğrudan ekleme, gıda yüzeyine uygulama veya gıda ambalajına dahil edilme gibi çeşitli stratejiler önerilmiştir. Çoğu uygulama tek başına LAE kullanımına ilişkin olmasına rağmen, gıda ürününün raf ömrünü daha da arttırmak için LAE ve diğer koruma yöntemleri arasında bazı kombinasyonlar da kullanılmıştır.

Anahtar kelimeler: Etil lauroil arjinat, LAE, Gıda katkı maddesi, Antimikrobiyal ajan, Antimikrobiyal ambalajlama sistemi

Abstract

Ethyl lauroyl arginate (LAE) is a cationic surfactant considered as one of the strongest antimicrobial material in new food additive. It is also classified as a non-toxic additive because of rapidly metabolized to natural components in the human body and allowed to be used with certain limitations in its use. The use of ethyl lauroyl arginate (LAE) as antimicrobial food preservative has been approved by the Food and Drug Administration and the European Food Safety Agency, respectively. For this reason, in recent years, it has focused on the application of this compound to food systems. LAE is a stable compound synthesized by the steps of esterification and condensation. There is also strong antimicrobial activity against a wide variety of microorganisms including mold, yeast, gram-positive and gram-negative bacteria. The main target for the antimicrobial effect of LAE, a cationic surfactant, the cell membrane. The potential use of LAE as an antimicrobial agent in foods can encompass a wide range of products. In this context, various studies have been carried out on the application of LAE in antimicrobial packaging systems developed with the purpose of increasing the safety and quality of packaged food products and it has been stated that this material can be used as an effective antimicrobial on many systems. In recent years, various strategies have been proposed to use LAE as a food preservative, such as direct addition to food, application to food surface, or inclusion in food packaging. Although most applications are related to the use of LAE alone, some combination treatments have been used between LAE and other conservation methods to further increase the shelf life of the food product.

Keywords: Ethyl lauroyl arginate, LAE, Food additive, Antimicrobial agent, Antimicrobial packaging system

1 Giriş

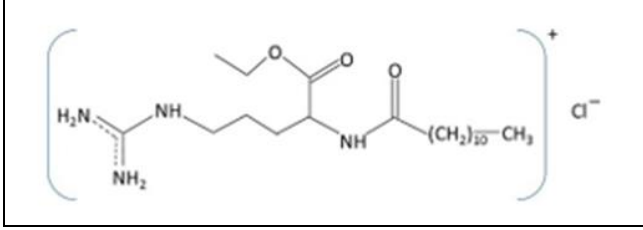
Gıda ürünlerinin hazırlanması, depolanması ve dağıtım sırasında bozulmadan korunması gerekmektedir. Gıdalar bakterilerin, mayaların ve küflerin neden olduğu mikrobiyal kontaminasyon dahil olmak üzere fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçlerin sonucu olarak bozulmaya uğramaktadırlar. Bu değişiklikler gıda ürünlerinde raf ömrünün azalmasına neden olmaktadır. Bu durum da gıdaların güvenliğini azaltmakta ve halk sağlığının güvenliğini tehdit etmektedir [9].

Mikrobiyolojik çoğalmayı inhibe etmek, azaltmak veya istenmeyen mikroorganizmaları inaktive etmek amacıyla antimikrobiyal aktivite gösteren kimyasal ajanların kullanımı en eski ve geleneksel gıda koruma tekniklerinden biridir. Gıdalara özgü antimikrobiyal ajanlar; gıdalarda, gıda ambalajlarında, gıda ile temas eden yüzeylerde ve gıda işleme ortamlarında bulunan veya bunlara ilave edilen, patojenik veya

bozulma etmeni mikroorganizmaları inaktive eden veya büyümesini engelleyen kimyasal bileşikler olarak tanımlanmaktadır [1].

Yeni gıda katkı maddeleri arasında en güçlü antimikrobiyal maddelerden biri olan etil lauroil arjinat (LAE), gıda koruyucu olarak kullanılması önerilen yeni bir bileşiktir. Gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere, küflere ve mayalara karşı geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahiptir. Bileşik, arjininin etanol ile esterleştirilmesinin ardından bu esterin lauroil klorid ile reaksiyona sokulmasıyla sentezlenmektedir [4],[5]. LAE'nin aktif bileşeni etil-N^a-lauroil-L-arjinin HCl'dir ve bu aktif bileşenin nihai üründeki içeriği %85 ile %95 arasındadır. LAE, Laboratorios Miret S.A. (LAMIRSA, İspanya) tarafından beyaz toz formda geliştirilmiş ve üretilmiştir [7]. Bu ürünün hazırlanması ve uygulanması, ES 512643 A1 sayılı İspanya patentinde [2] ve EP 1294678 A1 sayılı Avrupa patentinde [3] tarif edilmiştir.

Etil laurul arjinat (Şekil 1) (etil-N^a-dodekanoil-L-arjinat hidroklorid, LAE, CAS numarası 60372-77-2), ABD'de Gıda ve İlaç İdaresi tarafından (FDA) bazı gıda uygulamaları için onaylanmış ve genel olarak güvenli (GRAS) olarak kabul edilmiş bir katyonik bir yüzey aktif maddedir [4],[5].



Şekil 1: LAE'nin kimyasal yapısı.

LAE, 2005'te gıda güvenliği açısından FDA tarafından gıdada antimikrobiyal ve 2007'de Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından gıda koruyucusu olarak değerlendirilmiştir. Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO), Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'ne (EFSA) ve FDA'ya göre, bu madde etil laurul arjinat HCl, laurik arjinat etil ester, lauramid arjinin etil ester, LAE, INS No. 243, EC No. 434-630-6 ve E243 olarak adlandırılmaktadır [4]-[7].

1.1 Üretimi ve fiziksel/kimyasal özellikleri

Etil laurul arjinat, 50.5-58.0 °C arasındaki sıcaklıklarda eriyen ve 107 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bozulan, molekül ağırlığı 421.02 g/mol olan beyaz higroskopik toz formunda bir maddedir [7]. Polar özelliğinden dolayı suda iyi bir çözünürlüğe (247 g/g üzeri) ve düşük yağ-su denge bölme katsayısına (K_{ow}<0.1) sahip olmasının bir sonucu olarak ürünlerin su fazında yoğunlaşma eğilimi göstermektedir [4],[7]. LAE suda çözünmenin yanı sıra pH değeri 3 ile 5 arasında değişen etanol, propilen glükol ve gliserol çözeltileri içinde de serbestçe çözünme özelliğine sahiptir [5].

LAE, bir esterleşme maddesi olarak tioniol klorid kullanılarak etanol ile L-arjinin monohidroklörürün esterleştirilmesiyle sentezlenmektedir. Oluşan ester daha sonra LAE oluşturulmak üzere sulu bir ortamda laurul klorür ile yoğunlaştırılmaktadır [4],[5]. İki adımlı sentez işlemi ve sonrasında ürünü geri kazanmak amaçlı olan son filtrasyon işlemi içeren bu üretim prosesi İspanyol şirketi olan LAMIRSA tarafından patentlendirilmiştir [7].

Bu filtrasyon aşaması ile %71 ile 81 arasında etil-N^a-lauril-L-arjinat hidroklorid içeren sulu bir hamur elde edilir ve bu karışım kurutmaya tabii tutulduğunda bu oran aktif içerik için %85 ile 95 seviyelerine çıkmaktadır [7]. Gıdalarda kullanılan susuz LAE'nin özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

LAE, ışık geçirmeyen ve hava almayan bir ortamda 25 °C'de (oda sıcaklığında) 1 yıldan fazla stabil kalabilmektedir. Bununla birlikte, çok düşük pH (<1.5) ve yüksek sıcaklık (100 °C'de 5 sa. fazla ve 121 °C'de 1 sa. fazla) ve uzun süreler gibi ağır koşullar altında ürün yapısında bozunmalar meydana gelebilmektedir [7]. Ortaya çıkan bozunma ürünleri ise (LAS, laurik asit, etil laurat, arjinin ve arjinin etil ester) Tablo 1'de listelenen safsızlık ve artık olarak belirtilen toksik olmayan bileşiklerdir.

