

Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri

Ahmet Hilmi ÇON (*), Hüsnü Yusuf GÖKALP (**)

ÖZET

Laktik asit bakterileri, fermente et, süt, sebze, meyve ve tahıl ürünlerinin üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır. Çeşitli gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski gıda muhafaza metodlarından birisi olarak kabul edilmektedir. Günümüzde modern işleme ve koruma yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen, özellikle son yıllarda tüketicilerin doğal ve katkısız ürünlere gösterdikleri talep artışı dolayısıyla, laktik asit bakterileri potansiyel gıda koruyucusu olarak önemini halen sürdürmektedir.

Laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği antagonistik aktivite, ürettikleri laktik ve asetik asit gibi organik asitler, H₂O₂, bakteriosin veya bakteriosin benzeri metabolitler, diasetil, alkol ve CO₂ gibi metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Hazırlanan bu derleme çalışması ile konuyla ilgilenenlere laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal metabolitlerle bunların antimikrobiyal aktivite spektrumları, gıda sanayiinde uygulamaları veya potansiyelleri, üretim ve etki mekanizmaları hakkında bilgi sağlanmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Gıda, laktik asit bakterisi, antimikrobiyal aktivite

ABSTRACT

Antimicrobial Metabolites of Lactic Acid Bacteria and Mechanisms of Action

Lactic Acid Bacteria (LAB) are very important due to the common usage in the production of fermented dairy, vegetable, fruit, meat and cereal products. Historically, LAB was used to protect fermented foods. Although development of modern processing and preservation techniques, LAB is still an important biopreservative for food due to increasing demand of consumers for natural food products.

Lactic Acid Bacteria (LAB) inhibit spoilage microorganism and foodborne pathogens. These inhibitory activities result from LAB's ability to produce organic acids, H₂O₂, bacteriocins or bacteriocin-like metabolites, diacetyl and CO₂. The aim of this review is to acquaint the reader with the various inhibitors produced by lactic acid bacteria. Information on inhibitors includes antimicrobial activity spectrum, applications or potential applications, and mechanisms of action and production.

Key Words : Food, lactic acid bacteria, antimicrobial activity, antagonism

GİRİŞ

Mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte, tabiatta çok yaygın olarak bulunduğu bilinen laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalar da başlamıştır. İlk kez 19. yüzyıl sonlarında sütte fermentasyona ve koagülasyona yol açan bakteriler laktik asit bakterileri olarak isimlendirilmiş ve daha sonraki yıllarda Lactobacillaceae familyası içinde sınıflandırılmışlardır. Morfolojik açıdan çok değişken özellik gösteren (kı-

sa veya uzun çomak veya kok şekilli) familya üyeleri fizyolojik açıdan oldukça benzer özellik göstermektedirler. Tüm üyeler; Gram pozitif, katalaz negatif (düşük oranda şeker ihtiva eden ortamda pseudo-katalaza sahip suşlar görülebilir), Sporolactobacillus inulinus hariç spor oluşturmayan, fakültatif anaerok, Pediococcus cinsi hariç yalnız tek düzlemde bölünen ve bazı istisnalar hariç hareketsiz, çubuk veya kok şeklinde bakteriler olarak tanımlanmaktadır (1-7). Mutlak fermentatifler ve asıl fermentasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Hem grubu (katalaz, sitokrom) içermeksizin oksijen varlığında gelişebilen nadir mikro organizmalardır. Doğal ortamları süt ve süt mamülleri, işlenmemiş, taze veya çürü-

(*) Pamukkale Üni. Mühendislik Fak. Gıda Müh. Böl. 200017 Çamlık, Denizli

(**) TC Tarım ve Köyşleri Bakanı, Ankara

müz bitkiler, insan ve hayvanların barsak mukoza ve içeriklidir (4-6).

