

## ENTEROSİN KP’NİN İNHİBİTÖR AKTİVİTESİ ÜZERİNE SODYUM KLORÜR VE ASİTLİĞİN ETKİSİ

**Zeliha YILDIRIM\***, Yaselin İLK, Metin YILDIRIM

<sup>1</sup>Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Ömer Halisdemir Üniversitesi, Niğde, Türkiye

Geliş / Received: 06.10.2016

Düzeltilmelerin gelişi / Received in revised form: 09.11.2016

Kabul / Accepted: 09.11.2016

### ÖZ

Bu çalışmada, *Enterococcus faecalis* KP tarafından üretilen enterosin KP'nin inhibitör aktivitesi ve spektrumu üzerine NaCl ile pH'nın etkisi incelenmiştir. Test mikroorganizması olarak *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium kullanılmıştır. Araştırma sonucunda %4-7 oranında NaCl ile birlikte kullanılan enterosin KP'nin inhibitör aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca düşük pH (5,0-5,3) koşullarının da enterosin KP'nin aktivitesinin artmasına ve hatta *Escherichia coli* O157:H7'nin de enterosin KP'ye karşı duyarlı hale gelmesine yol açtığı gözlenmiştir. Buna karşın, asidik ve nötral pH değerleri enterosin KP aktivitesini etkilememiştir. Sonuç olarak, enterosin KP düşük pH koşullarında ve NaCl ile birlikte kullanıldığında sinerji etkisinin olduğu ve buna paralel olarak inhibitör aktivitesinin arttığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Enterosin KP, *Enterococcus faecalis* KP, NaCl, pH

## EFFECT OF SODIUM CHLORIDE AND ACIDITY ON INHIBITORY ACTIVITY OF ENTEROCIN KP

### ABSTRACT

In this study, the effect of NaCl and pH on the inhibitory spectrum and activity of enterocin KP produced by *Enterococcus faecalis* KP was determined. *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium were used as target microorganisms. At the end of the study, the inhibitory activity of enterocin KP was increased in the presence of NaCl at concentrations of 4-7%. Also, low pH (5.0-5.3) condition either caused an increase enterocin KP activity or rendered *Escherichia coli* O157:H7 sensitive to enterocin KP. However, acidic and neutral pH did not affect its activity. In conclusion, a synergist effect was occurred and inhibitory activity of enterocin KP increased when it was used in combination with NaCl or under acidic condition.

**Keywords:** Enterocin KP, *Enterococcus faecalis* KP, NaCl, pH

### 1. GİRİŞ

Günümüzde gıdaların güvenliğini ve raf ömrünü iyileştirmek amacıyla muhafaza yöntemlerinden biyokoruma tekniği oldukça ilgi görmektedir. Biyokoruma tekniğinde gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların imhasında, koruyucu kültürler ve/veya bunlar tarafından üretilen antimikrobiyal bileşikler kullanılmaktadır. Biyokoruma yöntemlerinden birisi de laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin kullanılmasıdır. Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, küçük katyonik, hidrofobik

\*Corresponding author / Sorumlu yazar. : Tel: +90 388 225 2354; e-mail/e-posta: zeliha.yildirim@ohu.edu.tr

*ENTEROSİN KP'NİN İNHİBİTÖR AKTİVİTESİ ÜZERİNE SODYUM KLORÜR VE ASİTLİĞİN ETKİSİ*

veya amfifilik karakterde antimikrobiyal proteinler veya peptitlerdir. Bakteriyosinler gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilere karşı etkilidirler. Bakteriyosinler önemli biyokoruyucular arasında yer almaktadır. Çünkü doğal kaynaklı ve güvenli olup insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmakta ve gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın gıda kaynaklı bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etmektedirler [1-3].

Bakteriyosinler duyarlı bakterilerin hücre membranlarını destabilize ederek antimikrobiyal etkilerini göstermektedirler. Bakteriyosinler, membranın negatif yüklü fosfolipit gruplarına ya da protein yapıları reseptörlere bağlanarak membran içine girerler ve gözenekler oluşturarak potasyum, inorganik fosfat ile ATP sızmasına ve buna paralel olarak membran iyonik dengesinin bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda membran potansiyeli ( $\Delta\psi$ ) ve/veya pH gradienti ( $\Delta\text{pH}$ ) kısmen veya tamamen yok olmakta ve proton itici güç ortadan kalkmaktadır. Proton itici gücün yok olması veya bozulması direkt olarak hücrenin ölümüne neden olmaktadır [4, 5].

Laktik asit bakterilerin ürettiği bakteriyosinlerin büyük bir çoğunluğunun antimikrobiyal spektrumlarının dar olması ve gıda bileşiminin koruyucu etkisi gibi faktörler bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanılabilirliğini sınırlamaktadır [6]. Bakteriyosinler gıda sistemlerinde besiyerlerine göre daha az etkilidirler [7]. Çoğu zaman gıdada aynı etkiyi elde etmek için yaklaşık 10 kat daha fazla bakteriyosin ilavesi gerekmektedir. Çünkü gıda uygulamalarında bakteriyosinlerin etkinliği gıda ile ilgili birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler (i) gıda işleme koşulları, (ii) depolama sıcaklığı ve koşulları, (iii) gıdanın pH'sı, (iv) gıdada bulunan enzimler, (v) gıdaya katkı maddeleri, (vi) bakteriyosinlerin gıda bileşenlerine adsorpsiyonu, (vii) gıda matrisinde düşük çözünürlüğe sahip olmaları ve homojen olarak dağılmamalarıdır [8-10].