Bu bileşiğin reaktivitesiyle ilgili olarak LAE'nin anyonik bileşenler ile elektrostatik etkileşimler yoluyla etkileşime girdiği bilinmektedir ve pH>4.5 olan çözeltilerde ve yüksek iyonik güçte çökelme eğilimi göstermektedir [4],[7]. Bu bileşik

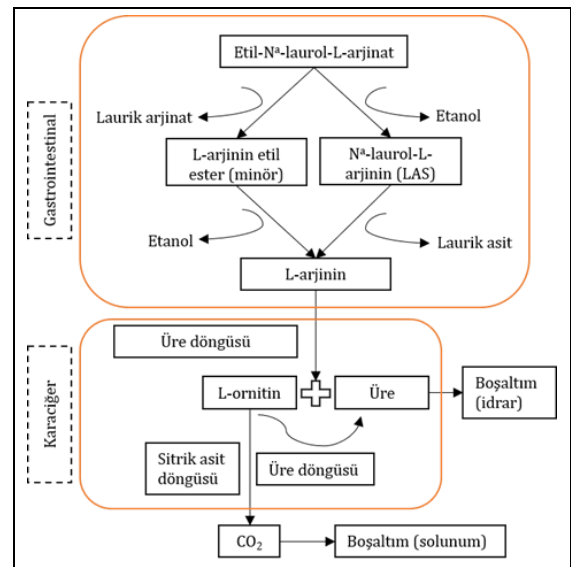
ayrıca nitrit veya proteinlerin varlığında hidroliz işleminden de zarar görebilmektedir [5].

Tablo 1: FDA verilerine göre gıdalarda kullanılabilir LAE'nin özellikleri.

Formülasyon: Bileşenler, Kalıntılar, Kontaminantlar	Yüzde Düzeyler	
Asıl bileşen	Etil-N ^a -lauril-L-arjinat HCl	85-95
	N ^a -lauril-L-arjinin (LAS)	≤3
Diğer ilgili maddeler	Etil laurat	≤3
	Laurik asit	≤5
	Arjinin HCl	≤1
	Etil arjinin 2HCl	≤1
Kalıntılar-uçucu maddeler, çözücüler vb.	Etanol	≤0.2
Kül		≤2
	Su	≤5
Ağır metaller, inorganikler	Ağır metaller	≤10
	Arsenik (As)	≤3
	Kurşun (Pb)	≤1
	Kadmium (Cd)	≤1
	Civa (Hg)	≤1

1.2 LAE'nin metabolizması ve toksikolojik verileri

LAE, insan vücudunda kimyasal ve metabolik yollarla hidrolize olmakta ve doğal bileşenleri olan laurik asit ve L-arjinine hızlı bir şekilde ayrılmaktadır. Bu aşamada açığa çıkan etanol bu bileşenin bilinen düşük toksisitesini vermektedir [4]. Oluşan L-arjinin ayrıca üre döngüsüne girerek ornitin ve üreye dönüşmektedir. Sırasıyla, L-ornitin, üre döngüsünde sitriline veya sitrik asit döngüsünün metabolik bir ara maddesi olan α-ketoglutarata, nihai ürün olarak CO₂ verecek şekilde ayrılmaktadır. Bu nedenle, LAE metabolitlerinin atılımının iki ana yolu, üre şeklinde idrar ve CO₂ şeklinde solunmuş havadır (Şekil 2) [6].



Şekil 2: Sıçanlarda in vivo ve in vitro verilere dayanan LAE'nin transformasyon yolu.

LAE'nin güvenliğine dair birkaç in vitro ve in vivo metabolizma toksikokinetiği çalışmaları; in vitro ve in vivo mutajenite deneyleri; akut, sub-kronik ve kronik toksisite çalışmaları; hayvanlarda üreme ve gelişimsel toksisite çalışmaları ve insan kinetik çalışmaları Ekonomik İş Birliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) ve İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP) yönergelerine göre yapılmıştır [6],[45]. LAE toksisitesi ile ilgili uzun süreli bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Ruckman ve diğ. [45] tarafından LAE'nin toksikolojik verileri üzerine yapılan çalışmalarda akut dermal toksisite ve tahriş verisiyle ilgili olarak, bu bileşiğin deriye duyarlılığının olmadığı, 2000 mg/kg/gün'lük tek bir dermal uygulamanın sistemik bir etki oluşturmadığı, sadece uygulama alanında dermal tahriş olduğu belirtilmiştir. Akut göz tahrişi testi sırasında ciddi yan etkiler ile bu bileşiğin ciddi bir göz irritanı olduğu kanıtlanmıştır. Ek olarak, tavşan derisinde akut dermal toksisite testi sırasında hafif bir dermal irritasyon olduğu da bildirilmiştir.

Etil lauroil arjinatın potansiyel diyet maruziyeti, Birleşik Krallık gıda tüketim verilerine dayanılarak hesaplanmış ve bu bileşiğin önerilen kullanım seviyeleri ile tüm gıda kategorilerinde mevcut olacağı varsayılmıştır. Bu bilgiyi dikkate alarak EFSA paneli, 0,5 mg/kg vücut ağırlığı şeklinde bir kabul edilebilir günlük alım (ADI) oluşturmuştur [6].

1.3 LAE kullanımındaki yasal düzenlemeler

Eylül 2005'te, FDA tarafından LAE'nin 200 mg/kg'a kadar farklı gıda sınıflarında antimikrobiyal ajan olarak değerlendirilmesinin [6] ardından LAE ile ilgili olarak genel olarak güvenli bir bileşik olduğuna dair bildiri yayınlanmıştır [7]. Bu bildirinin hemen ardından, Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) et ve kümes hayvanı ürünlerinde LAE'nin kullanımını onaylamış ve sadece ısı işlem görmüş, marine edilmiş ve kurutulmuş et ürünleri için önerilen maksimum kullanım limitini 2007 yılında 225 mg/kg olarak bildirmiştir [8],[46].

Temmuz 2006'da ve Temmuz 2012'de, Meksika'nın resmi gazetesinde LAE'nin insan tüketimi için gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilen bir madde olduğu yayınlanmıştır [9]. Haziran 2012'de, Avustralya ve Yeni Zelanda Gıda Standartları Kurumu (FSANZ) tarafından ham ve işlenmemiş et içeren sosis ve sosis ürünleri için koruyucu bir gıda katkı maddesi olarak LAE'nin kullanımına izin vermek için hazırlanan bir öneri değerlendirmeye alınmıştır [9].

EFSA, katkı maddesini 2007 yılı Nisan ayında 39. Gıda Katkı ve Kontaminantları Kodeksi Komitesi'nde (CCFAC) olumlu bir görüşle değerlendirmiştir. Temmuz 2013'te, bu gıda koruyucusu için E-243 numarası verilmiştir. Mayıs 2014'te, 506/2014 sayılı yönetmelikte LAE'nin pişmiş et ürünlerinde kullanımı için maksimum 160 mg/kg'lık bir dozaj belirtilmiştir. Ağustos 2014'te, Health Canada'da (HC) çeşitli standart ve standart dışı gıda maddelerinde koruyucu olarak kullanılmasına izin verilen koruyucular listesine LAE maddesi de dahil edilmiştir [9]. Birleşik Gıda Katkıları Uzman Komitesi (JECFA), Haziran 2008'de 60. oturumda LAE'yi değerlendirmiş ve aktif bileşen için (etil-N^a-lauroil-L-arjinat) 4 mg/kg vücut ağırlığı şeklinde bir kabul edilebilir günlük alım miktarı belirlemiştir [5].

LAE, ülkemizde Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde (2013/28693) EK II-Gıdalarda Kullanımına İzin Verilen Gıda Katkı Maddelerinin Listesi ve Kullanım Koşulları başlığı altında Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar

Dışındaki Katkı Maddeleri kısmında E 243 kodu ile yer almaktadır. Aynı EK'te Gıda Kategorilerinde İzin Verilen Gıda Katkı Maddeleri ve Kullanım Koşulları başlığı altında ise emülsifiye edilmiş soslar, tütülenmiş soslar ve ciğer ezmesi hariç ısı işlem görmüş et ürünlerinde maksimum kullanım miktarı 160 mg/L olarak belirtilmiştir [10].

