

# Engeller teknolojisinde bakteriyosinlerin kullanımı

## Usage of bacteriocins in hurdle technology

Evrım GÜNEŞ-ALTUNTAŞ<sup>1</sup>

### ÖZET

Gıdaların muhafazasında tek bir yöntemin kullanımı yerine birden fazla yöntemin birlikte kullanımının daha iyi sonuçlar verdiği bilinmektedir. Engeller teknolojisi olarak adlandırılan bu teknik, birçok muhafaza yöntemini bünyesinde barındırmaktadır. Engeller teknolojisinde antimikrobiyal maddelerin kullanımı da mümkündür. Bakteriler tarafından üretilen ve gıdalarda özellikle Gram pozitif bakterilere karşı inhibitör etkileri bulunan bakteriyosinlerin bu amaçla kullanımı üzerinde yoğunlaşan çalışmalar bulunmaktadır. Bakteriyosinlerin antibiyotikler ile benzer oldukları düşünülse de gıdalarda antibiyotik kullanımının sınırlı olması ve bakteriyosinlerin insan vücudunda parçalanabilen bileşikler olması bu antimikrobiyal peptitleri daha avantajlı kılmaktadır. Birçok bakteri türü bakteriyosin üretme yeteneğinde olup, ürettikleri bakteriyosinler daha çok yakın türlerine karşı antimikrobiyal etki göstermektedir. Bakteriyosinlerin doğal biyokoruyucu olmalarından dolayı üzerlerinde pek çok çalışma yapılmasını sağlamıştır. Ancak gıdaların raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılan bakteriyosinler, genellikle sadece Gram pozitif bakterilere karşı inhibitör etki gösterebilmektedirler. Bu durum Gram negatif patojenlerin inhibisyonu için sorun teşkil etse de, aslında gıdalarda Gram negatif patojenlerin inhibisyonunda bakteri hücrelerinin parçalanmasını, koruyucu tabaka

### ABSTRACT

It is known that instead of using a single method for food preservation, use of multiple methods provides better results. These multiple methods are known as hurdle technology and incorporate many preservation methods. In hurdle technology it is also possible to use antimicrobial agents. There is some research focusing on usage of bacteriocins which are produced by bacteria and have inhibitor effect against especially Gram positive bacteria for this purpose. Although it is thought bacteriocins are similar to antibiotics, because of usage of antibiotics in foods is limited and bacteriocins are degradable compounds in the human body makes the bacteriocins more advantageous. Many bacterial species produce bacteriocins, that often have an antimicrobial effect on closely related organisms. These compounds have been extensively studied because of being natural biopreservatives. Even when bacteriocins have been used to extend shelf-life of foods, in general they only show inhibitor effect against Gram positive bacteria. Though this is a problem for the inhibition of Gram negative pathogens, actually, bacteriocins can also be applied for the inactivation of Gram negative pathogens in foods in combination with other hurdles or treatments to induce cell damage and partial disorganization of the outer membrane protective layer. Several bacteriocins

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, ANKARA



İletişim / Corresponding Author : Evrim GÜNEŞ - ALTUNTAŞ

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, ANKARA

Tel : +90 312 222 5816

E-posta / E-mail : gunes\_evrim@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 25.03.2013

Kabul Tarihi / Accepted : 17.11.2013

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2014.02419

Güneş-Altuntaş E. Engeller teknolojisinde bakteriyosinlerin kullanımı. Turk Hij Den Biyol Derg, 2014; 71(3): 155-64.

olan dış membranın kısmen bozulmasını sağlayacak diğer engeller ya da uygulamalar ile birlikte kullanılabilirler. Birçok bakteriyosin diğer kimyasal koruyucuları, doğal fenolik bileşikler ve diğer antimikrobiyal proteinleri de içeren antimikrobiyal maddelerle kombine halde kullanıldığında destekleyici ya da sinerjetik etki gösterebilmektedir. Bu uygulama şekli ya da farklı bakteriyosinlerin birlikte kullanımı dirençli mikroorganizmalara karşı etkili bir inhibisyon ortaya koyabilmektedir. Bakteriyosinlerin yüksek basınç uygulaması gibi fiziksel uygulamalar ile kombinasyonu gıda muhafazasında oldukça iyi sonuçlar sunabilmektedir. Bu güne kadar daha çok bakteriyosinlerin ortam pH'sını düşüren bileşiklerle veya etilen diamine tetraasetik asit (EDTA) benzeri kimyasallarla birlikte kullanımları denenmiştir. Bu derlemede, bakteriyosinlerin diğer koruyucu sistemlerle birlikte kullanımı, başka bir deyişle engeller sistemi kapsamındaki farklı kullanımları özetlenmeye çalışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteriyosin, engeller teknolojisi, patojen inhibisyonu

show additive or synergistic effects when used in combination with other antimicrobial agents, including chemical preservatives, natural phenolic compounds, as well as other antimicrobial proteins. This method, as well as the combined use of different bacteriocins can show an effective inhibition against resistance microorganisms. The combination of bacteriocins and physical treatments like high pressure processing also offer good results for more effective preservation of foods. To date, mostly using bacteriocins with the agents reducing the pH of the media or chemicals such as EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) are tested. In this review, different usage of the bacteriocins, in other words different usage of bacteriocins within the scope of hurdle technology have tried to summarize.