NaCl ve pH bakteriyosin aktivitesi üzerinde çok etkili olabilen faktörler arasında yer almaktadır. Nisin, sakasin P ve kurvasin A bakteriyosinlerinin asidik pH değerinde aktivitelerinin arttığı, hatta *E. coli* ve *Salmonella* Enteritidis'e karşı bile aktif oldukları gözlenmiştir. Fakat nötral veya alkali pH'da çok düşük veya hiç aktivite göstermedikleri belirlenmiştir. Sakasin P'nin aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin diğer iki bakteriyosine göre daha fazla olduğu bulunmuştur [11]. Kimi araştırmacılar tuzun bazı bakteriyosinler üzerinde antagonistik etkiye sahip olduğunu bildirirken [12-14], kimi araştırmacılar ise tuz varlığında bazı bakteriyosinlerin aktivitelerinin değişmediği, hatta arttığını belirtmişlerdir [11, 15-18].

Starter kültür kullanılmaksızın geleneksel olarak üretilen Beyaz peynirden izole edilen *Enterococcus faecalis* KP tarafından sentezlenen enterosin KP'nin *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* gibi bazı gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [19]. Bu çalışmanın amacı enterosin KP'nin inhibitör aktivitesi üzerine pH ve NaCl'ün etkisini belirlemektir.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Mikroorganizmalar ve Besiyerleri

Bu çalışmada, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium test mikroorganizması, *Enterococcus faecalis* KP ise enterosin KP üreticisi olarak kullanılmıştır. Laktik asit bakterileri de Mann Rogosa and Sharpe (MRS, Fluka), diğer bakteriler ise Brain Hearth Infusion (BHI, Merck) besiyerinde geliştirilmiştir. *E. faecalis* KP ve *Lb. plantarum* 32°C'de, diğer bakteriler ise 35-37°C'de geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılan bütün bakteriler -80°C'de %20 gliserol içeren uygun besiyerlerinde muhafaza edilmiştir.

### 2.2. Enterosin KP'nin Hazırlanması

MRS besiyerine %0,1 oranında inoküle edilen *E. faecalis* KP, 32°C'de 18 saat inkübasyon işlemine tabi tutulduktan sonra santrifüj edilip (6000xg, 20 dk) filtrat (süpernatant) kısmı toplanmıştır. Süpernatantın pH'sı 10 N NaOH kullanılarak 6,5'e ayarlanıp 0,45 µm gözenek çaplı membran filtresi ile sterilize edilmiştir. Süpernatanta yavaş yavaş %40 oranında amonyum sülfat ilave edildikten sonra 4°C'de gece boyunca karıştırılmıştır. Karışım santrifüj (4°C'de 8000xg, 60 dk) edildikten sonra yüzeyde ve altta biriken pelet toplanarak 10 mL sodyum fosfat tamponunda (pH 6,5) çözündürülmüştür. Bunu takiben 15 mL metanol/kloroform karışımı (1:2, v/v) ilave edilerek 4°C'de 1 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Örnek santrifüj edildikten sonra pelet liyofilizasyon yöntemiyle kurutularak -80°C'de muhafaza edilmiştir. Hazırlanan bakteriyosin örneğinin inhibitör aktivitesini belirlemek için ikinin katları şeklinde dilüsyonları hazırlanmış ve *Lb. plantarum*'a karşı inhibitör aktivitesi agar-spot yöntemine göre belirlenmiştir. Enterosinin aktivitesi Arbitrary Unite (AU) olarak ifade edilmiştir. Arbitrary ünite, inhibisyon aktivitesi gösteren en son dilüsyonun tersidir [20].

### 2.3. NaCl ve pH'nın Enterosin KP'nin Aktivitesi Üzerine Etkisi

NaCl farklı oranlarda (%2, 4 ve 7) BHI veya MRS besiyerine ilave edildikten sonra ortamın pH'sı 6,5'e 4 M HCl veya 4 M NaOH ile ayarlanmış ve membran filtrasyonu ile sterilize edilmiştir. Enterosin KP aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla BHI veya MRS besiyerinin pH'sı 5,0, 5,5, 6,0 ve 6,5'e 4 M HCl veya 4 M NaOH ile ayarlanıp filtrasyonla sterilize edilmiştir. pH'nın enterosin KP aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için test mikroorganizmaları ilave edildikten (600 nm'de absorbans değeri 0,1) sonra enterosin KP katılmış (1600 AU/mL) ve her bakteri optimum gelişebildiği sıcaklıkta 16 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işleminin belirli aralıklarında örnekler alınıp 600 nm'de absorbans değeri okunmuştur[11].