LAE ayrıca Kozmetik Yönetmeliği (2005/25823) EK III-Verilen Sınırlamalar Dışında Kozmetik Ürünlerinin İçermemesi gereken Maddeler Listesi'nde (Ref No 197, CAS No 60372-77-2, EC No 434-630-6) sabun, kepek önleyici şampuanlar ve sprey formunda olmayan deodorantlar için %0.8'lik bir maksimum kullanım konsantrasyonu belirtilmiş ve ürünlerde mikroorganizma gelişimini önlemek dışındaki amaçlarla kullanılması gerektiği bilgisi verilmiştir. Aynı yönetmelikte EK V-Kozmetik Ürünlerinde Kullanılmasına İzin Verilen Koruyucular Listesi'nde dudak ürünleri, ağız bakım ürünleri ve sprey ürünlerde kullanılmamak üzere diğer kozmetik ürünlerinde kullanımına izin verilen maksimum konsantrasyon olarak %0.4'lük bir dozaj belirtilmiştir [11].

2 LAE'nin antimikrobiyal aktivitesi

LAMIRSA teknik broşürüne göre, etil lauroil arjinat; küfler, mayalar, gram-negatif ve gram-pozitif bakterileri içeren çok çeşitli mikroorganizmalara karşı güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptir [8]. Bununla birlikte, LAE'nin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili bilimsel makalelerin sayısı azdır ve test edilen suşların sayısı sınırlı olmakta beraber esas olarak bakterilere odaklanılmıştır.

Tablo 2, bilimsel çalışmalarda in vitro olarak değerlendirilen mikroorganizmaları ve elde edilen minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBC) veya minimum fungisidal konsantrasyonu (MFC) değerlerini sunmaktadır. Tablo 2'deki verilere göre, LAE'nin gıdalar üzerindeki bozulmalarda etkin rol alan önemli mikroorganizma grupları üzerinde düşük dozlarda dahi etkili olduğunu bildiren çalışmalar doğrultusunda önemli bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu söylenebilir. LAE, gıda ambalajında antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilmesinden, bu bileşiğin etkinlik süresinin belirlenmesi önemli bir konu olmaktadır. Bu amaçla farklı çalışmalarda, LAE'nin zamanla canlı hücrelerin sayısını ne yönde etkilediği ile LAE'nin bakterisit veya bakteriyostatik etkisi araştırılmıştır. Farklı çalışmalarda kullanılan metodoloji, inokulum büyüklüğü veya LAE konsantrasyonu farklılık gösterse de tüm çalışmalarda LAE'nin hızlı bir bakterisidal etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır [14],[17],[19]. Pattanayaiyng ve diğ. [19], Becerril ve diğ. [14] ve Soni ve diğ. [17] tarafından *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Brochothrix thermosphacta*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* için 1 sa. daha az bir sürede bakteri popülasyonunun en az 3.5 log CFU/mL azaldığı gözlemlenmiştir. Farklı bir yaklaşım kullanarak, Shen ve diğ. [20] *Listeria monocytogenes*'in asidik ortama adaptasyonundan sonra LAE'nin bakterisit etkisini araştırmışlardır. Çalışma, asidik adapte hücrelerden canlı kalanların sayısının, adapte olmayan hücrelerden yaklaşık 2 log CFU/mL daha fazla olduğu sonucuna varmışlardır.

LAE bir katyonik yüzey aktif maddedir ve yüzey aktif maddelerin antimikrobiyal aktivitesi, mikroorganizmaların hücre yüzeyinde elektrostatik olarak absorbe edilen kimyasal özelliklerinin doğrudan bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. LAE hücre zarında önemli değişiklikler meydana getirmektedir, bu da membranların ana hedef olduğunu, plazma

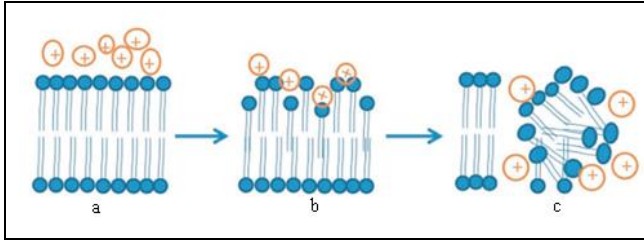
membranında bozulma ve dengesizlik meydana getirdiğini ve gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı aktivite sağladığını göstermektedir (Şekil 3), [9].

LAE'nin antimikrobiyal etkisi çeşitli metodolojiler kullanılarak in vitro olarak çalışılmıştır [21]-[24].

Tablo 2: Bilimsel çalışmalarda in vitro olarak değerlendirilen bazı mikroorganizmaların MIC ve MBC veya MFC değerleri.

Mikroorganizma	MIC*	MBC** (veya MFC***)	Referans
Salmonella enterica	32 mg/kg		[12]
	16 mg/kg	32 mg/kg	[13]
	25 mg/kg	25 mg/kg	[14]
	23.5 mg/kg	23.5 mg/kg	[15]
Escherichia coli	25 mg/kg	25 mg/kg	[14]
	25 mg/kg	25 mg/kg	[16]
	11.8 mg/kg	11.8 mg/kg	[15]
Pseudomonas aeruginosa	100 mg/kg	100 mg/kg	[14]
Listeria innocua	25 mg/kg	25 mg/kg	[14]
	8 mg/kg	32 mg/kg	[17]
Listeria monocytogenes	≤25 mg/kg		[13]
	11.8 mg/kg	23.5 mg/kg	[15]
Staphylococcus aureus	8 mg/kg		[12]
	12.5 mg/kg	50 mg/kg	[14]
Aspergillus flavus	100 mg/kg	200 mg/kg	[18]

*: Minimum inhibitör konsantrasyonu. **: Minimum bakterisidal konsantrasyonu. ***: Minimum fungisidal konsantrasyonu.



Şekil 3: Aktivite mekanizması; a-LAE ve membran lipid tabakası, b-elektrostatik adsorpsiyon, c-membran lipid tabakasının bozulması.

Rodriguez ve diğ. [12], LAE'nin *Salmonella typhimurium* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı MIC değerlerini sırasıyla 32 ve 8 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Soni ve diğ. [17], 25 µg/mL LAE'nin *Listeria monocytogenes* suşlarının gelişimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Muriel-Galet ve diğ. [22], LAE için sırasıyla *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Salmonella enterica* suşları için 7, 20 ve 10 µg/mL olarak MIC değerlerini; 12, 32 ve 16 µg/mL olarak ise MBC değerlerini belirtmişlerdir. Higuera ve diğ. [21], katı veya sıvı ortamda gram-pozitif bakteriler için 8 µg/mL ve gram-negatif bakteriler için 16 µg/mL, küfler için sıvı ortamda 4 ile 16 µg/mL, mayalar için katı ortamda 24 ile 120 µg/mL olarak MIC değerlerini bildirmişlerdir.

LAE ile ilgili literatürde bildirilen MIC ve MBC değerlerinin farklılık göstermesi, kullanılan ortam kompozisyonunun, metodolojinin ve çalışılan mikroorganizma suşlarının farklı olmasının bir sonucudur. Bununla birlikte, tüm çalışmalarda LAE gram-pozitif bakterilere karşı biraz daha yüksek bir aktivite göstermiştir. Gram-negatif bakteriler, hücre duvarını çevreleyen ve lipopolisakkarit kaplamasıyla hidrofobik bileşiklerin difüzyonunu kısıtlayan bir dış membrana sahip olduklarından dolayı antimikrobiyal ajanın faaliyetine daha az duyarlı olup bu ajanlara karşı daha büyük bir savunma sistemi sergilemektedirler [25].

Ayrıca, yüzey aktif maddelerin hücre duvarı ve membranları bozmasının sonucu olarak sitoplazmik membranın depolarizasyonuna ve sitosol bileşenlerinin sızmasına yol açtığı bildirilmiştir [12].

LAE'nin antimikrobiyal bir bileşik olarak etki mekanizmasını incelemek amacıyla farklı teknikler kullanılmıştır. Akış sitometrisi ile hücrelerin canlılığı analiz edilebilmektedir ve uygun florokromlar ile canlı ve cansız bir hücre popülasyonu arasında ayırım yaparak LAE'nin antimikrobiyal etkisini değerlendirmek mümkündür [9]. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, 24 sa. temas süresinden sonra belirlenen miktarlarda LAE kullanımı ile hasar gören hücrelerin oranı *Salmonella typhimurium* ve *Staphylococcus aureus* için sırasıyla %97 ve %56.3 olarak bildirilmiştir [12]. Muriel-Galet ve diğ. [23], LAE'nin MIC değerlerini dikkate alarak *Listeria monocytogenes* için %23.35'lik ve *Escherichia coli* için ise %17.79'lük ölü bir popülasyon ile görünür hale geldikleri sonucuna varmışlardır.