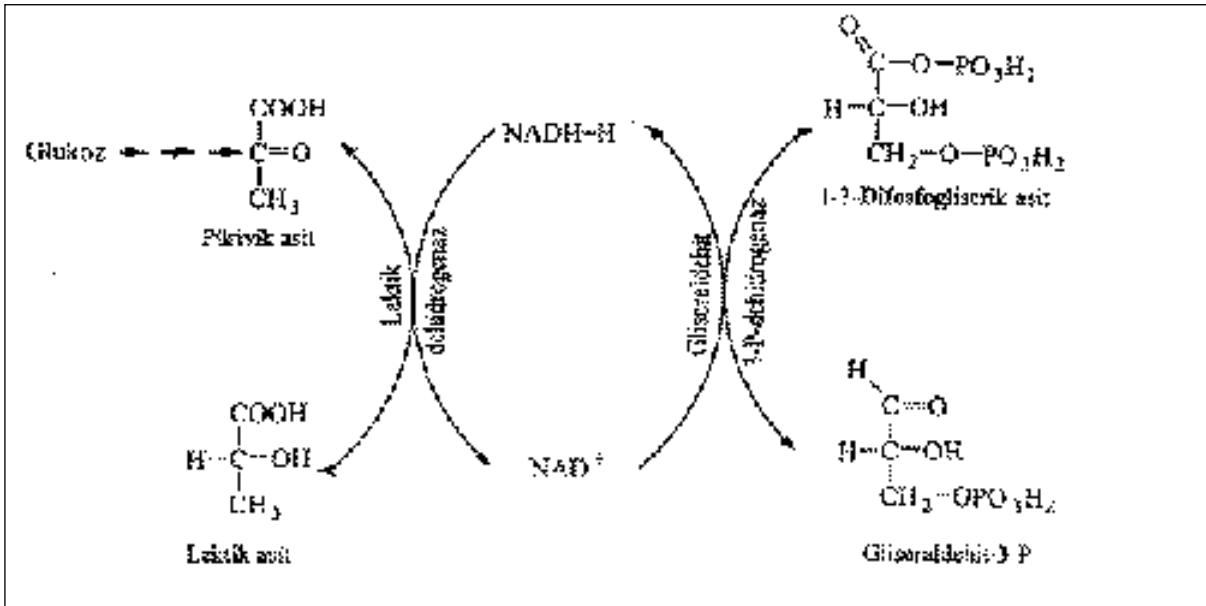
Laktik asit bakterileri, tabiatta yaygın oluşları, çeşitli gıda maddelerinde sıkça rastlanılan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadırlar.

Çiğ materyalin laktik asit bakterileri ile fermente edilerek yeni gıdaların üretilmesi ve çeşitli gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski gıda muhafaza metodlarından birisi olarak kabul edilmektedir. Süt bu bakteriler ile yoğurt, ekşi süt, peynir, tereyağı vb. ürünlere işlenmektedir. Tüm dünyada yaygın olarak tüketilen fermente et ürünleri ve farklı sebzelerden üretilen turşular laktik asit fermantasyonu ile hazırlanmakta ve muhafaza edilmektedir (5,8-10).

Çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunan veya başlangıç kültür olarak kullanılan bir çok laktik asit bakterisinin, gıdayı bozucu mikroorganizmalar veya gıda kaynaklı patojenleri ihtiva eden bir grup mikroorganizmaya karşı antagonistik aktivite gösterdiği de bilinmektedir (5,11,12). Laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği bu antagonistik aktivitenin farklı bazı mekanizmalar ile olduğu bilinmektedir. Bunlar:

1. Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat kaynakları

Şekil 1 : Homofermentatif laktik asit bakterilerinin laktik asit üretiminde görülen eşlenik oksidasyon/redüksiyonu



nı fermente etmeleri sonucu; laktik ve asetik gibi organik asitler üretilmektedir. Gıdalarda bulunan birçok mikroorganizma bu üretilen organik asitlere karşı hassastır ve souçta düşen pH'yı da tolere edememektedir.

2. Laktik asit bakterileri tarafından aerobik gelişme esnasında üretilen H₂O₂ bir çok mikroorganizma üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir.

3. Bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve "bakteriosin veya bakteriosin benzeri metabolitler" olarak isimlendirilen antimikrobiyal karakterli proteinler, özellikle yakın ilişkili bakteriler üzerine inhibitör etki göstermektedir.

4. Bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen, diasetil, alkol ve CO₂ gibi metabolitlerde bazı mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir.

Tüm bu bileşenlerin ayrı ayrı inhibitör etkide bulunabilmesine rağmen laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik etkisi, bunların yalnızca birisine bağlı olmayıp, aksine bunların kombinasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte bu makalede, antimikrobiyal bileşenlerin bakteriler tarafından üretimleri ve inhibitör etki şekilleri ayrı ayrı başlıklar altında tartışılmıştır.

2. Organik Asitler Üretimi ve Antimikrobiyal Etkisi

2.1. Organik Asit Üretimi

Hutton ve ark. (13) tarafından *P. acidilactici* ile dekstroza, piliç etli salatalara eklenmek suretiyle botulinum toksinin üretimine karşı koruyucu olarak kullanılmıştır. Bostan ve ark. (14) tarafından da broiler karkaslarının mikrobiyal yükünün azaltılması amacıyla kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Yapılan başka bir çalışma sonucunda ise, karaciğerin laktik asit solusyonu ile yıkanması ve karkaslar üzerine sprey vasıtası ile püskürtülmesi ile etler üzerindeki mikrobiyal yükün azaldığı belirtilmiştir (15)

2.2. Organik Asitlerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Organik asitlerin mikroorganizmalar üzerine inhibitör ajan olarak tesir etmesi, asitin sahip olduğu farklı üç potansiyel etkiye bağlanmaktadır.

1. Güçlü asitler; düşük eksternal pH'ya sahiptirler. Fakat kendi kendilerine hücre membranından geçememektedirler. Bu asitler hücre yüzeyinde var olan enzimler üzerine düşük pH dolayısıyla enzimleri denatüre ederek inhibitör etkide bulunabilirler. Ayrıca, hücre içi ve dışı pH gradienti çok büyük olduğu zaman hücre zarının proton geçirgenliği sonucu sitoplazmik pH'nın düşüşüne de neden olabilirler.

2. Zayıf asitler; hücre membranından geçebilirler. Bu asitlerin birinci etkisi sitoplazmik pH'yı düşürmeleri dolayısıyladır. Fakat, doğrudan disosiyasyon olmaması formları da metabolizma üzerine spesifik inhibitör etkiye sahiptir.

3. Süfit, nitrat, karbonat gibi asit potansiyelli iyonlar düşük pH'da potansiyel inhibitörlerdir.

Laktik asit pH 5'de spor oluşturan bakterilere karşı mükemmel bir inhibitör olmakla birlikte, aynı pH'da maya ve küflere karşı etkisiz kalmaktadır (16). Asetik asit de, yine çoğu bakteriye karşı etkilidir. Koli-formlar ve Salmonella gibi bazı bakteriler karşı bakterisidal etki göstermektedir.

Laktik asitin direk etki mekanizması üzerine yapılmış fazlaca araştırma yoktur. Ancak, laktik asitin de asetik ve propiyonik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerini etki tarzına benzer şekilde membran potansiyeline etki ettiği ileri sürülmektedir. Bahsedilen bu etkinin genel mekanizması şu şekilde açıklanabilir: Disosiyasyon olmamış moleküller hücre içine girmektedir ki bu girişi düşük pH değerleri artırmaktadır. Hücre içerisine giren asit moleküllü, disosiyasyon olarak proton-

motive gücü nötralize etmektedir. Bundan dolayı da elektrokimyasal gradiente dayandırılan membrana bağlı transport işlemine müdahale etmektedir (16,18).

Nitekim yapılan çalışmalar sonucu asetik asitin *Bacillus subtilis*'te non-kompetitif şekilde membran ve ziküllerine amino asit alımını inhibe ettiğini göstermiştir (16).