### 2.4. Gelişmeyen *E. coli* O157:H7 Hücrelerine Karşı NaCl ve pH'nın Enterosin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bir gün önce geliştirilen *E. coli* O157:H7 kültürü santrifüj edildikten sonra pelet tuz çözeltisi (8,5 g/L NaCl, 1 g/L tripton) ile 2 kez yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Hücreler 5,0, 5,3 ve 6,5 pH sitrat fosfat tamponunda (70 mM sitrik asit ve 140 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) veya %7 oranında tuz içeren sitrat fosfat tamponunda (pH 6,5) süspansiyon edilmiştir. Hazırlanan örnekler son aktivitesi 1600 AU/mL olacak şekilde enterosin KP ilave edilmiştir. 0., 4., 8. ve 16. saatlerde örnek alınıp dilüsyonlar hazırlandıktan sonra BHI agar besiyeri kullanılarak yayma yöntemiyle ekim yapılmış ve 35°C'de 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu sürenin sonunda koloni sayımı yapılmıştır.

### 2.5. İstatistiksel Analizler

Araştırmada bütün analizler 4 tekerrür olarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmadan elde edilen veriler p<0,05 seviyesinde varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılık ise LSD testi kullanılarak (p<0,05) belirlenmiştir [21].

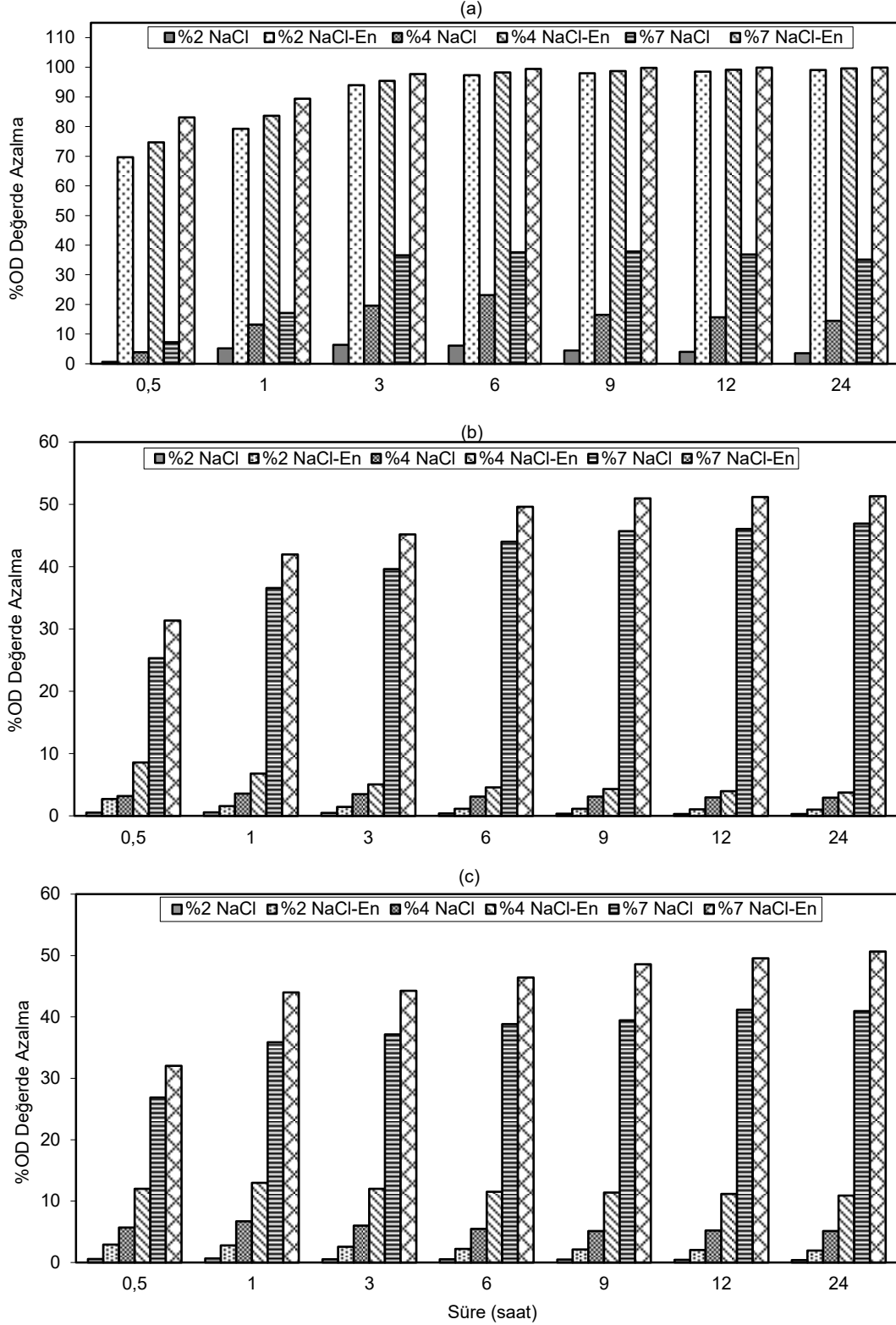
## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 3.1. Enterosin KP'nin Aktivitesi Üzerine NaCl'ün Etkisi