Becerril ve diğ. [15], Muriel-Galet ve diğ. [23] ve Rodriguez ve diğ. [12] tarafından yapılan çalışmalarda ise farklı mikroorganizmaların membran yapısında ortaya çıkan morfolojik değişiklikleri belirlemek için hücreler LAE'nin etkisine maruz bırakıldıktan sonra taramalı elektron mikroskobu ile gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, LAE, hücre zarında önemli değişikliklerin meydana gelmesine sebep olduğundan dolayı zarların bu madde için ana hedef olduğu sonucuna varılmıştır. LAE'nin ayrıca plazma membranında bozulma ve instabilite yarattığı ve yine gram-pozitif bakterilere karşı gram-negatif bakterilere kıyasla daha fazla aktivite gösterdiği rapor edilmiştir.

LAE'nin hücreler üzerinde farklı seviyelerde etki ettiği ve hücresel etkinin bakteri hücrelerinin yapısına bağlı olduğu sonucuna varılabilmektedir. Gram-negatif hücrelerde meydana gelen değişiklikler hem sitoplazma zarını hem de dış zarı kapsamaktadır. Buna karşılık, gram pozitif hücrelerde hücre zarında ve sitoplazmada değişiklikler meydana gelmektedir. Her iki durumda da LAE ile işlem uygulanan popülasyonda hücre lizisi olmadan hücreler canlılıklarını yitirmektedirler [9].

2.1 Antimikrobiyal etki mekanizması

Bir katyonik yüzey aktif madde olarak LAE'nin surfaktanlara benzer bir etki mekanizması göstermesi beklendiğinden bu konuda yapılan araştırmalarda morfolojik değişimlerin incelenmesi amacıyla hücre zarı bütünlüğü çalışmalarında (akış sitometrisi ve iyon akışı), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) üzerine odaklanılmıştır. Tablo 3, LAE'nin etki mekanizmasını ve elde edilen sonuçları incelemek için gerçekleştirilen farklı analizleri sunmaktadır. Genel olarak, etil lauroil arjinatın bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisi ile ilgili çeşitli çalışmalarda açıklanan verilere göre hücre zarının ana hedef olduğunu göstermektedir.

2.2 LAE'nin gıda emülsiyonlarında surfaktan olarak kullanımı

LAE'nin katyonik bir yüzey aktif madde olarak gıdalarda kullanımı önemli ve farklı sonuçlara sahip olabilir, çünkü LAE gıda ürünlerinde bulunan diğer moleküllerden gelen gruplarla etkileşime girebilme yeteneği sergileyebilmektedir [9]. Biyopolimerler gıda endüstrisinde, dokuyu modifiye etmek, stabiliteyi geliştirmek veya su tutma kapasitesini korumak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılan fonksiyonel bileşenler olarak tanımlanmaktadır [9].

Tablo 3: LAE'nin bakteriler üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılan teknikler.

Teknik	Bakteri	Ana Etkiler	Referans
Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve/veya taramalı elektron mikroskobu (SEM)	Salmonella thyphimurium	Dış zar şişmesi, membranda kapalı vakuoller, hücre ve sitoplazma bütünlüğü	[12]
	Staphylococcus aureus	Mezozom benzeri oluşumlar, intrasitoplazmik beyaz lekeler ve açık bölgeler, çok hücreli hücreler, hücre bütünlüğü	
	Escherichia coli O157:H7	İntrasitoplazmik pıhtılaşma, bozuk ve çukurlu hücreler	[19]
	Listeria monocytogenes Scott A	İntrasitoplazmik pıhtılaşma, anormal septasyon, düzensiz duvar formasyonu, değiştirilmiş hücre morfolojisi, hücre bütünlüğü	
	Brochothrix thermosphacta	İntrasitoplazmik pıhtılaşma, pleomorfik hücreler, hücre bütünlüğü	
	Listeria monocytogenes ve Salmonella Rissen	Membran sızıntısı, hücre zarında değişiklikler	
Boyama ve akış sitometrisi	Escherichia coli	Düzensiz şekil, sert yüzey, gözenek oluşumu, hücre çöküntüsü	[14]
	Salmonella thyphimurium ve Staphylococcus aureus	Hasarlı hücre zarı	[12]
İyon akışı çalışmaları	Salmonella thyphimurium ve Staphylococcus aureus	Hücre içi potasyum sızıntısı ve proton akışının azalması	[12]
	Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes Scott A ve Brochothrix thermosphacta	Hücre içi potasyum sızıntısı	[19]

Süt, tereyağı, margarin, krema, dondurma, mayonez, salata sosları, krem peynirler veya soslar gibi birçok üründe yapının bütünlüğünü korumak için emülsiyon stabilitesi önemli bir kavramdır. Gıda emülsiyonlarında yüzey aktif madde seçimi bu nedenden dolayı önem arz etmektedir ve LAE bu konuda çok umut verici yeni bir madde olarak gıda uygulamalarında yer almaya başlamıştır [9]. Asker ve diğ. [4] LAE uygulamasının sınırlı olabileceğini belirtmişlerdir. Bu sonucu ise LAE'nin antimikrobiyal aktivitesinin bir besin matriksinin anyonik bileşenleriyle etkileşimlerinden etkilenebileceği; ağızdaki anyonik biyopolimerlere bağlanarak acılığın algılanmasına neden olabileceği ve pH'sı 4.5 olan yüksek iyonik güçteki çözeltilerde çökebileceği bilgileriyle desteklemişlerdir. Bu nedenle, izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC), mikroeletroforez (ME) ve türbidite ölçümleri (TIC) kullanarak katyonik yüzey aktif madde olan LAE ve anyonik yapıdaki pektin arasındaki etkileşimleri karakterize etmişlerdir. Çalışmada, LAE'nin çözelti bileşimine bağlı olarak çözünbilir (saydam) veya çözünmez (bulanık) olabilecek kompleksler oluşturabildiği sonucuna varmışlardır. LAE ve farklı yük özelliklerine sahip çeşitli gıda biyopolimerleri (anyonik bileşikler olarak pektin, aljinat, karragenan ve ksantan; nötr bir bileşik olarak dekstran; pH<6.3'te katyonik bir bileşik olarak kitosan) arasındaki etkileşime ilişkin başka bir çalışmada, ITC ve TIC sonuçları LAE ile katyonik veya doğal biyopolimerler arasında kompleks bir oluşum olmadığı gösterilmiştir [26]. Loeffler ve diğ. (2014), genelde meyve sularında kullanılan iki anyonik polisakarit olan ksantan ve karregenanın, *Saccharomyces cerevisia*, *Candida albicans* ve *Zygosaccharomyces bailii*'ye karşı LAE'nin antimikrobiyal

aktivitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Sonuçlarda, LAE'nin ksantan veya karregenana ile kombinasyonunun antimikrobiyal aktivitede belirgin bir azalmaya neden olduğunu belirtmiştir. Ayrıca, polisakarit konsantrasyonu artırıldığında MIC ve minimum letal konsantrasyon (MLC) değerlerinin de arttığı gözlemlenmiştir [27].

Çeşitli uygulama formlarında kullanılan LAE'nin (sulu çözelti, su içinde yağ emülsiyonu ve et emülsiyonlarının yüzeyindeki katı lipid partikülleri) antimikrobiyal aktivitesi *Listeria innocua*, *Escherichia coli* ve *Lactobacillus curvatus*'a karşı araştırılmıştır. Sonuçlarda, LAE'nin bir emülsiyona veya katı lipid partiküllerine eklendiğinde, ara yüzeylerdeki moleküler etkileşime bağlı olarak daha az aktivite sergilediği, böylece yüzey aktif madde olarak işlev gördüğü ve antimikrobiyal etkinliğinin azaldığı belirtilmiştir [28].

Chang ve diğ. [29], LAE'nin kekik yağı nanoemülsiyonunun fiziksel özelliklerini ve antimikrobiyal aktivitesini artırma yeteneğini belirlemişlerdir. Ayrıca, iki antimikrobiyal ajanın (LAE ve timol yağı) kullanımının *Zygosaccharomyces bailii*'ye karşı sinerjistik bir antimikrobiyal etki üreteceği sonucuna varmışlardır.