**Key Words:** Bacteriocin, hurdle technology, pathogen inhibition

## GİRİŞ

Gıdalarda mikrobiyal yolla ortaya çıkan kayıpların azaltılması insan sağlığı açısından önemli olduğu kadar ekonomik açıdan da önemlidir. Bu nedenle gıdaların daha uzun raf ömrüne sahip olması, bozulmasının önlenmesi ve en önemlisi insan sağlığını tehdit etmeyecek şekilde korunması gerekmektedir (1, 2). Gıda muhafazasında pek çok yöntem kullanılabilir ancak bu tekniklerin kullanımını kısıtlayan en önemli nokta gıdanın yapısının ve doğallığının bozulmamasıdır. Bu güne kadar güvenle kullanılan yüksek sıcaklık uygulamasının özellikle de gıdaların doğal yapısı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle yerini ısılmayan yeni teknikler almaktadır (3).

Dünyada, özellikle de gelişmiş ülkelerde her yıl gıda zehirlenmesi yaşayan insanların oranı %30 civarındadır (4). Gıda zehirlenmelerini önlemek ve gıda güvenliğini sağlamak adına çeşitli kimyasal

maddeler mevcut olmakla birlikte gıdalarda doğal ya da insan metabolizmasını olumsuz etkilemeyen maddeler tercih edilmektedir. Bakteriyosinlerin de aralarında bulunduğu antimikrobiyal bileşikler bu açıdan en umut verici olanlardandır (5, 6). Bu konuda kaydedilen gelişmelere rağmen, daha etkin gıda muhafaza tekniklerine olan ihtiyaç güncelliğini korumaktadır (7). Daha önceleri yaygın şekilde kullanılan tekniklerin yerini zamanla ikili veya daha fazla sayıda tekniğin birlikte kullanımı almaktadır. Engeller teknolojisi olarak da adlandırılan bu yöntemde bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddelerin farklı etkenlerle kombine halde kullanımının etkin sonuçlar ortaya çıkardığı bilinmektedir (8). Bu sayede ayrı ayrı kullanıldığı takdirde ürünün doğal yapısına zarar verebilecek yöntemlerin ürün üzerindeki olumsuz etkileri azaltılırken iki yöntemin yarattığı

sinerjistik etki ile mikroorganizmaların inhibisyonu daha ileri düzeyde sağlanabilmektedir.

Günümüzde, gıdaların muhafazasında ısı olmayan işlemlere doğru artan bir ilgi söz konusudur (9). Bu anlamda özellikle yüksek hidrostatik basınç uygulaması, radyasyon uygulaması, antimikrobiyal madde kullanımı, ultrasound yöntemi, mikro ve ultrafiltrasyon yöntemleri, vurgulu elektrik alan uygulaması gibi teknikler dikkat çekmektedir. Bu tekniklerden yüksek hidrostatik basınç gıda endüstrisi için yeni bir teknik değildir ancak tüketicilerin işlenmiş gıdalara olan talebindeki artış bu teknolojinin yeniden popüler olmasını sağlamıştır (3). Bakteriyosinler ise antimikrobiyal madde kullanımı dahilinde geniş bir yer tutmaktadır.

Modern muhafaza tekniklerinde birbirini tamamlayan alternatif yöntemler tercih edilmektedir. Örneğin pişmiş et ürünlerinde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* sp. inhibisyonunda yüksek basınç uygulamasına ek olarak nisin kullanımı ya da laktat tuzları kullanımı denenebilmektedir. Bu yöntemde yüksek basınç ile zarar gören hücrelerin ikinci bir etken madde ile inhibisyonu daha kolay sağlanabilmektedir. Benzer şekilde bakteriyosinlere daha dirençli olan Gram negatif bakterilere EDTA uygulandığında hücrelerin membran yapıları zarar göreceğinden bakteriyosinlerin etkinliği de artırılabilir (10). Gıdalar kompleks ekosistemler olarak düşünülmesi gereken ortamlardır ve bu ortamda mikrobiyal interaksiyonların faydalı ve zararlı mikroorganizma dengesi üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Bu kompleks ortam içerisinde bakteriyosinlerin etki şekli, pH, sıcaklık, gıdanın yapısı ve bileşimi ile mikroorganizma içeriği gibi pek çok çevresel faktörden etkilenmektedir (7).