Fermente gıdalarda, muhafaza genellikle asitlendirme ve NaCl'ün kombine etkisiyle sağlanmaktadır. Ayrıca, starter kültürlerin ürettiği bakteriyosin gibi bileşikler de asit ve tuzun koruyucu etkisine iştirak edebilmektedir. NaCl'ün enterosin KP'nin aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için %0, 2, 4 ve 7 oranında NaCl konsantrasyonları seçilmiştir. Bu konsantrasyonlar çeşitli gıdalara (peynir, sucuk, sosis, turşu vb.) katılan tuz miktarları göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. İndikatör organizma olarak da *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium kullanılmış ve analiz sonuçları Şekil 1'de verilmiştir. Şekil 1a'da görüldüğü üzere, %2 ve %4 oranında NaCl ilavesinin *L. monocytogenes* gelişimini 24 saatlik inkübasyon süresince önemli düzeyde engellemediği (p>0,05), ancak %7 oranında NaCl'ün ortamda bulunması istatistiksel olarak önemsiz de olsa bakteri gelişimini bir dereceye kadar önlediği belirlenmiştir (p>0,05). İnkübasyon işleminin sonunda kontrol örneğin absorbans değeri 1,557 iken, %7 NaCl içeren örneğin 1,084 bulunmuştur. İki örnek arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,01). NaCl ve enterosin KP kombinasyonlarının kullanıldığı örnekler sadece enterosin KP içeren örneklerle karşılaştırıldığında, tuzun bakteriyosin aktivitesi üzerinde bir antagonistik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Enterosin KP içeren örneğin absorbans değeri ile %2 ve %4 oranında NaCl ve enterosin KP içeren örneklerin absorbans değerleri arasındaki farkın önemli olmadığı (p>0,05), ancak %7 NaCl ve enterosin KP içeren örneğin absorbans değeri arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur (p<0,01). Yüksek oranda NaCl (%4 ve 7) ve enterosin KP içeren örneklerde bakteri gelişiminin tamamen önlediği belirlenmiştir. Bunun nedeni tuz ve enterosin KP'nin antimikrobiyal etkinliklerinden kaynaklanmaktadır. *L. monocytogenes*'te olduğu gibi %2 ve %4 oranında NaCl kullanımının *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium gelişimini önlemediği, fakat %7 oranında NaCl'ün ortamda bulunmasıyla söz konusu iki bakterinin gelişiminin kontrol örneğine göre %50 düzeyinde azaldığı tespit edilmiştir (p<0,01) (Şekil 1b ve c). Ayrıca enterosin KP içeren ve içermeyen NaCl'lü örneklerde bakterilerin absorbans değerleri arasında önemli bir farkın olmadığı da saptanmıştır (p>0,05). Diğer bir ifade ile NaCl, Gram-negatif bakterilere karşı etkili olmayan enterosin KP'nin aktivitesinde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Birçok araştırmacı tarafından bakteriyosinlerin tuzla birlikte kullanılmaları sırasında aktivitelerinin değişmediği, hatta artış gösterdiği

ENTEROSİN KP'NİN İNHİBİTÖR AKTİVİTESİ ÜZERİNE SODYUM KLORÜR VE ASİTLİĞİN ETKİSİ

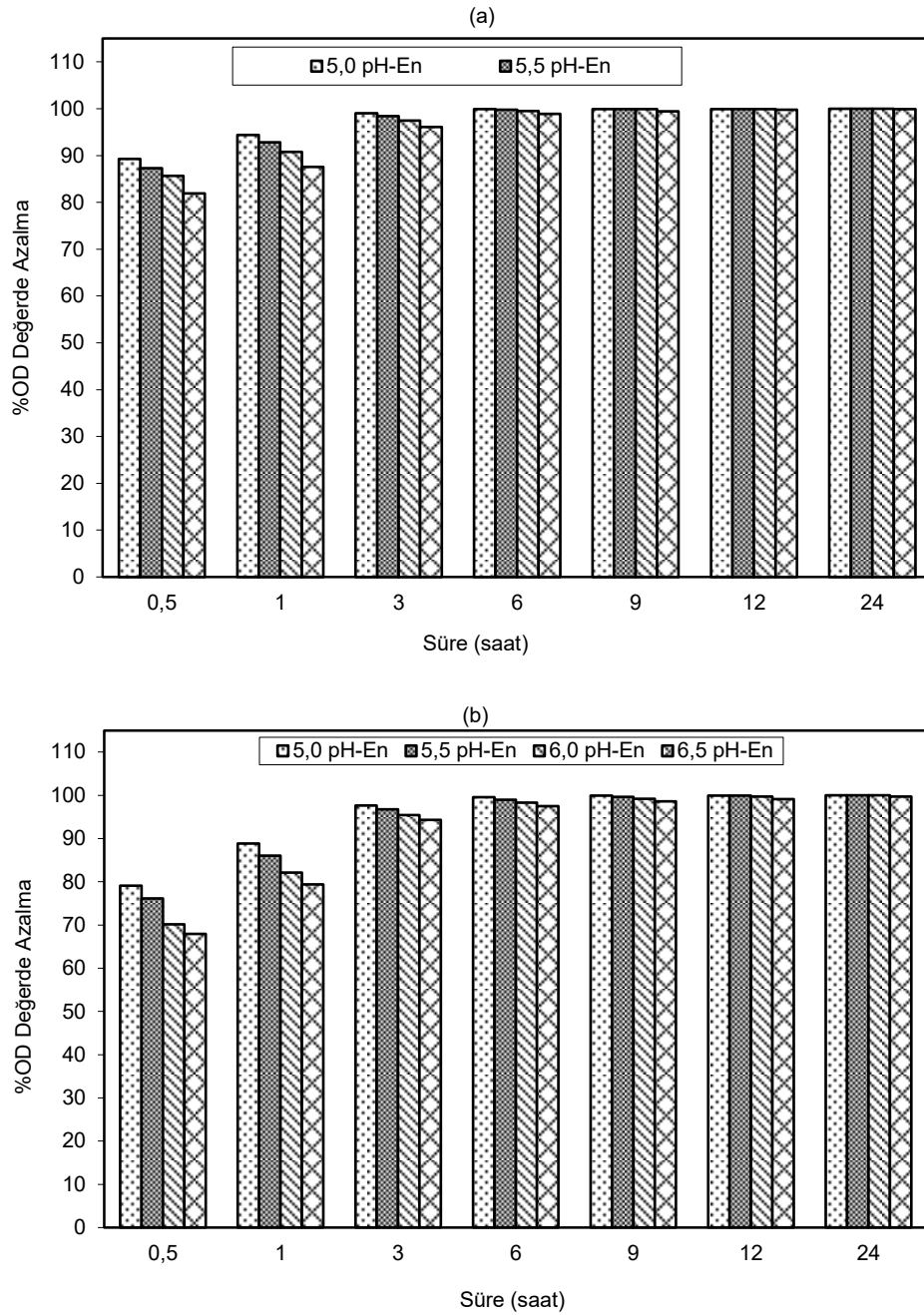
bulunmuştur [11, 15-18]. Fakat kimi araştırmacılar da tuzun bazı bakteriyosinler üzerinde antagonistik etkiye sahip olduğunu bildirmektedirler [12-14]. NaCl'ün antagonistik ve sinerjist etkisi bakteriyosin molekülünün yapısı (hidrofobisitesi) ve indikatör bakterinin tuza dayanıklılığı ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır.