Tüm bu çalışma örneklerindeki sonuçlar değerlendirildiğinde, LAE'nin gıda ürünlerinde ve diğer endüstriyel uygulamalarda fonksiyonel bir bileşen olarak önemli bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

3 Gıda sistemlerinde LAE'nin rolü

LAE'nin uçuculuk özelliği eksikliği nedeniyle verimli olması için gıda ürünüyle doğrudan temas etmesi gerekmektedir. Bununla

birlikte LAE, uçucu yağlar gibi diğer antimikrobiyallerle karşılaştırıldığında ilginç bir alternatif olarak tanımlanabilmektedir, çünkü kokusuz bir bileşik olduğundan büyük bir kullanım potansiyeli sunmaktadır [4]. Ek olarak, LAE, sinerjistik bir etki olasılığı nedeniyle daha düşük konsantrasyonlarda diğer gıda antimikrobiyalleri ile kombinasyon halinde de kullanılabilir. Örneğin, Ma ve diğ. [15] *Listeria monocytogenes*'de LAE ve tarçın veya öjenol arasında sinerjistik etki, *Escherichia coli* ve *Salmonella enteritidis*'de ise antagonist bir etki gözlemlenmiştir. Suksathit ve Tangwatcharin [13], LAE'nin organik asit tuzları (sodyum diasetat, sodyum sitrat ve sodyum laktat) ile birlikte kullanılmasıyla *Salmonella rissen* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkinin arttığı sonucuna varmışlardır. Pattanayaiyng ve diğ. [19], nisin Z'nin gram-negatif bakteriler üzerinde LAE ile kombinasyon halinde antimikrobiyal etkisi üzerine çalışmışlardır. Yapılan bir başka çalışmada ise ısıtma işlem sonrası (15 dk. 90-120 °C) LAE'nin *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesini hala koruyabildiğinden dolayı LAE'nin yüksek sıcaklık teknolojileri gerektiren aktif ambalajlamada uygulamalarında da kullanılabilmesi belirtilmiştir [4]. Ayrıca, daha önce belirtildiği gibi, LAE'nin in vitro deneylerde elde edilen güçlü aktivite değerleri sonucunda sadece bir gıda ürününün dış yüzeyine doğrudan uygulamasının yanı sıra farklı ambalaj malzemelerine dahil edilmesi üzerine de çalışmalar yapılmıştır (Tablo 4).

Bununla birlikte, diğer antimikrobiyallerde olduğu gibi, matriks bileşimi antimikrobiyal bileşimin aktivitesini etkilemektedir. Bu nedenle, birçok araştırmacı in vivo örneklerle karşılaştırıldığında in vitro test edildiğinde LAE'nin daha yüksek bir aktivite gösterdiği sonucuna varmışlardır [16],[30]-[32]. Bu yaklaşımla devam eden Ma ve diğ. [15], çözünebilir nişasta ilavesinin *Listeria monocytogenes*'e karşı LAE'nin minimum bakterisit konsantrasyonunu yüksek oranda artırdığını belirtmişlerdir. Yağ içeriğinin etkisinin incelenmesi üzerine Sharma ve diğ. [31], derisiz tavuk göğsü filetolarında, daha yüksek yağ konsantrasyonu içeren tavuk kıymasına göre çok daha yüksek bir LAE aktivitesi elde etmişlerdir. Fakat Oladunjoye ve diğ. [32] ise hindi kıyması örneklerinde LAE

aktivitesi ile yağ içeriği arasında bir ilişki bulamamışlardır. Diğer antimikrobiyal ajanlara benzer şekilde LAE, gıda örneğine doğrudan eklenme veya aktif bir ambalaja dahil olma olanağına sahiptir. Aktif ambalajlama sistemlerine uyarlanırken, aktif bileşiğin difüzyon hızı üzerinde önemli bir rol oynayan polimerin uygunluğuna ve bu nedenle de uygulanan antimikrobiyal maddenin nihai biyoyararlılığına dikkat edilmesi önemlidir [33]-[35].

3.1 Gıda sistemlerinde LAE'nin antibakteriyel aktivitesi

LAE esas olarak gıdalarda koruyucu olarak kullanılmaya yöneliktir. LAE tek başına veya enzimler, uçucu yağlar, sorbatlar, benzoatlar gibi diğer gıda koruyucuları ile birlikte kullanılabilir. Genel olarak bir koruyucunun işlevi, mikroorganizmalar tarafından gıdaların bozulmasını geciktirmek veya önlemek amacıyla mikrobiyolojik bozulmaları engelleyerek gıda güvenliğini sağlamaktır [14].

Antimikrobiyal ajan olarak yeni bir madde olması ve potansiyel faydaları nedeniyle LAE birçok araştırmacının dikkat çekmiş ve daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır [9].

Martin ve diğ. [36], baharatlı alman sosisleri yüzeyindeki *Listeria monocytogenes*'in başlangıç yükünü azaltmak için antimikrobiyal madde amaçlı LAE kullanarak 22 µg/mL LAE uygulamasıyla mikroorganizmanın başlangıç sayısında en az 1 log CFU/cm²'lik azalma olduğunu göstermişlerdir.

Porto-Fett ve diğ. [37], yine aynı üründe LAE'nin potasyum laktat ve sodyum diasetat ile kombinasyon halinde kullanımının *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında, patojen mikroorganizma sayısının 2 sa. 2 log CFU/paket düzeyinde azaldığını ve 120 günlük depolama süresi boyunca bu değer nispeten değişmeden kaldığını gözlemlenmiştir. Stopforth ve diğ. [38] ise LAE ile birlikte laktat-diasetatın *Listeria monocytogenes* ile inoküle edilip, pişirilip kurutulmuş jambon üzerine antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır ve bu uygulamanın depolama süresi boyunca jambon üzerindeki bakterileri tamamen inhibe edebildiği rapor edilmiştir.

Tablo 4: LAE'nin doğrudan eklenme veya yüzeye işleme şeklinde uygulama örnekleri.

Uygulama	Materyal	Sonuçlar	Referans
Doğrudan ekleme	<i>Escherichia coli</i> 0157: H7 ile kontamine edilmiş elma suyu örnekleri	PEF uygulaması ile maksimum bakteriyel indirgeme 3 ve 4 log seviyeleri arasında bulunurken, 50 mg/L LAE ilavesiyle aktivite 6 log seviyesine çıkarılmış ve işlemin uygulama süresi de azaltılmıştır.	[39]
	Pastörize edilmiş %3.25 yağlı çikolata ve tatlandırıcısız süt ürünleri	200 mg/mL LAE eklenmesi, tatlandırıcı ilavesiz süt örneklerinde daha etkili olmuştur. 21 günde bu örneklerde 5.77 log CFU/mL'lik bir azalma meydana gelirken, çikolata örneklerinde 0.9 log CFU/mL azalma olmuştur.	[40]
	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> ve <i>Escherichia coli</i> 0157: H7 ile inoküle edilmiş %2 yağlı azaltılmış süt	Antilisteriyal aktivite, 6000 mg/L'lik tarçın esansiyel yağı, öjenol veya timol ile elde edilirken aynı etki 750 mg/L LAE ile elde edilmiştir. Ayrıca mikroorganizma büyüme eğrileri, suşa bağlı olarak büyük farklılıklar göstermiştir. Bu nedenle, LAE ve esansiyel yağların kombinasyonu, <i>Listeria monocytogenes</i> 'e karşı en etkili sonucu vermiştir, diğer suşlarda ise en iyi sonuç sadece esansiyel yağ ile elde edilmiştir.	[15]
Yüzeye işleme	<i>Campylobacter jejuni</i> ile inoküle edilmiş tavuk göğsü filetosu	İn vitro deneylerdeki güçlü aktiviteye rağmen, 200 ve 400 mg/kg'lık LAE uygulaması sadece <i>Campylobacter jejuni</i> ile inoküle edilmiş tavuk göğsü filetolarında etkili iken, mezofilik büyümeye karşı etkili olmamıştır ve psikotroflara karşı da çok düşük bir aktivite görülmüştür.	[30]
	<i>Salmonella</i> ile inoküle edilmiş derisiz, kemiksiz tavuk göğsü filetosu	200 ve 400 mg/kg'lık LAE ilavesi tavuk örneklerindeki mezofilik mikroorganizma sayısını azaltmamıştır, ancak <i>Salmonella</i> inokülasyonu ile işlem gören örneklerde yaklaşık 1 log CFU/g azalma meydana gelmiştir. Ayrıca kullanılan LAE miktarı, tavuk göğsü filetolarının pH'sını değiştirmemiştir.	[31]

Başka bir çalışmada, tam yağlı ve az yağlı süt *Listeria monocytogenes* ile inoküle edilmiş ve 1 log CFU/mL'lik azalma 4 °C'de 24 sa. bir uygulamada 200 µg/mL LAE ilavesiyle elde edilmiştir. LAE konsantrasyonu 800 µg/mL'ye çıkartıldığında *Listeria monocytogenes* üzerinde bakterisid etki gözlemlenmiştir [17].