Banwart'da (15) lipofilik asitler vasıtası ile bakteri gelişmesinin inhibisyonunu, amino ve keto grupların membran transfer sistemine etkisine bağlanmaktadır. Hücre içerisine giren ve hücre içerisinde disosiyasyon olan asitler veya asidik ortamda protonların pasif olarak hücre içine girişi vasıtasıyla düşen sitoplazmik pH'nın DNA'da zararlanmalara neden olabileceği belirtilmiştir. Laktik asit, asetik asit ve p-amino-benzoat ile 3.5 pH'ya getirilmiş ortamda *E.coli*'nin 4 suşu geliştirilmiş ve DNA'nın tek iplikçisindeki kırılmayı onaramayan (DNA polimeraz I enzimi içermeyen) pol A1 suşunda her üç asitin de yüksek toksik etkide bulunduğu görülmüştür (17). Ayrıca, *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan bir çalışmada, benzoik asit ilavesi ile sitoplazmik pH'nın düşürülmesi sonucu, pH düşüşüne hassas olan 6- fosfofruktokinazın inhibe olduğu ve dolayısıyla de glikolizis yoluyla enerji üretiminin durması ile inhibisyonun gerçekleştiği rapor edilmiştir (17). Yine, Huang ve ark. (19) tarafından sitoplazmik pH'sı asetik asit ile düşürülmüş bakterilerde görülen inhibitör aktivite üzerine, hücre içi proteinlerin denatürasyonunun da etkili olduğu ifade edilmektedir (16).

Salmond ve ark. (20) ile Moon (21) mayalar ve diğer bakterilere karşı propiyonik asit gibi zayıf asitlerin inhibisyon etkisini yalnızca disosiyasyon olmamış asite bağlanmasının doğru olmadığını belirtmişlerdir. *E. coli* ile yaptıkları araştırma sonucu, bu etkinin hem sitoplazmanın aitleşmesinden hem de disosiyasyon olmamış asitin tanımlanamamış spesifik etkisinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Juven ve ark. (22) tarafından da bu fikir desteklenmektedir.

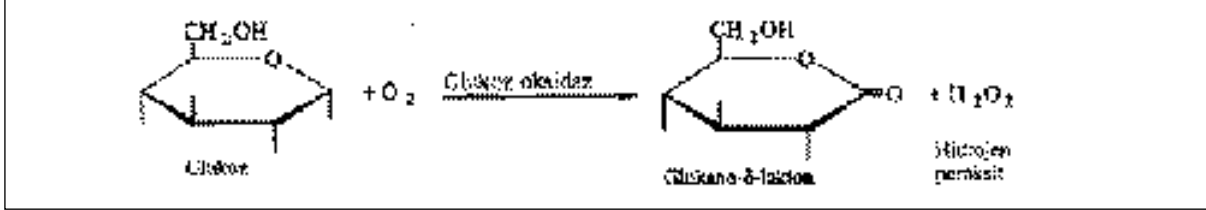
Banwart (15) ise, Gill ve Newton'un (24) ette bulunan Gram negatif psikrotroflar üzerine laktik asitin inhibitör etkisinin pH düşüşüne bağlı olduğunu, disosiyasyon olmamış formu ile etkilenmediğini bildirdiklerini rapor etmiştir.

3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Üretiminin Antimikrobiyal Etkisi

3.1. H_2O_2 Üretimi

Bazı laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkileri H_2O_2 üretimlerine dayandırılmaktadır. Ancak inhibitör aktivitenin gerçekte organik asitler ve diğer me-

Şekil 3. Laktik asit bakterileri tarafından hidrojen peroksit üretimi



tabolitlerin kombinasyonu ile sağlandığı ifade edilmektedir (22). Dahiya ve Speck(25), *L. bulgaris* ve *L. lactis*'in H_2O_2 üretimi yardımıyla *S. aureus*'un gelişimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Juffs ve Babel (26) çok suşlu bir laktik starteri çeşitli psikrotrof mikroorganizmaları içeren süte %0.5 oranında inoküle etmişler ve öncelikle starter türüne ve daha sonrada sıcaklık ve zamana bağlı olmak üzere önemli inhibitör aktivite elde ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı denemede, ortama katalaz katılması sonucu antimikrobiyal etkide azalma meydana gelmesi dolayısı ile bu aktivitenin H_2O_2 üretiminden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Price ve Lee de (27), laktobasillerin istirdiyelerde *Pseudomonas* sp.'lerin gelişimini H_2O_2 üretim kabiliyeti sonucu inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