Gıdaların muhafazasında genellikle laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen bakteriyosinlerin kullanımı tercih edilmektedir. Laktik asit bakterileri bakteriyosinlerin yanında organik asitler, diasetil, asetoin, hidrojen peroksit, reuterin gibi birçok antimikrobiyal madde üretebilmektedir. Bu bakteriler

ve ürettikleri bileşenleri önemli kılan nokta ise bu grup mikroorganizmaların GRAS (Generally Recognized As Safe) diğer bir deyişle güvenli statüde kabul edilmeleridir (2, 11-14). Bu güne kadar yapılan çalışmalar LAB'ın ürettiği bakteriyosinlerden en çok nisin (ticari adı: Nisaplin) ve pediosin (ticari adı: ALTA 2351) üzerinde yoğunlaşmaktadır. Nisinin ilk ticari formunun 1953 yılında üretilmesinin ardından gıda koruyucusu olarak geniş çapta kullanımı yıllar içinde giderek artmıştır. Günümüzde E-234 numarası ile katkı maddeleri arasında yer alan nisinin kullanım amacı daha çok kremler, konserve gıdalar, peynir ve pastörize sıvı yumurta gibi gıdalarda *Bacillus* ve *Clostridium* gibi Gram pozitif bakterilerin spor formlarını inhibe etmeye yöneliktir (15, 16). Sınıf II a'ya dahil olan ve genellikle *Listeria* patojeni inhibisyonu amacıyla kullanılan pediosin benzeri bakteriyosinlerin ise et, süt ve süt ürünlerinde etkin olduğu Ray ve Miller tarafından bildirilmiştir. Bakteriyosinlerin genellikle Gram pozitif bakterilere karşı etkin oldukları bilinmektedir (17). Fakat Gram negatif bakterilerin hücre duvarları destabilize edilebilirse onlar üzerinde de öldürücü etkileri söz konusu olabilmektedir (8).

Bakteriyosinler patojenlere karşı tercih edilebilecek etkin ve doğal bir yol olmalarına karşın dar etki spektrumlarının olması kullanımlarını sınırlamaktadır (18). Bu nedenle engeller teknolojisi içerisinde bakteriyosinlerin bir basamak olarak yer alması ve diğer bileşenlerle etkisinin desteklenmesi daha başarılı sonuçlar ortaya koyabilmektedir.

## BAKTERİYOSİNLERİN DİĞER KORUYUCU YÖNTEMLERLE BİRLİKTE KULLANIMI

### Bakteriyosinlerin Yüksek Hidrostatik Basınç ile Birlikte Kullanımı

Geleneksel olarak seramik, çelik ve süper alaşım üretimlerinde uygulamaları olan yüksek basınç gıdalarda ilk kez Hite tarafından denenmiştir (19). Yüksek hidrostatik basınç uygulaması

gıdaların raf ömrünün uzatılmasında ve patojen mikroorganizmaların inhibisyonunda başarılı bir şekilde uygulanabilen ısı olmayan bir işlemdir. Pastörizasyon ve sterilizasyon gibi gıdaların yapısını olumsuz etkileyebilecek ısı işlemlerin aksine bu yöntem güvenle kullanılabilir. Yüksek hidrostatik basınç uygulaması, su aktivitesi, pH, sıcaklık veya antimikrobiyal maddeler ile birlikte kullanıldığında antagonistik, destekleyici ya da sinerjistik etki ortaya çıkabilmektedir. Örneğin düşük su aktiviteli gıdalarda, yüksek şeker derişimi mikroorganizmaların basınca karşı hassasiyetini azaltmakta ve dolayısıyla antagonistik etki gözlenmektedir. Buna karşın; düşük pH ve uygun sıcaklıkta uygulanan basınç işlemi ile mikroorganizmaların inaktivasyonu artmakta ve sinerjistik etki ortaya çıkmaktadır (3).

Bu tekniğin başka etkenlerle birlikte kullanımı durumunda mikroorganizmalar üzerinde daha etkili sonuçlar ortaya çıktığı bazı çalışmalarda gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmalardan birinde; yüksek basınç (345 MPa), 50 °C'de bakteriyosin (5000 AU/mL) uygulaması ile birlikte pastörize süt ve portakal suyu örneklerindeki *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* sp. inhibisyonu amacıyla uygulanmıştır (20). Bu denemede portakal suyu örneklerinde tüm patojenlerde sekiz logaritmik birimden daha fazla azalma ile ve 4 °C'de 24 sa. sonunda örneklerde bakteriyel gelişim tespit edilmemiştir. Bunun yanı sıra pastörize süt örneğinde de bakterilerin sekiz logaritmik birimden daha fazla düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Süt örnekleri 25 °C'de 30 güne kadar herhangi bir bakteriyel gelişim gözlenmeden depolanabilmiştir.

Peynirlerde bulunan *S. aureus* patojeni enterotoksin üretmesi bakımından insan sağlığını tehdit edebilmektedir. Bu patojenin peynirde gelişimini inhibe etmek amacıyla bakteriyosin üreten laktik asit bakterisinin starter kültür olarak kullanıldığı bir çalışmada; peynir üretimi sırasında farklı günlerde yüksek basınç uygulaması denenmiştir

(21). Peynir üretiminin üçüncü gününde kontrol örneğinde; *S. aureus* sayısı 6,46 log kob/g iken bakteriyosin üreten kültürle üretilen örnekte bakteri sayısında kontrol örneği ile kıyaslandığında 0,46 log/kob g<sup>-1</sup> azalma görülmüştür. Üretimin üçüncü gününde 300 MPa basınç uygulandığı takdirde bakteri sayısı 1,02 log kob/g azalmış 500 MPa uygulandığında ise 4,00 log kob/g azalmıştır. Buradan yola çıkarak araştırmacılar bakteriyosin üreten starter kültür ile basınç uygulamasının birbirleri üzerinde sinerjistik etki yarattığını düşünmüşler ve bu kombinasyonun peynir üretimini *S. aureus* patojeni açısından daha güvenli hale getirebileceğini bildirmişlerdir.