Şekil 1. Enterosin KP'nin *L. monocytogenes* (a), *E. coli* O157:H7 (b) ve *Salmonella* Typhimurium (c)'a karşı inhibitör aktivitesi üzerine NaCl'ün etkisi. Lm: *L. monocytogenes*; En: enterosin KP

### 3.2. Enterosin KP'nin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enterosin KP'nin *Lb. plantarum* ve *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 ve 7,5 pH değerleri kullanılmıştır. Şekil 2'de verilen analiz sonuçlarında görüldüğü gibi, test edilen pH aralıklarında enterosin KP'nin her iki bakteriye karşı antimikrobiyal aktivitesinin değişmediği, yani bakteriyosinin hem asidik hem de nötral pH değerlerinde aynı aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. Asidik pH (5,0) değerinde enterosin KP aktivitesinin biraz daha iyi olduğu gözlenmesine karşın bu farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Enterosin KP'nin yüksek NaCl konsantrasyonlarında ve geniş pH aralıklarında aktivitesini koruması gıda endüstrisi açısından önemli bir husustur. Çünkü bu özellik enterosin KP'nin birçok gıdada biyokoruyucu olarak kullanabileceğini ortaya koymaktadır.



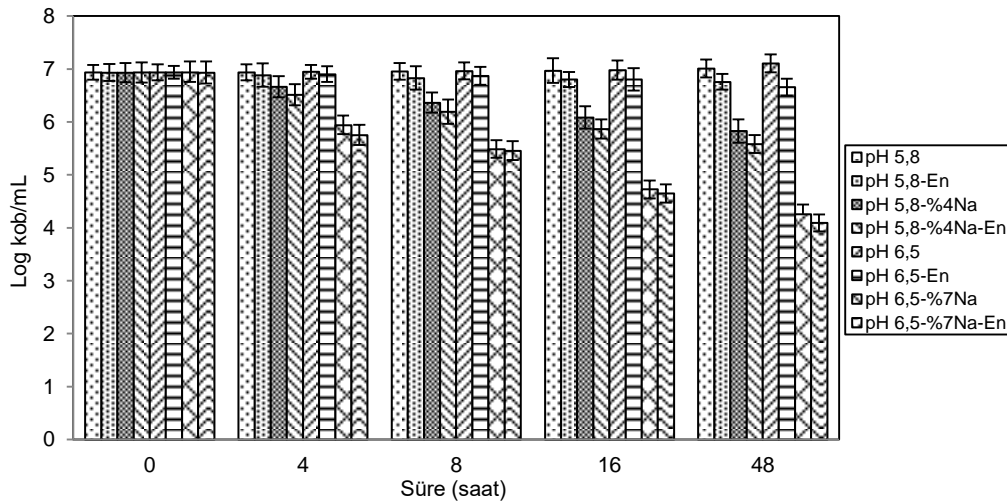
Şekil 2. Enterosin KP'nin *Lb. plantarum* (a) ve *L. monocytogenes* (b)'e karşı inhibitör aktivitesi üzerine pH'nın etkisi. En: enterosin KP