H_2O_2 laktik asit bakterileri gibi katalaz negatif mikroorganizmalar tarafından aerob şartlarda üretilmektedir. Ksantin oksidaz, glukoz oksidaz, askorbik asit, sülfidril oksidaz, pirüvat oksidaz, NADH oksidaz ve α -gliserofosfat oksidaz veya laktat oksidaz vasıtası ile katalizlenen reaksiyonda atmosferik oksijenin doğrudan indirgenmesi ile meydana gelmektedir (22,28) (Şekil 3). H_2O_2 'nin üretimi 5°C ve 7°C'de en yüksek seviyeye ulaşmaktadır ki bu durum asit üretimi ile zıtlık göstermektedir (25). Özellikle birçok laktobasil ve streptokok türü aerobik şartlar altında önemli miktarlarda H_2O_2 'nin üretebilmektedir (29). Nitekim Juven ve ark. (30) etten izole ettikleri *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin belirli türleri-

nin biyomoleküllerin oksidasyonunu başlatmaya yetecek miktarda invitro H_2O_2 ürettiğini tespit etmişlerdir (22).

H_2O_2 yalnız başına bir inhibitör madde olduğu gibi, çiğ sütlerde oluşan laktoperoksidaz sisteminde de fonksiyon göstermektedir (12). Sığır sütlerinde doğal olarak oluşan bir inhibitör sistemdir. Bu sistemin laktoperoksidaz, tiyosiyanat ve H_2O_2 olmak üzere 3 temel bileşeni bulunmaktadır. Gram negatif psikrot-

roflar üzerine oldukça etkili olan bu sistemin yeterli aktivite gösterebilmesi için 0.5-1.0 ppm laktoperoksidaz, 100U/ml H_2O_2 ve 0.25mM tiyosiyanat'a ihtiyaç duyulmaktadır. Sütte normal olarak 30 ppm laktoperoksidaz, 1-2U/ml H_2O_2 ve 0.02-0.25mM tiyosiyanat bulunmaktadır (23). Bu sistemde rol alan H_2O_2 'nin kaynağı da glukoz oksidaz enzim sistemine sahip olan laktik asit bakterileridir.

3.2. H_2O_2 'nin Antimikrobiyal Aktivitesi

H_2O_2 ilavesi çeşitli gıdalarda arzu edilmeyen birçok mikroorganizmanın inaktivasyonu için basit ve etkili bir metoddur (15,31). H_2O_2 'nin hücreler üzerine inhibitör etkisi onun konsantrasyonu ve muamele süresi ile mikrobiyal yük, sıcaklık, pH, inorganik iyonlar, UV veya diğer koruyucularla mikroorganizmaların muamele edilmiş olması gibi faktörlerden etkilenir (15).

H_2O_2 , reaktif kapasitesinin yüksek oluşu ve hidroksil radikali (OH) gibi sitotoksik oksijen türleri meydana getirmesinden dolayı, çok güçlü bir oksidanttır (22,32). Oksitleyici bir ajan olan H_2O_2 'nin mikroorganizmalar üzerine inhibitif etkisi, metabolik işlemlerde esansiyel olan enzimlerin sülfidril gruplarını etkileyerek disülfid köprüleri oluşturmaya bağlanmaktadır (31).

H_2O_2 'nin hücreler üzerine aktüel etkisi onun oksidatif etkisinin dışında tam olarak bilinmemekle birlikte, Rosenkranz'a (33) göre H_2O_2 mutajendir ve kro-

mozomal hataları indüklemektedir. Hoffman ve Meneghini'nin (34) çalışma sonuçlarına göre de H_2O_2 üretilen radikaller ile hücrede çeşitli reaksiyonlara girmekte ve DNA'nın tek iplikçığının kırılmasına neden olmaktadır. Yine, H_2O_2 'nin bazı sporların ultrarüktürünü etkileyerek sporisit etkili olabileceği de belirtilmektedir (15).