Çiğ süttten üretilen peynirde bulunan *E. coli* O157:H7 bakterisinin inhibisyonu üzerine yürütülen bir çalışmada; bakteriyosinlerin yüksek basınç ile beraber kullanımı araştırılmıştır (22). Peynirlere 10<sup>5</sup> kob/g seviyesinde *E. coli* O157:H7 bakterisi ve starter kültür olarak bakteriyosin üretme yeteneğinde olan yedi laktik asit bakterisi 10<sup>6</sup> kob/g seviyesinde aşılansmıştır. Peynir örnekleri üretimin ikinci ve 50. günlerinde 10 °C'de 300 MPa basınca 10 dk. ve 500 MPa basınca 5 dk. süresince maruz bırakılmıştır. Bakteriyosin üreten kültürün kullanılmadığı ve basınç uygulanmayan kontrol örneğinde 60 gün sonunda *E. coli* O157:H7 sayısı 5,1 log kob/g olarak hesaplanmıştır. Bakteriyosin üreten kültür kullanımı ile yüksek basınç uygulamasının patojen inhibisyonu üzerinde sinerjistik etki ortaya çıkardığı çalışmada gözlenmiştir. Bakteriyosin üreten LAB ile peynir üretiminin ikinci gününde uygulanan 300 MPa basınç patojen sayısını iki logaritmik birimin altına indirdiği gibi bu uygulama 50. günde denendiğinde bakterilerin peynir üretiminin 60. gününde tamamen inhibe olduğu tespit edilmiştir.

Hispanico peynirleri ile yürütülen bir başka çalışmada; bakteriyosinin kendisi yerine bakteriyosin üreten kültür içeren peynir örneklerine yüksek basınç uygulanmıştır (23). Peynir örneklerinden birisine nisin Z ve laktisin 481 üreticisi olan *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* INIA 415 %0,5 oranında, bakteriyosin

üretmeyen bir mutant suş olan *L. lactis* ssp. *lactis* INIA 415-2 %0,5 oranında ve ticari bir kültür olan *Streptococcus thermophilus* %2 oranında eklenmiştir. 12 °C'de uygulanan 15 günlük olgunlaştırma süresi sonunda örnekler 5 °C'de 10 dk. boyunca 400 MPa basınç uygulanmıştır. Bakteriyosin üreticisi içermeyen ve yüksek basınç uygulanmış örnekte kazein degradasyonu hızlanmış, serbest aminoasit miktarı artmış ama yine de peynirin tadında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Bakteriyosin üreticisi içeren örnekte ise hidrofilik peptitlere kıyasla hidrofobik peptit oranında düşüş, serbest aminoasit sayısında artış ve peynirin tadında iyileşme tespit edilmiştir (23).

Genellikle bakteri sporlarının basınç uygulamasına dirençli olduğu bilinmektedir. Fakat basınç uygulaması bakteriyosin uygulaması ile birlikte kullanıldığında sporların inhibisyonunda olumlu sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir. Et ürünlerinde bozulmaya neden olan *Clostridium* sporları üzerinde yapılan bir çalışmada, 5000 AU/mL düzeyinde bakteriyosin (7:3 oranında nisin ve pediosin karışımı) inoküle edilmiş bifteğe 1-2 x 10<sup>2</sup> spor/paket düzeyinde *Clostridium laramie* aşılmıştır. Çalışmada; biftek örnekleri 60 °C'de 5 dk. süresince 345 MPa basınca maruz bırakıldıktan sonra 4 °C'de 84 gün başarıyla depolanabilmiştir (24).

Garriga ve ark., et ürünlerinde ortaya çıkabilen ve sonradan bulaşma sorununa çözüm olarak yüksek basınç uygulaması ile birlikte bakteriyosin kullanımını önermişlerdir (25). Yapılan çalışmada; etlere 17 °C'de 10 dk. süresince 400 MPa basınç uygulanmış ve ardından enterosin A ve B, sakasin K, pedyosin ACH veya nisin et ürünlerine eklenmiştir. Özellikle 4 °C'de depolanan et ürünlerinde *E. coli* bakterisinin sayısında altı logaritmik birimden fazla azalma tespit eden araştırmacılar bakteri sayısının 61 gün boyunca artmadığını da gözlemlemişlerdir. Bu sonuç dışında çalışmada; *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser London, *S. enterica* subsp. *enterica* Schwarzengrund,

*Staphylococcus* bakterileri üzerinde de olumlu sonuçlar elde edilebilmiştir.