## ENTEROSİN KP'NİN İNHİBİTÖR AKTİVİTESİ ÜZERİNE SODYUM KLORÜR VE ASİTLİĞİN ETKİSİ

Enterosin AS-48'in *S. choleraesuis*'a karşı aktivitesinin yüksek pH değerlerinde (pH 9,5) arttığı Abriouel ve ark. [22], *E. coli* O157:H7 karşı aktivitesinin düşük (5,0) ve yüksek (8,5) pH değerlerinde arttığı Ananou ve ark. [23], *S. aureus* CECT 976'ya olan aktivitesinin ise asidik pH değerlerinde (pH 4 ve 5) arttığı Ananou ve ark. [18] tarafından bulunmuştur. Nisin, sakasin P ve kurvasin A bakteriyosinlerinin aktivitelerinin de asidik pH değerlerinde arttığı bildirilmektedir [11]. Düşük pH'da bakteriyosin aktivitesinin artmasının bakteri yüzey yükünde ve bakteriyosinin oligomerizasyonunda meydana gelen değişim ile bakteriyosinin net yükündeki artıştan kaynaklanabileceğini belirtmektedirler. Net yükteki artışın bakteriyosinin bakterinin dış membranındaki negatif yüklerle etkileşiminin artışına ve/veya hücre duvarından geçişine katkıda bulunabileceğini ifade etmektedirler. pH'nın enterosin AS-48 bakteriyosinin antibakteriyel aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin kullanılan indikatör bakteriye bağlı olarak değişkenlik gösterdiği ve bunun da her bakterinin farklı net yüzey yüküne sahip olmasından kaynaklandığı ifade edilmektedir [23].

### 3.3. Enterosin KP'nin Gelişmeyen *E. coli* O157:H7 Hücrelerine Karşı İnhibitor Aktivitesi Üzerine NaCl ve pH'nın Etkisi

Fekal indikatör olarak kullanılan *E. coli* O157:H7, gıda endüstrisinin en fazla mücadele ettiği patojen bakterilerden birisidir. Çünkü inek ve diğer hayvanların bağırsağında ve dolayısıyla toprak ve her yerde bulunabildiği gibi çok düşük dozlarda bile oldukça infeksiyözür. Isı duyarlılığı diğer enterobakterilere benzemesine karşın diğer gıda kaynaklı patojenlere göre asidik pH'lara oldukça toleranslıdır. Fekal indikatör olarak kullanılan *E. coli* gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında canlılığını da koruyabilmektedir. Bundan dolayı birçok asidik gıdada örneğin fermente sosis, mayonez, pastörize edilmeyen elma suyu, çığ ve minimum işlenmiş et, süt ve sebze ürünlerinde canlılığını koruyabilmektedir [23, 24]. *E. coli*'nin asidik pH'ya dayanıklılığında dolayı, en çok kullanılan muhafaza yöntemlerinden biri olan asitlendirme, bu patojeni kontrol etmek için geçerli bir metot olarak kabul edilmemektedir. Gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında canlılığını koruyabildiği için bu analizde indikatör bakteri olarak *E. coli* seçilmiştir. Bu nedenle bakteriyosin uygulamasıyla *E. coli* gelişimini kontrol altında tutup tutamayacağımızı belirlemek için gelişmeyen *E. coli* hücresi üzerine enterosin KP ile pH ve enterosin KP, pH ve NaCl'ün kombine etkisi incelenmiştir. Analiz verileri Şekil 3 ve 4'te sunulmuştur. Şekil 3'ten de görüldüğü üzere, pH değeri 5,8 ve 6,5 olan enterosin KP içeren ve içermeyen örneklerde 48 saatlik inkübasyon süresi boyunca hücre sayısında önemli bir değişimin olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Ancak pH değeri 5,8 ve %4 oranında tuz içeren bakteriyosinsiz örnekte 1,10 log, bakteriyosin ilaveli örnekte 1,35 log, %7 oranında NaCl içeren 6,5 pH'lı enterosinsiz örnekte 2,66 log, enterosinli örnekte ise 2,87 log'luk bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,01$ ) (Şekil 3). Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere, bu koşullar altında bakteri sayısının azalmasında enterosin KP'nin önemli bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Bu etki daha çok tuz ve pH'nın ortak sinerjist etkisinden kaynaklanmaktadır. Kontrol örneklerinden pH değeri 5,8 ile 6,5 olan örnekler arasındaki fark önemsiz bulunurken ( $p>0,05$ ), 5,8 pH'lı ve %4,0 oranında NaCl ile 6,5 pH'lı ve %7,0 düzeyinde NaCl içeren örnek arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,01$ ). Daha düşük pH'nın etkisini belirlemek için pH 5,0 ve 5,3 ile çalışma yapılmıştır.