Laktoperoksidaz sisteminde ise H_2O_2 tiyosiyonati hipotiyosiyonat haline dönüştürmektedir. Bu kısa ömürlü iyonlar yüksek oksiasitlerdir (12).

4. Bakteriosin ve Bakteriosin - Benzeri Bileşikler

4.1. Bakteriosin Üretimi

Bakteriosinler, çeşitli laktik asit bakterileri tarafından üretilen, yakın akraba türler üzerine etkili, protein veya peptid tabiatında, hassas hücrelerdeki reseptörlere bağlanan ve üretimi büyük oranda plazmid DNA tarafından kodlanan antimikrobiyal metabolitlerdir (35,36).

Laktik asit bakterilerinin tüm cinslerinde bakteriosin üretimi belirlenmiştir. Özellikle, *Streptococcus* ve

Lactobacillus cinslerinde bu metabolitin üretimi oldukça yaygındır. Bu cinsler içerisinde sınıflanan türlerin, bakteriosin üretim sıklıkları da birbirinden farklılık göstermektedir. Örneğin, *Lactococcus lactis*'in 45 suşundan 35'inini, *L. caidophilus*'un 52 suşundan ise 33'ünün bakteriosin ürettiği belirtilirken, diğer türlerde yalnız birkaç suşun bakteriosin üreticisi olduğu belirlenmiştir. Bakteriosin üreticisi bazı türler, ürettikleri bakteriosinler ve etki spektrumları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Bakteriosin Üreten Laktik Asit Bakterileri, Ürettikleri Bakteriosinler ve Etki Spektrumlar (12,37).

Bakteriosin Üreticisi Organizma	Üretilen Bakteriosin	Etki Spektrumu
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactocin B Lactocin F	Laktobasiller Laktobasiller ve Enterokoklar
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticin J Lactocin 27	Laktobasiller Laktobasiller
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricin A Lactocin B	Laktik Asit Bakterileri Laktik Asit Bakterileri, <i>S. aureus</i> , <i>C. botulinum</i> sporları
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakacin A Lactocin S	Laktobasiller, Leukonostoklar, Enterokoklar ve <i>listeria monocytogenes</i> Laktik Asit Bakterileri
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Nisin	Gram Pozitif Bakteriler
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Nisin	Gram Pozitif Bakteriler
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Diplococcin	Laktokoklar
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>deacetylactis</i>	DLactostrepcins	Laktokoklar, Streptokoklar ve Laktobasiller
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocin PA-1 Pediocin AcH	Laktobasiller, Leukonostoklar, Pediokoklar ve <i>listeria monocytogenes</i> Laktobasiller, Leukonotoklar, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> ve <i>L. monocytogenes</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocin AcH	Laktobasiller, Pediokoklar, <i>S. aureus</i> , <i>C. perfringens</i> ve <i>Clostridium botulinum</i>

Bakteriosin üretimi türlerden başka ,besiyerini bileşimi, pH değeri, ve üretici suşun gelişme fazı gibi faktörlere de bağlıdır. Geis ve ark. (38), bakteriosin üretimi açısından denedikleri 5 farklı besiyeri ortamında bir çok farklılıklar tespit etmişlerdir. Pucci ve ark. (39) pediocin PA-1'in maksimum üretiminin de Man, Rogosa and Sharpe agara (MRS agar) %2 maya ekstraktı ilave edilerek hazırlanmış ortamda olduğunu rapor etmişlerdir. Yine *Lactobacillus acidophilus*'un lactacin B ve *Lactobacillus plantarum*'un plantacin B üretimi agarlı besiyerinde gerçekleşirken sıvı kültürlerde bu metabolite rastlanılamamıştır.