#### Bakteriyosinlerin Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) ile Birlikte Kullanımı

Bakterilerin hücre duvarlarında gliserofosfolipitler ve lipopolisakaritler bulunmaktadır. Metaller ile şelat oluşturabilen EDTA gibi maddeler ile bakteri hücreleri muamele edildiğinde lipopolisakarit tabakasından divalent katyonların ayrılması söz konusu olmaktadır. Özellikle de Gram negatif bakterilerin dış membranında Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> iyonları EDTA ile kenetlenmektedir. Bu durum hücre duvarının stabilitesini bozduğu gibi geçirgenliğini de değiştirmektedir. Sonuçta hücre duvarı zarar görmüş hücreler bakteriyosin benzeri maddelere maruz kaldıklarında daha hassas bir yapı sergilemektedirler (26). Günümüzde çeşitli gıdalarda kullanılan EDTA'nın günlük alınmasına izin verilen miktar (ADI: acceptable daily intake) serbest asit formu için 1,9 mg/kg vücut ağırlığı, gıda katkısı olarak kullanılan kalsiyum disodyum asetat formu için 2,5 mg/kg vücut ağırlığı olarak tespit edilmiştir (27). Buradan yola çıkarak EDTA'nın diğer inhibitör etkenlerle birlikte kullanıldığında bu inhibitörlerin etkilerini artırıcı özellik gösterdiği söylenebilir. Bakteriyosin aktivitesinin EDTA'dan olumsuz etkilenebileceğini belirten çalışmalar olsa da daha çok aksini belirten çalışmalar da bulunmaktadır (28-33). Bu iki inhibitör maddenin birlikte kullanıldığı takdirde başarılı sonuçlar ortaya çıkardığını bildiren araştırmalardan biri Bizani ve ark., tarafından yürütülmüştür (34). Bu çalışmada; *Bacillus cereus* 8A tarafından üretilen ve bakteriyosin benzeri bir antimikrobiyal madde olan cerein 8A'nın *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *Salmonella enteritidis* gibi patojenler üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Cerein 8A'nın bu Gram negatif bakteriler üzerinde gösterdiği etki EDTA ortama eklendiğinde çok daha iyi düzeyde gözlenebilmiştir. Örneğin cerein 8A 400 AU/mL düzeyinde ortama eklendiğinde *S. enteritidis* üzerinde kontrol örneğine

göre iki logaritmik birim indirgeme sağlarken aynı derişimdeki cerein 8A, 20 mmol EDTA/L ile birlikte kullanıldığında kontrol örneğine göre yaklaşık üç logaritmik birim indirgeme sağlayabilmiştir.

*E. coli*'nin Tryptic Soy Broth (TSB) besi ortamında 21 °C ve 6 °C'lerde bakteriyosin ve şelat oluşturucu maddelerle inhibisyonu Belfiore ve ark., tarafından araştırılmıştır (26). Tek başına kullanıldıklarında bakteri üzerinde yeterince etki gösteremeyen maddelerin engeller teknolojisi içerisinde kullanıldığında başarılı sonuçlar verdiği bu çalışmada da gözlenmiştir. Özellikle de düşük sıcaklık derecelerinde EDTA (500 ve 1000 mmol/L derişimlerinde) ile muameleden sonra uygulanan Na-laktat ve laktosin 705/AL705, bu gıda kaynaklı bakterinin kontrolünde daha etkin sonuçlar ortaya koymuştur. Benzer bir çalışmada; *E. coli* O157:H7 ile inoküle edilmiş et örneklerine bakteriyosin üretme yeteneğinde olan *Lactobacillus curvatus* CRL705 ve *Lactococcus lactis* CRL1109 koruyucu kültürleri ile birlikte Na<sub>2</sub>EDTA uygulanmış ve örnekler 5 °C'de dokuz gün süresince depolanmışlardır. Tek başına koruyucu kültür eklenmiş et örneklerinde patojen inhibisyonu gözlenmezken koruyucu kültüre (yaklaşık 10<sup>7</sup> kob/g) ek olarak Na<sub>2</sub>EDTA (48 mM) uygulanmış örneklerde depolamanın sıfırıncı gününde kontrol örneğine kıyasla *E. coli* sayısında bir logaritmik birim (kob/g) azalış tespit edilmiştir (35).

Bakteriyosinler genellikle Gram pozitif bakterilere karşı etki gösteren bileşikler olarak bilinmektedirler. Gram negatif bakteriler üzerinde etki gösterememe nedenleri ise genellikle Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısı ile ilişkilendirilmektedir. Bakteriyosin ile EDTA benzeri maddelerin birlikte kullanılması Gram negatif bakterilere de bakteriyosinlerin inhibitör etki göstermesine olanak vermektedir. Liu ve ark., bu konuda yürüttükleri çalışmada; Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* O157:H7 üzerinde Nisaplin ile EDTA'nın birlikte kullanımının sinerjistik etki yarattığını belirlemişlerdir (36).

### Bakteriyosinlerin Sıcaklık Uygulaması ile Birlikte Kullanımı

Bakteriyosin ile gıdalarda patojenlerin inhibisyonu üzerinde yapılan çalışmalardan büyük bir çoğunluğu sıcaklık faktörünü de yaptıkları denemelerde gözlemlemeye çalışmışlardır. Bu konuda yapılan bir çalışmada; bakteriyosin üreten *Lactobacillus sakei* CTC 494 suşunun MRS besi ortamındaki *Listeria* patojeni üzerindeki inhibitör etkisi üzerine sıcaklık, pH ve ortamdaki besin içeriğinin etkisi matematiksel model ile ortaya koyulmaya çalışılmıştır (37). Çalışmadan elde edilen sonuçlar; uygun kombinasyonlarda bakteriyosin üretiminin daha çok olacağı ve dolayısıyla da patojenin inhibisyonunun artabileceğini göstermiştir. Genel olarak ifade etmek gerekirse bakterinin optimum gelişme sıcaklığının da dahil olduğu 20-30 °C aralığında bakteri gelişimi ve bakteriyosin üretimi daha iyi olduğundan *Listeria* üzerindeki inhibisyon etki bu aralıkta daha etkin olmuştur. Yine ortamdaki besin içeriği bakteri gelişimini indüklemiş ve laktik asit üretimi artmıştır. Artan laktik asit ise ortam pH'sını düşürdüğü gibi, bakteriyel gelişimi inhibe eden tampon bileşiklerin miktarında da değişikliğe sebep olmuştur.