Nair ve diğ. [30] tarafından LAE'nin antimikrobiyal etkinliği tavuk göğsü filetoları üzerinde *Campylobacter jejuni*'ye karşı test edilmiş ve sonuçlarda 200 ve 400 mg/L LAE tedavileri ile belirgin bir azalma olduğu görülmüştür. 400 mg/L LAE konsantrasyonunda maksimum azalma elde edilmiştir.

Bir çalışmada soğuk tütsülenmiş somon, *Listeria monocytogenes*'in varlığını azaltmak için bakteriyofaj P100, nisin ve LAE (200 µg/mL) kombinasyonu ile muamele edilmiştir. Bu kombinasyonun, *Listeria monocytogenes* hücrelerini 24 sa. içinde tespit edilemeyen bir seviyeye indiren bakterisid bir etki ortaya çıkardığı bildirilmiştir [24].

Genel olarak, gıdalardaki patojenik bakterilere karşı tamamen inhibisyonun sağlanması için gereken LAE konsantrasyonunun in vitro testler için gerekli olandan daha yüksek olduğu sonucuna varılabilmektedir. Gıdalardaki besin maddelerinin in vitro testlere göre daha fazla bulunması, bakterilerin hücresel hasarı daha hızlı bir şekilde onarmasına olanak sağlayabilmektedir. Ayrıca bakterilerin duyarlılığı ise su içeriği, pH, yağ veya protein faktörleri gibi gıdalardaki iç etkenlerden ve ambalajın sıcaklığı, türü gibi dış etkenlerden etkilenebilmektedir. LAE genelde besinlerin sulu fazına doğru hareket ettiğinden dolayı yüksek yağ içerikli gıdalarda bakteriler bu etkiden korunabilmektedirler [47].

3.2 Aktif gıda ambalajında LAE'nin antibakteriyel etkinliği ve kullanım potansiyeli

Bir gıdayı içeren ambalajın temel fonksiyonları, gıdayı fiziksel ve çevresel hasarlara karşı korumak ve gıda ile ilgili tüketicilere bilgi sağlamaktır [41]. Bununla birlikte, son yıllarda daha güvenli ve daha kaliteli gıda ürünleri talebini karşılamak için aktif ambalaj kavramı üzerine gelişmeler gerçekleştirilmiştir.

Aktif ambalajlama teknolojisindeki mevcut eğilimler, aktif ajanların polimerin işlenmesi sırasında kasıtlı olarak dahil edilmesi ile ambalajın yüzeyinden salınmasına odaklanmaktadır [42]. Antimikrobiyal maddeler aktif ambalajın geliştirilmesi, taze gıdanın stabilitesinin korunması ve gıdaların raf ömrünün uzatılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [42]. Aktif bileşik veya ajanlar, polimer ile kimyasal olarak uygun olduğunda polimer matrisinde homojen olarak dağılabilmektedirler [48],[49]. Bu aktif bileşikler, ambalajlama aşamasından sonra ambalaj ile gıda arasındaki boşluğu (tepe boşluğu) veya gıda/ambalaj ara yüzeyine yayılarak etki etmektedirler [42].

Literatürde antimikrobiyal ambalajların geliştirilmesinde, LAE'nin biyopolimerlerin yanı sıra petrolden türetilen sentetik polimerlerin yapısına katılması da önerilmiş ve test edilmiştir [9]. Sentetik polimerlerden en çok düşük maliyetli olması, piyasada kolay bulunabilmesi, şeffaflık ve fiziksel stabilite özelliklerine sahip olması ve gazlara karşı yüksek bariyer özelliğinin bulunması nedeniyle endüstride ve özellikle gıda ambalaj uygulamalarında etilen vinil alkol kopolimeri (EVOH) yaygın olarak kullanılmaktadır [49]. Polimerler genelde neme karşı hassas bir yapıya sahiptirler ve su ile plastikleştirilirler. Bu özellik, polimer matrisinde tutulan aktif bileşiklerin

salınması için bir tetikleme mekanizması olarak kullanılabilir [50].

LAE yüklü antimikrobiyal polimer filmlerin tasarımında dikkate alınması gereken birkaç önemli unsur vardır. Örneğin, gıda maddesine salınan LAE miktarı ve salınım kinetiği, suda çözünabilir LAE'nin gıda matrisi ve polimer ile kimyasal uyumluluğuna bağlı olmaktadır. Polimerin hidrofilik doğasından dolayı ambalajlanmış gıdalarda bulunan nem ve su seviyesi de bileşiğin salınım oranını etkilemektedir. Bir antimikrobiyal filmin tasarımında dikkate alınması gereken bir diğer faktör ise katı gıdaların morfolojik yapılarının antimikrobiyal maddenin yüzeyden matrisin merkezine difüzyonunu etkilemesidir [21],[30],[34],[43].

Muriel-Galet ve diğ. [22],[23], EVOH'a LAE'nin dahil edilmesiyle oluşturulmuş çok katmanlı yapıların mükemmel bir aktif ambalaj olabileceğini vurgulamışlardır. Çalışmalarında ilk olarak, %10 LAE içeren EVOH-29 ve EVOH-44 çözeltilerini film üretmek için kullanmış ve filmlerin *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Salmonella enterica*'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi hem in vitro şekilde hem de bu mikroorganizmaların inoküle edildiği bebek sütünde incelemişlerdir. Bütün filmlerde EVOH-29 örneklerinin özellikle *Listeria monocytogenes*'e karşı daha aktif olup genel değerlendirmede de daha iyi bir antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Nemli ortamlarda daha fazla oksijen geçirgenliği haricinde, geliştirilen filmlerin mekanik, optik, termal ve bariyer özellikleri üzerinde LAE ilavesinin herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır.

LAE'nin suya salınımını ise 4 ve 23 °C'de takip ederek EVOH-29 ve 23 °C'de salınımın daha hızlı olduğunu gözlemişlerdir. Daha sonra başka bir çalışmada ise bebek sütü örneklerini *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella enterica* ile inoküle etmiş ve LAE içeren antimikrobiyal filmlerle temas ettirmişlerdir.

Genel olarak, antimikrobiyal filmlerin *Listeria monocytogenes*'in çoğalmasını inhibe etmede *Salmonella enterica*'ya göre daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Aktif filmlerin potansiyel uygulamalarının daha kapsamlı araştırılması için deneysel olarak ikinci bir çalışma olarak ise tavuk eti ve surimi çubukları üzerinde çalışmalar yapmışlardır. *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* ile inoküle edilmiş tavuk etini önceki çalışmalarında kullandıkları kompozisyondaki film çözeltilerine daldırarak ve patojen bakteriler ile kontamine olmuş surimi çubuklarını ise film çözeltilisini yüzeye kaplayarak hazırlamışlardır. Sonuçlarda, filmlerin doğal mikrobiyal yükünün önemli ölçüde azaldığını ve her iki üründe de inoküle edilmiş mikroorganizmaların çoğalmasının 4 °C'de inhibe edildiğini belirtmişlerdir [34]. Araştırmacılar bu sonuçlar doğrultusunda geliştirilen filmlerin ambalajlı ürünlerin güvenliğini geliştirmek için büyük bir potansiyel sergiledikleri sonucuna varmışlardır.

Günümüzde, sentetik plastiklerin düşük biyobozunabilir özelliklerinden dolayı çevresel sorunların artması ile birlikte gıda ambalajlama uygulamaları için antimikrobiyal bileşenlere sahip biyopolimerlerden çevre dostu ve biyolojik olarak parçalanabilir ambalaj malzemeleri geliştirmek yeni çalışmalar için odak noktası haline gelmiştir [50]. Çevre dostu ambalaj üretiminde sıklıkla kullanılan polilaktik asit (PLA) filmlerine farklı konsantrasyonlarda LAE çözeltileri (%0.25, %0.5, %1 ve %10, a/a) ilave edilmiştir. Geliştirilen filmlerin mekanik özelliklerinin kontrol numunesi (PLA) ile karşılaştırıldığında

değişmediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, sıvı ortamdaki denemelerde gram-pozitif bakterilere karşı daha yüksek bir antimikrobiyal etki olduğu ve %2.6 (a/a) LAE ilaveli PLA kullanımında canlı hücre sayısında 5.13 log'luk bir düşüş olduğu belirtilmiştir. Daha sonra, pişirilmiş jambon yüzeyine *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella typhimurium* inoküle edilmiş ve LAE kaplı PLA filmler ile sarılarak 4 °C'de kapalı petri kaplarında saklanmıştır. 24 sa. sonra 2 ve 3 log'luk bir azalma gözlemlenmiştir [44].