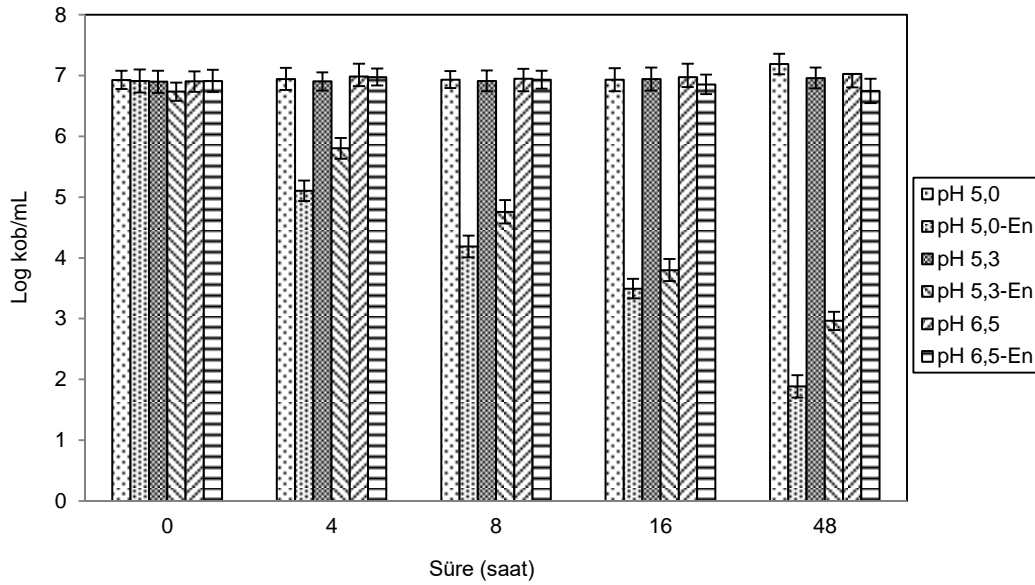


Şekil 3. Enterosin KP'nin gelişmeyen *E. coli* O157:H7 hücrelerine karşı inhibitör aktivitesi üzerine NaCl ve pH'nın etkisi. En: enterosin KP

Z. YILDIRIM, Y. İLK, M. YILDIRIM

İnkübasyon süresi boyunca enterosin KP içermeyen kontrol örnekleri (pH 5,0, 5,3 ve 6,5) ile enterosinli pH değeri 6,5 olan örnekte, canlı bakteri sayısının değişmediği saptanmıştır ( $p>0,05$ ). Fakat enterosin ilaveli 5,0 ve 5,3 pH'lı örneklerde bakteri sayısında çok yüksek düzeyde sırasıyla 5,03 ve 3,77 log'luk bir azalma olduğu gözlenmiştir ( $p<0,01$ ) (Şekil 4). Analiz sonucunda asitlendirme işleminin tek başına *E. coli* üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı ( $p>0,05$ ), ancak enterosin KP ile birlikte kullanımı sonucunda bakteriyosinin gelişmeyen *E. coli* O157:H7 hücrelerine karşı inhibitör aktivite kazandırdığı ve dolayısıyla bakteri sayısında önemli düzeyde bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

Ganzle ve ark. [11] yaptıkları bir çalışmada, düşük pH değerlerinde (5,0 ve 5,3) sakasin P'nin gelişmeyen *E. coli*'ye karşı inhibitör aktivite kazandığı ve hücre sayısında özellikle pH 5,0'de %99'luk bir azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca Ananou ve ark. [23] da enterosin AS-48'in *E. coli* O157:H7'ye inhibitör etkisinin düşük pH'da (pH 5,0)'da arttığını gözlemişlerdir.



Şekil 4. Enterosin KP'nin gelişmeyen *E. coli* O157:H7 hücrelerine karşı inhibitör aktivitesi üzerine pH'nın etkisi. En: enterosin KP

#### 4. SONUÇLAR

Sonuç olarak, gıdaların muhafazasında kullanılan tekniklerden olan tuz ve düşük pH'nın enterosin KP aktivitesini azaltmaması ve hatta özellikle düşük pH değerlerinin sinerjistik etki yaratması da söz konusu bakteriyosinin birçok fermente gıdada Gram-negatif bakteriler de dâhil olmak üzere birçok patojen bakteriye karşı etkili bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

#### TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK (Proje No: 102O282 TOVAG) tarafından desteklenmiştir.

#### KAYNAKLAR

- [1] KLAENHAMMER, T.R., "Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria", FEMS Microbiology, 12, 39-86, 1993.
- [2] CUTTER, C.N., SIRAGUSA, G.R., "Population Reductions of Gram-Negative Pathogens Following Treatments with Nisin and Chelators Under Various Conditions", Journal of Food Protection, 58, 977-983, 1995.
- [3] PAPAGIANNI, M., "Ribosomally Synthesized Peptides with Antimicrobial Properties: Biosynthesis, Structure, Function and Applications", Biotechnology Advances, 21, 465-499, 2003.