Sosis üretiminde bakteriyosin üreten kültür kullanıldığında bu bakterinin etkinliğini artıran ve azaltan etkenleri araştırılan çalışmada; eğer uygun sıcaklık ve pH ortamında sosis üretilirse bakteriyosin üretiminin daha iyi olacağı ve patojen inhibisyonunun artacağı görülmüştür. Ancak sosis üretiminde kullanılan tuz ve sodyum nitritin bakteriyosin üretimini olumsuz etkilediği de belirtilmiştir. Soside bulunan yağ molekülleri miktarı fazla olduğunda ise bakteriyosinin suda çözünürlüğü azaldığından, bakteriyosin etkin şekilde aktivite gösterememiştir (38).

Daha çok etlerde bakteriyosinleri de içeren engeller teknolojisinin kullanımını konu alan bir derlemede araştırmacılar en önemli engel parametresinin sıcaklık olduğunu vurgulamaktadır. Etlerin düşük sıcaklıkta

saklanması mikrobiyal gelişmeyi ve biyokimyasal reaksiyonların yavaşlamasını sağlayarak ilk engel parametresini oluşturmaktadır. Etlerin saklanması vakum paket uygulamasının, laktik asit bakterisi gibi koruyucu kültür uygulamasının etlerin raf ömrünü uzatmada tercih edilebileceği de bildirilmektedir. Koruyucu kültür olarak kullanılan LAB bu özelliklerini asit benzeri maddeler üretmeleri ile olduğu gibi bakteriyosin üretebilmeleri ile de sağlamaktadırlar (39).

#### **Bakteriyosinlerin Başka Etkenlerle Birlikte Kullanımının Denendiği Diğer Çalışmalar**

Bakteriyosinlerin engeller teknolojisi içerisinde yaklaşık 60 kadar farklı uygulaması bulunmaktadır. Bunlar arasında organik asitlerle birlikte kullanımı düşük pH ortamlarında bakteriyosinlerin net yükündeki artışa neden olarak, bakteriyosinlerin hücre duvarından geçişini kolaylaştırabilmektedir (8).

Özellikle piyasada steril halde olmayan toz bebek mamalarında patojen bulunma riski söz konusu olabilmektedir. Bu tarz mamaların hazırlanışı sırasında yapılan uygulama hataları bebekler için risk teşkil etmektedir (40, 41). Bebek mamalarında soruna neden olan *Cronobacter* spp. üzerine organik asitler, bakteriyosinler ve laktoperoksidaz sisteminin farklı kombinasyonlarının etkisi Oshima ve ark., tarafından araştırılmıştır (9). Araştırmada; laktoperoksidaz sistemi nisin ya da laktisin 3147 ile kombine halde kullanıldığında *Cronobacter* spp. bakterisinin toz bebek mamasında 37 °C'de sekiz saat boyunca gelişiminin inhibe olduğu gözlenmiştir. Ayrıca laktoperoksidaz sistemi ile laktisin 3147 birlikte kullanıldığında ve toz bebek maması 40-50 °C sıcaklıktaki su ile hazırlandığında *Cronobacter* spp. gelişiminin 12 sa. boyunca engellenebildiği tespit edilmiştir. Bu durum bebek mamaları hazırlanırken düşük sıcaklıkta su kullanılması ya da hazırlanan bebek mamalarının uzun süre bekletilmesi durumlarına karşı bir çözüm önerebilmektedir.

Bu çalışmalardan farklı olarak Gooteland ve ark.'nın düzenlediği derleme çalışmasında; probiyotik kültürlerin hem bakteriyosin üretimleri hem de organik asit üretimlerinin etkisi ile *Helicobacter pylori* üzerinde inhibisyona neden olduğu bildirilmektedir (42). Bilindiği gibi *H. pylori* midede yanma ve benzeri sorunlara neden olan bir bakteridir. Bu bakteri ile mücadelede antibiyotiklere alternatif olarak bakteriyosin üretme yeteneğinde olan probiyotiklerin denenebileceği düşünülmektedir.