LAE'nin kitosana eklenmesinin farklı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkiyi önemli ölçüde arttırdığını gösteren bir çalışmada kitosan-LAE filmleri, kontrollü ortam koşulları altında geliştirilmiş ve filmlerden sulu bir gıda benzerine LAE salınımı 28 ve 4 °C'de birkaç saat içinde tamamen serbest bırakılarak izlenmiştir. LAE'nin kitosan eklenmesinin mezofillere, psikrofillere, *Pseudomonas* spp., koliform bakterilere, laktik asit bakterilerine, maya ve mantarlara karşı önemli bir antimikrobiyal aktiviteye neden olduğu belirtilmiştir. Çalışmada gerçek gıda ile yapılan testlerde ise derisiz tavukgöğsü filetosu %5 oranında LAE içeren kitosan filmleri ile kaplanmış ve 4 °C'de saklanmıştır. Kitosan-LAE filmlerinin taze tavukta bulunan toplam mikrobiyolojik yükü önemli ölçüde azalttığı ve taze kümes hayvanı ürünlerinin ambalajlanması için mükemmel bir potansiyel olabileceği belirtilmiştir [21].

Yapılan başka bir çalışmada kitosan filmlerine LAE ve nisin kombinasyonu dahil edilerek kompozit filmler elde edilmiş ve bu filmlerin antimikrobiyal etkileri yüzeyine *Listeria innocua* inoküle edilen hazır et ürünlerinde incelenmiştir. 1.94 mg/cm² kitosan ve 0.388 mg/cm² LAE içeren antimikrobiyal kaplamaların *Listeria innocua*'yı yaklaşık 4.5 log CFU/cm² düzeyinde azalttığı sonucuna varılmıştır. Nisinin (486 IU/cm²), LAE'den (0.388 mg/cm²) daha az etkinlik gösterdiği ve antimikrobiyal kaplamalara veya LAE (0.388 mg/cm²) içeren filmlere nisin eklenmesinin toplam antimikrobiyal etkinliği arttırmadığı belirtilmiştir [43].

Yapılan bu çalışmalar, LAE bazlı geliştirilen filmlerin gıda ambalajlarının tasarımında kullanılmak için büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

4 Sonuç

LAE, L-arjinin ve etanolün sentetik bir türevi olup, kimyasal yapısından ve surfaktan özelliklerinden kaynaklanan antimikrobiyal etkinliği açısından dikkat çekici yeni bir antimikrobiyal ajandır. İlaç, kozmetik ve gıda muhafaza alanında yaygın olarak kullanılan bir üründür. 2005 yılında FDA tarafından gıdada antimikrobiyal ve 2007 yılında EFSA tarafından gıda koruyucu olarak değerlendirilmiştir. GRAS olarak sınıflandırılmış ve gıda güvenliği ve kalitesi için onaylanmıştır. Literatürde LAE'nin antimikrobiyal etkisi üzerine incelenen çalışmalarda çok düşük dozlarda kullanımının dahi yüksek etkinlik göstermesinden dolayı bu molekülün piyasada yeni ve etkili bir koruyucu olarak değerlendirilmesini destekler niteliktedir. Düşük dozlarda uygulandığında, gıdaların görünüşünü ve organoleptik özelliklerini etkilememektedir. Katyonik bir yüzey aktif madde olarak gram pozitif ve negatif bakterilere, mayalara ve küflere karşı geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir. Hücre zarları ve sitoplazma üzerinde etkilidir ve popülasyon büyümesini inhibe eder fakat hiçbir durumda hücre lizisine sebep olmamaktadır. Metabolizmada, insan beslenmesinde yaygın olan doğal endojen ürünlere hidrolize edilir ve herhangi bir toksik etkisi bulunmamaktadır. Günümüzde özellikle ABD, Meksika ve

Avustralya 'da çoğunlukla et sektöründe, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Salmonella* spp. gibi patojenlere karşı kullanılmaktadır. Derlemede özetlenen çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde tüm sonuçlar, LAE 'nin gıda ürünlerinde ve diğer endüstriyel uygulamalarda fonksiyonel bir bileşen olarak önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Literatür incelemesinde LAE ile ilgili olarak çoğunlukla mikroorganizmalar üzerine etkisi konusunda çalışıldığı görülmektedir. Fakat LAE'nin farklı gıda gruplarında (meyve, sebze, et ve su ürünleri vb.) depolama süresine, ürün kalitesine, duyuşsal, fiziksel, kimyasal ve organoleptik özelliklere etkisinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Sentetik bir koruyucu olmasına rağmen düşük dozlarda yüksek etkinlik gösterebileceğinden ve toksisitesinin olmamasından dolayı gıda sektörü için kullanım potansiyelinin oldukça fazla olduğu söylenebilir. Gıda muhafazasında yeni tekniklerin geliştirilmesinde LAE gibi güçlü antimikrobiyal etki gösteren farklı koruyucuların bu sistemlere dahil edilmesi ile yeni çalışma alanlarının oluşumu desteklenebilir.

5 Teşekkür

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2019-20497.

6 Kaynaklar

- [1] Davidson PM, Sofos JN, Branen AL. *Antimicrobials In Food*. 3rd ed. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press, 2005.
- [2] García Domínguez JJ, Infante MR, Erra P, Julia MR. "N alpha-acil-L-alkylaminoguanidinic Acids and Their Salts Surfactants with Antimicrobial Action". Spanish Patent, ES 512643-A1, 1983.
- [3] Martínez JR, Bonaventure JS, Mestres AC. "Process for the preparation of cationic surfactants". U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC, EP 1294678-A1, 2000.
- [4] Asker D, Weiss J, McClements DJ. "Analysis of the interactions of a cationic surfactant (lauric arginate) with an anionic biopolymer (pectin): isothermal titration calorimetry, light scattering, and microelectrophoresis". *Langmuir*, 25(1), 116-122, 2009.
- [5] Kawamura Y, Whitehouse B. "Ethyl Lauroyl Arginate-chemical and technical assessment". In: 69th JEFCA, FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *JEFCA Monographs*, 2008.
- [6] EFSA. "Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the Commission related to an application on the use of ethyl lauroyl arginate as a food additive". *EFSA Journal*, 511, 1-27, 2007.
- [7] FDA. "US FDA agency response letter: GRAS Notice No. GRN 000164". Washington, DC, United States Food and Drug Administration, September, 2005.
- [8] LAMIRSA. "LAE: The best active preservative". http://www.lamirsa.com/ing/pdf/LAE_BOLETIN_10_20_14_GB.pdf (15.08.2018)
- [9] Muriel-Galet V, Carballo GL, Hernández-Muñoz P, Gavara R. *Ethyl Lauroyl Arginate (LAE): Usage and Potential in Antimicrobial Packaging*. Editor: Barros-Velázquez J. Antimicrobial Food Packaging, 313-318, USA, Academic Press, 2016.