ENTEROSİN KP'NİN İNHİBİTÖR AKTİVİTESİ ÜZERİNE SODYUM KLORÜR VE ASİTLİĞİN ETKİSİ

- [4] MONTVILLE, T.J., CHEN, Y., “Mechanistic Action of Pediocin and Nisin: Recent Progress and Unresolved Questions”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 511-519, 1998.
- [5] MCAULIFFE, O., ROSS, R.P., HILL, C., “Lantibiotics: Structure, Biosynthesis and Mode of Action”, *FEMS Microbiological Reviews*, 25, 285-308, 2001.
- [6] MAZZOTTA, A.S., MONTVILLE, T.J., “Nisin Induces Changes in Membrane Fatty Acid Composition of *Listeria monocytogenes* Nisin-Resistant Strains at 10°C and 30°C”, *Journal of Applied Microbiology*, 82, 32–38, 1997.
- [7] SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W.H., “Potential of Antagonistic Microorganisms and Bacteriocins for the Biological Preservation of Foods”, *Trends Food Science Technology*, 7, 158–164, 1996.
- [8] ROSS, R.P., SPORNS, P., DODD, H.M., GASSON, M.J., MELLON, F.A., MCMULLEN, L.M., “Involvement of dehydroalanine and dehydrobutyrine in the addition of glutathione to nisin”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 3174–3178, 2003.
- [9] AASEN, I.M., MARKUSSEN, S., MØRETRØ, T., KATLA, T., AXELSSON, L., NATERSTAD, K., “Interactions of The Bacteriocins Sakacin P and Nisin With Food Constituents”, *International Journal of Food Microbiology*, 87, 35–43, 2003.
- [10] GALVEZ, A., ABRIQUEL, H., LOPEZ, R.L., OMAR, N.B., “Bacteriocin-Based Strategies for Food Biopreservation”, *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51–70, 2007.
- [11] GANZLE, M.G., WEBER, S., HAMMES, W.P., “Effect of Ecological Factors on the Inhibitory Spectrum and Activity Of Bacteriocins”, *International Journal of Food Microbiology*, 46, 207–217, 1999.
- [12] MAZZOTTA, A.S., CRANDALL, A.D., MONTVILLE, T.J., “Nisin Resistance in *Clostridium botulinum* Spores and Vegetative Cells”, *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2654–2659, 1997.
- [13] PARENTE, E., GIGLIO, M.A., RICCARDI, A., CLEMENTI, F., “The Combined Effect of Nisin, Leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the Survival of *Listeria monocytogenes* in Broth”, *International Journal of Food Microbiology*, 40, 65–75, 1998.
- [14] MINAHK, C.J., MORERO, R.D., “Inhibition of Enterocin CRL35 Antibiotic Activity by Mono- and Divalent Ions”, *Letters in Applied Microbiology*, 37, 374–379, 2003.
- [15] CHUMCHALOVA, J., JOSEPHSEN, J., PLOCKOVA, M., “The Antimicrobial Activity of Acidocin CH5 in MRS Broth and Milk with Added NaCl, NaNO<sub>3</sub> and Lysozyme”, *International Journal of Food Microbiology*, 43, 33-38, 1998.
- [16] GARCIA, M.T., BEN, OMAR,N., LUCAS, R., PEREZ-PULIDO, R., CASTRO, A., GRANDE, M.J., MARTÍNEZ-CANAMERO, M., GALVEZ, A., “Antimicrobial Activity of Enterocin EJ97 on *Bacillus coagulans* CECT 12”, *Food Microbiology*, 20, 533–536, 2003.
- [17] GARCIA, M.T., LUCAS, R., ABRIQUEL, H., OMAR, N.B., PEREZ, R., GRANDE, M.J., CANAMERO, M.M., GALVEZ, A., Antimicrobial Activity of Enterocin EJ97 Against ‘*Bacillus macroides/Bacillus maroccanus*’ Isolated from Zucchini Pure. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 731–737, 2004.
- [18] ANANOU, S., VALDIVIA, E., MARTINEZ-BUENO, M., GALVEZ, A., “Effect of Combined Physico-Chemical Preservatives on Enterocin AS-48 Activity Against the Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain”, *Journal Applied Microbiology*, 97, 48-56, 2004.
- [19] ISLEROGLU, H., YILDIRIM, Z., TOKATLI, M., NILGUN, O., YILDIRIM, M., “Partial Characterisation of Enterocin KP Produced by *Enterococcus faecalis* KP, a Cheese Isolate”, *International Journal of Dairy Technology*, 65: 90-97, 2012.
- [20] MORENO, M.R., LEISNER, J.J., TEE, L.K, LEY, C., RADU, S., RUSUL, G., VANCANNEYT, M., DE VUYST, L., “Microbial Analysis of Malaysian Tempeh, and Characterization of Two Bacteriocins Produced by Isolates of *Enterococcus faecium*”, *Journal of Applied Microbiology*, 92 (1), 147-57, 2002.
- [21] ANONIM, 1995. “User’s Guide: Statistics”, Version 6.12 Ed. SAS Institute, Cary, NC.
- [22] ABRIQUEL, H., VALDIVIA, E., GALVEZ, A., MAQUEDA, M., “Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 Spheroplasts and Permeabilized Cells to the Bacteriocin AS-48”, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4628-4626, 1998.
- [23] ANANOU, S., GÁLVEZ, A., MARTINEZ-BUENO, M., MAQUEDA, M., VALDIVIA, E., “Synergistic Effect of Enterocin AS-48 in Combination with Outer Membrane Permeabilizing Treatments Against *Escherichia coli* O157:H7”, *Journal Applied Microbiology*, 99, 1364–1372, 2005.
- [24] BELL, C., “Approach to the Control of Entero-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)”, *International Journal of Food Microbiology*, 78, 197–216, 2002.