Altı farklı esansiyel yağ (*Origanum vulgare*, *Cinnamomum cassia*, *Brassica hirta*, *Thymus vulgaris*, *Satureja montana*, ve *Cymbopogon nardus*) ile dört farklı bakteriyosinin (nisin, pediosin, ve *Enterococcus faecium* MT 104 ve MT 162 tarafından üretilen iki bakteriyosin) patojenler üzerindeki inhibitör etkisi Turgis ve ark., tarafından araştırılmıştır. Çalışmada, antimikrobiyal etki minimum inhibisyon derişimi yöntemi ile 96 kuyucuklu plaka kullanılarak gözlenmiştir (43). Araştırmacılar esansiyel yağlar ile bakteriyosinlerin patojen inhibisyonunda sinerjistik etki gösterdiğini açıklamışlardır.

Hücre duvarı üzerinde etkili bir ajan olan Tris'in AS-48 bakteriyosininin antimikrobiyal aktivitesine etkisinin araştırıldığı bir çalışma Abriouel ve ark., tarafından yürütülmüştür (32). 100 mmol/L Tris tek başına *Salmonella choleraesuis* üzerinde 0,18 logaritmik birim azalma sağlarken 200 µg/mL AS-48 bakteriyosini ile birlikte kullanıldığında bu logaritmik indirgenme 2,64 seviyesine çıkmıştır.

Elamathy ve Kanchana; *Lactobacillus acidophilus* tarafında üretilen bakteriyosinin *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Klebsiella*, sp. gibi gıda patojenleri üzerindeki antimikrobiyal etkisinin ortama Tween 80, SDS veya EDTA'nın %0,05-1,0 oranında eklenmesi durumunda artacağını bildirmişlerdir (33).

## SONUÇ

Birçok bakteri tarafından üretilen bakteriyosinler, özellikle de yakın türlerine etki gösterebilen protein yapısında toksinler olarak bilinmektedir. Bu antimikrobiyal bileşiklerin gıdalarda potansiyel koruyucular olarak görülmesinin önemli nedenleri arasında ökaryot hücreler üzerinde etkili olmamaları, insan bağırsak sistemine zarar vermemeleri, proteazlar tarafından inaktive edilmeleri ve gıdalarda kullanılmalarının güvenilir olması gibi pek çok neden sayılabilir. Bakteriyosinlerin gıda sistemlerindeki etkinliği gıdaların işleme koşulları, depolama koşulları, gıdanın bileşimi ve pH'sı gibi faktörlerle ilişkili olabilmektedir ve bu durum bazen bakteriyosinlerin koruyucu olma

potansiyelini sınırlamaktadır. Bu peptitlerin gıda sistemlerinde tek başlarına kullanılmalarının yerine engeller teknolojisi kapsamında diğer koruyucu tekniklerle birlikte kullanımının daha etkili olduğu bu derleme kapsamında da anlatıldığı gibi pek çok çalışmada bildirilmektedir. Yüksek hidrostatik basınç uygulaması, EDTA benzeri şelat oluşturuucu madde kullanımı, yüksek sıcaklık uygulaması, organik asit kullanımı bakteriyosinlerin patojenler üzerindeki inhibisyon etkisini artırmaktadır. Bu konuda kaydedilecek yeni gelişmeler sayesinde gıdaların korunması tüketicilerin de talepleri doğrultusunda doğal yöntemlerle etkin bir şekilde gerçekleştirilebilir.

## KAYNAKLAR

1. Topal Ş. Gıda güvenliği ve kalite yönetim sistemleri, Kocaeli; TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Matbaası Basımı, 1996.
2. Galvez A, Lopez RL, Abriouel H, Valdivia E, Omar NB. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol*, 2008; 28: 125-52.
3. Barbosa Canovas GV, Gongora-Nieto MM, Rodriguez JJ, Swanson BG. Nonthermal processing of foods and emerging technologies. In: *Food Engineering: Encyclopedia of Life Support Sciences*. Barbosa-Cánovas GV ed. Paris, EOLSS Publishers, 2005; 575-93.
4. Anonymous. Food safety and foodborne illness. Fact Sheet Number 237. Geneva, World Health Organization, 2007.
5. Bromberg R, Moreno I, Lopes Zaganini C, Delboni RR, de Oliveira J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Braz J Microbiol*, 2004; 35: 137-44.
6. Javed I. Characterization of bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from dairy products. PHD thesis, Department of Microbiology at Quaid-i-Azam University in Islamabad, 2009.
7. Galvez A, Abriouel H, Lopez RL, Omar NB. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*, 2007; 120 (1-2): 51-70.
8. Mills S, Stanton C, Hill C, Ross RP. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2011; 2: 299-329.
9. Oshima S, Rea MC, Lothe S, Morgan S, Begley M, O'Connor PM, et al. Efficacy of organic acids, bacteriocins and the lactoperoxidase system in inhibiting the growth of *Cronobacter* spp. in rehydrated infant formula. *J Food Prot*, 2012; 75(10): 1734-42.
10. Fadda S, Lopez C, Vignolo G. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Sci*, 2010; 86(1): 66-79.