- [10] T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. "Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği". <http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.18532&MevzuatIlski=0&sourceXmlSearch=katk%C4%B1> (22.08.2018).
- [11] T.C. Sağlık Bakanlığı. "Kozmetik Yönetmeliği". <http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.8157&MevzuatIlski=0&sourceXmlSearch=kozmeti> (22.08.2018).
- [12] Rodríguez E, Seguer J, Rocabayera X, Manresa A. "Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, N-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus". *International Journal of Food Microbiology*, 96(5), 903-912, 2004.
- [13] Suksathit S, Tangwatcharin P. "Activity of organic acid salts in combination with lauric arginate against listeria monocytogenes and Salmonella Rissen". *Scienceasia*, 39(4), 346-355, 2013.
- [14] Becerril R, Manso S, Nerin C, Gómez-Lus R. "Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria". *Food Control*, 32(2), 404-408, 2013.
- [15] Ma Q, Davidson PM, Zhong Q. "Antimicrobial properties of lauric arginate alone or in combination with essential oils in tryptic soy broth and 2% reduced fat milk". *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 77-84, 2013.
- [16] Otero V, Becerril R, Santos JA, Rodríguez-Calleja JM, Nerin C, García-López ML. "Evaluation of two antimicrobial packaging films against Escherichia coli O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano)". *Food Control*, 42, 296-302, 2014.
- [17] Soni KA, Nannapaneni R, Schilling MW, Jackson V. "Bactericidal activity of lauric arginate in milk and Queso Fresco cheese against Listeria monocytogenes cold growth". *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4518-4525, 2010.
- [18] Manso S, Nerin C, Gómez-Lus R. "Antifungal activity of the essential oil of cinnamon (cinnamomum zeylanicum), oregano (origanum vulgare) and lauramide argine ethyl ester (LAE) against the mold Aspergillus flavus CECT 2949". *Italian Journal of Food Science*, 23, 151-156, 2010.
- [19] Pattanayaiying R, H-Kittikun A, Cutter CN. "Effect of lauric arginate, nisin Z, and a combination against several food-related bacteria". *International Journal of Food Microbiology*, 188, 135-146, 2014.
- [20] Shen Q, Soni KA, Nannapaneni R. "Stability of sublethal acid stress adaptation and induced cross protection against lauric arginate in Listeria monocytogenes". *International Journal of Food Microbiology*, 203, 49-54, 2015.
- [21] Higuera L, López-Carballo G, Hernández-Muñoz P, Gavara R, Rollini M. "Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-N α -dodecanoyl-l-arginate) and its application to fresh chicken". *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 339-345, 2013.
- [22] Muriel-Galet V, López-Carballo G, Gavara R, Hernández-Muñoz P. "Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH". *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 239-244, 2012.
- [23] Muriel-Galet V, Lopez-Carballo G, Gavara R, Hernandez-Munoz P. "Antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol/epsilon-polylysine films and their application in surimi preservation". *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3548-3559, 2014.
- [24] Soni KA, Shen Q, Nannapaneni R. "Reduction of Listeria monocytogenes in cold-smoked salmon by bacteriophage P100 nisin and lauric arginate singly or in combinations". *International Journal of Food Science & Technology*, 49 (8), 1918-1924, 2014.
- [25] Vaara M. "Agents that increase the permeability of the outer membrane". *Microbiological reviews*, 56(3), 395-411, 1992.
- [26] Bonnaud M, Weiss J, McClements DJ. "Interaction of a food-grade cationic surfactant (lauric arginate) with food-grade biopolymers (pectin carrageenan xanthan alginate dextran and chitosan)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9770-9777, 2010.
- [27] Loeffler M, McClements DJ, McLandsborough L, Terjung N, Chang Y, Weiss J. "Electrostatic interactions of cationic lauric arginate with anionic polysaccharides affect antimicrobial activity against spoilage yeasts". *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 28-39, 2014.
- [28] Terjung N, Loeffler M, Gibis M, Salminen H, Hinrichs J, Weiss J. "Impact of lauric arginate application form on its antimicrobial activity in meat emulsions". *Food Biophysics*, 9(1), 88-98, 2014.
- [29] Chang Y, McLandsborough L, McClements DJ. "Fabrication stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate)". *Food Chemistry*, 172, 298-304, 2015.
- [30] Nair DVT, Nannapaneni R, Kiess A, Mahmoud B, Sharma CS. "Antimicrobial efficacy of lauric arginate against Campylobacter jejuni and spoilage organisms on chicken breast filets". *Poultry Science*, 93(10), 2636-2640, 2014.
- [31] Sharma CS, Ates A, Joseph P, Nannapaneni R, Kiess A. "Reduction of Salmonella in skinless chicken breast filets by lauric arginate surface application". *Poultry Science*, 92(5), 1419-1424, 2013.
- [32] Oladunjoye A, Soni KA, Nannapaneni R, Schilling MW, Silva JL, Mikel B, Bailey RH, Mahmoud BSM, Sharma CS. "Synergistic activity between lauric arginate and carvacrol in reducing Salmonella in ground turkey". *Poultry Science*, 92(5), 1357-1365, 2013.
- [33] Luchansky JB, Call JE, Hristova B, Rumery L, Yoder L, Oser A. "Viability of Listeria monocytogenes on commercially-prepared hams surface treated with acidic calcium sulfate and lauric arginate and stored at 4 °C". *Meat Science*, 71(1), 92-99, 2005.
- [34] Muriel-Galet V, López-Carballo G, Gavara R, Hernández-Muñoz P. "Antimicrobial effectiveness of lauroyl arginate incorporated into ethylene vinyl alcohol copolymers to extend the shelf-life of chicken stock and surimi sticks". *Food Bioprocess Technology*, 8(1), 208-217, 2015.
- [35] Taormina PJ, Dorsa WJ. "Inactivation of Listeria monocytogenes on hams shortly after vacuum packaging by spray application of Lauric Arginate". *Journal of Food Protection*. 72(12), 2517-2523, 2009.

- [36] Martin EM, Griffis CL, Vaughn KLS, O'Bryan CA, Friedly EC, Marcy JA, Ricke SC, Crandall PG, Lary RY. "Control of *Listeria monocytogenes* by lauric arginate on frankfurters formulated with or without lactate/diacetate". *Journal of Food Science*, 74(6), 237-241, 2009.
- [37] Porto-Fett ACS, Campano SG, Smith JL, Oser A, Shoyer B, Call JE, Luchansky JB. "Control of *Listeria monocytogenes* on commercially- produced frankfurters prepared with and without potassium lactate and sodium diacetate and surface treated with lauric arginate using the Sprayed Lethality in Container (SLIC (R)) delivery method". *Meat Science*, 85(2), 312-318, 2010.
- [38] Stopforth JD, Visser D, Zumbrink R, Van Dijk L, Bontenbal EW. "Control of *Listeria monocytogenes* on cooked cured ham by formulation with a lactate-diacetate blend and surface treatment with lauric arginate". *Journal of Food Protection*, 73(3), 552-555, 2010.
- [39] Saldaña G, Puértolas E, Monfort S, Raso J, Álvarez I. "Defining treatment conditions for pulsed electric field pasteurization of apple juice". *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 29-35, 2011.
- [40] Woodcock NH, Hammond BH, Ralyea RD, Boor KJ. "N alpha-Lauroyl-L-arginine ethylester monohydrochloride reduces bacterial growth in pasteurized milk". *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4207-4210, 2009.
- [41] Cooksey K. Active Packaging and the Shelf Life of Foods. Boca Raton, Florida, USA, CCR Press, 2010.
- [42] Barros-Velázquez J. *Antimicrobial Food Packaging*. 1st ed. USA, Academic Press, 2016.
- [43] Mingming G, Jin TZ, Luxin W, Scullen OJ, Sommers CH. "Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat". *Food Control*, 40, 64-70, 2014.
- [44] Theinsathid P, Visessanguan W, Kruenate J, Kingcha Y, Keeratipibul S. "Antimicrobial activity of lauric arginate-coated polylactic acid films against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on cooked sliced ham". *Journal of Food Science*, 77(2), 142-149, 2012.
- [45] Ruckman SA, Rocabayera X, Borzelleca JF, Sandusky CB. "Toxicological and metabolic investigations of the safety of N-alpha-lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride (LAE)". *Food and Chemical Toxicology*, 42(2), 245-259, 2004.
- [46] European Food Safety Authority. "Revised exposure assessment for ethyl lauroyl arginate for the proposed uses as a food additive". *EFSA Journal*, 10(4), 2652, 2012.
- [47] Muriel-Galet V, Cerisuelo JP, Lopez-Carballo G, Lara M, Gavara R, Hernandez-Munoz P. "Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad". *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 195-201, 2012.
- [48] Ramos M, Jiménez A, Garrigós MC. *Carvacrol-Based films: Usage and potential in antimicrobial packaging*. Editor: Barros-Velázquez J. Antimicrobial Food Packaging, 329-338, USA, Academic Press, 2016.
- [49] Catala R, Muriel-Galet V, Cerisuelo J P, Dominguez I, Carballo GL, Hernández-Muñoz P, Gavara R. *Antimicrobial active packaging systems based on EVOH copolymers*. Editor: Barros-Velázquez J. Antimicrobial Food Packaging, 297-303, USA, Academic Press, 2016.
- [50] Cha DS, Chinnan MS. "Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 223-237, 2004.