11. Altuntas EG, Cosansu S, Ayhan K. Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13. *Int J Food Microbiol*, 2010; 141(1-2): 28-31.
12. Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, Ambrosiadis I, Koidis P. Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation: purification, characterisation and properties of the produced pediocin SM-1. *Enzyme Microb Tech*, 2008; 43(6): 448-54.
13. Ayhan K, Coşansu S, Mol S, Güneş E. Sucuktan izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi ve bakteriyosin üreten türlerin seçimi. Proje numarası:2007-0745-001HPD, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu, 2008.
14. De Martinis ECP, Freitas FZ. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control*, 2003; 14:197-200.
15. Ayhan K, Aydar LY, Durlu F, Tunail N. *Lactococcus lactis* subsp. LL37 suşunun nisin üretiminde fermentasyon parametrelerinin belirlenmesi ve nisinin preparasyonu. *KÜKEM Derg*, 1996; 19(2): 49-58.
16. Adams M. Nisin in multifactorial food preservation. In: Roller S, ed. *Natural Antimicrobials for The Minimal Processing of Foods*. Chapter 2. Woodhead Publishing Roller, 2003; 306.
17. Ray B, Miller W. Bacteriocins other than nisin: The pediosin-like cystibiotics of lactic acid bacteria. In: Roller S, ed. *Natural Antimicrobials for The Minimal Processing of Foods*. Chapter 4. Woodhead Publishing Roller, 2003; 306.
18. Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP, Soccol CR. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Braz Arch Biol Technol*, 2007; 50(3): 521-42.
19. Hite BH. The effect of pressure in the preservation of milk. *Bull W Virginia Univ Agr Exp Stat*, 1899; 58: 15-55.
20. Alpas H, Bozoglu F. The combined effect of high hydrostatic pressure, heat and bacteriocins on inactivation of foodborne pathogens in milk and orange juice. *World J Microbiol Biotechnol*, 2000; 16: 387-92.
21. Arques JL, Rodriguez E, Gaya P, Medina M, Guamis B, Nunez M: Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin producing lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol*, 2005; 98(2):254-60.
22. Rodriguez E, Arques JL, Nunez M, Gaya P, Medina M. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. *Appl Environ Microbiol*, 2005; 71(7): 3399-404.
23. Avila M, Garde S, Gaya P, Medina M, Nunez M. Effect of high-pressure treatment and a bacteriocin-producing lactic acid culture on the proteolysis, texture, and taste of Hispánico cheese. *J Dairy Sci*, 2006; 89(8): 2882-93.
24. Kalchayanand N, Dunne CP, Sikes A, Ray B. Inactivation of bacterial spores by combined action of hydrostatic pressure and bacteriocins in roast beef. *J Food Saf*, 2003; 23(4):219-31.
25. Garriga M, Aymerich MT, Costa S, Monfort JM, Hugas M. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol*, 2002; 19(5):509-18.
26. Belfiore C, Castellano P, Vignolo G. Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. *Food Microbiol*, 2007; 24(3):223-9.
27. Anonymous. Diquat in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva; World Health Organization (WHO) (WHO/SDE/WSH/03.04/91), 2003.
28. Aslam M, Shahid M, Rehman FU, Naveed NH, Batool AI, Sharif S, et al. Purification and characterization of bacteriocin isolated from *Streptococcus thermophilus*. *Afr J Microbiol Res*, 2011; 5(18): 2642-8.
29. Todorov SD, Dicks LMT. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. *Braz J Microbiol*, 2007; 38(1):166-72.
30. Martin-Visscher LA, Yoganathan S, Silt CS, Lohans CT, Vederas JC. The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiol Lett*, 2011; 317(2): 152-9.

31. Pinto AL, Fernandes M, Pinto C, Albano H, Catilho F, Teixeira P, et al. Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int J Food Microbiol*, 2009; 129(1): 50-8.
32. Abriouel H, Valdivia E, Galvez A, Maqueda M. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. *Appl Environ Microbiol*, 1998; 64(11): 4623-6.
33. Elamathy S, Kanchana D. Characterization of heat stable and inhibitory activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Int J ChemTech Res*, 2013; 5(3): 1281-3.
34. Bizani D, Motta AS, Morrissy JA, Terra RM, Souto AA, Brandelli A. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *Int Microbiol*, 2005; 88(2):125-31.
35. Castellano P, Belfiore C, Fadda S, Vignolo G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Sci*, 2008; 79(3): 483-99.
36. Liu L, Jin T, Coffin DR, Liu CK, Hicks KB. Poly (lactic acid) membranes containing bacteriocins and EDTA for inhibition of the surface growth of Gram-negative bacteria. *J Appl Polym Sci*, 2010; 117(1): 486-92.
37. Leroy F, De Vuyst L. A combined model to predict the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494. *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69(2): 1093-9.
38. Leroy F, De Vuyst L. Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. *Int J Food Microbiol*, 2005; 100(1-3): 141-52.
39. Castellano P, Belfiore C, Vignolo G. Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground-beef patties. *Food Control*, 2011; 22(8): 1461-5.
40. Iversen C, Waddington M, On SL, Forsythe S. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. *J Clin Microbiol*, 2004; 42(11): 5368-70.
41. Drudy D, Mullane NR, Quinn T, Wall PG, Fanning S. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. *Clin Infect Dis*, 2006; 42(7): 996-1002.
42. Gotteland M, Brunser O, Cruchet S. Inhibition of *H. pylori* by organic acid and bacteriocin-producing probiotics. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006; 23(8): 1077-86.
43. Turgis M, Vu KD, Dupont C, Lacroix M. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Res Int*, 2012; 48: 696-702.