Besiyerinin başlangıç pH değerinin 5.9'dan 7.0'ye yükselmesi ile artmaktadır (40). Bununla birlikte, heveticin J'nin maksimum üretiminin pH 5.5'de olduğu bildirilmektedir (41).

Bakteriosin üretimi besiyeri bileşimi ve pH'sı yanında üretici bakterini gelişme fazı ile de yakından ilişkilidir. Heveticin J, sakacin A ve plantaricinin maksimum birikimi orta ve geç logaritmik faz esnasında liken, lactocin 27 ve lactocin B'nin maksimum üretimi ise gelişmenin erken durgun fazı esnasında olmaktadır. İnkübasyonun uzatılması ile bakteriosin aktivitesindeki düşüşte, mikoorganizmanın bizzat kendisi tarafından üretilen proteolitik enzimlerin etkili olabileceği belirtilmektedir.

4.2.Bakteriosinlerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Diğer laktik asit bakterileri üzerine bakteriostatik etkiye sahip lactocin 27 istisna edilir ise, bakteriosinler hassas hücrelere karşı bakteriosidal etkili olarak rol oynamaktadırlar. İnhibitör aktivite yönünden bakteriosinler iki temel gruba ayrılarak incelenebilmektedir.

- a) Gram pozitif mikroorganizmaların nisbeten geni bir kısmını inhibe edenler. Örneğin;nisin pediocin A ve pediocin AcH.
- b) Sadece üretici suşlar ile yakın ilişkili türleri inhibe edenler. Örneğin, lactacin F, lactacin B.

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriosinlerin etki mekanizması üzerine ilk bilgiler kolisinler ile yapılan çalışmalara dayandırılmış ve geniş kabul görmüştür. Bu ilk görüşler, bakteriosinin letal etkisi-

nin iki safhada olduğunu ileri sürmektedir. İlk basamakta hassas organizmaların hücre duvarlarındaki özel reseptörler vasıtası ile bakteriosin absorblanmakta, ikinci basamakta ise membranda öldürücü biyokimyasal hasarlar meydana gelmekte ve sonuçta hücre ölmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu birkaç yazar optik dansitede azalma olmaksızın, bakteriosidal aktivite gözlemlemişlerdir ki bu, lethal etkinin önemli hücre lizisi olmadan da gerçekleşebileceğine işaret etmektedir. Yine laktobasil ve pediokoklar, bütün bakteriosinleri absorbsiyon açısından denenmiş ve hem hassas hem de hassas olmayan hücreler tarafından bakteriosinlerin absorblanabildiği belirlenmiştir.

Bu absorbsiyonun spesifite eksikliği, bakteriorise karşı dayanıklılığın veya hassasiyetin yalnızca yüzeydeki reseptörlerin olmasına dayandırılmayacağını göstermiştir. Sajdel et al. (42) lactostrepcin 5 ile yaptıkları denemede, reseptörlerin protein tabiatında olduğunu belirlemişler (tripsin muamelesi ile) ve lactostrepcin 5 aktivitesinde birinci hedefin hücre membranı olduğuna karar vermişlerdir. Lactostrepcin 5'in bu etkisi sonucu bütünlüğünü koruyamayan ve intrasellüler pH'yı sürdürmeyi başaramayan hücreler meydana gelmektedir. Bazı araştırmacılar ise lactostrepcin 5'in DNA, RNA ve protein sentezini geciktirdiğini belirtmişlerdir (43)

Bakteriosinlerin belkide en önemlisi olan, nisin, en çok sitoplazmik membran üzerine etkili olmaktadır. Hücrede ya ATP gibi sellüler materyalin kaybına neden olmakta veya lizize yol açabilmektedir. Son çalışmalar nisinin sitoplazmik membranda sülfidril gruplarına etki ettiğini ortaya koymuştur (44). Aynı zamanda, murein sentezine de müdahale ettiği belirtilmektedir. Bu iki etki muhtemelen sinerjistiktir. Nitekim, Ramseier (45) nisinin hassas *Clostridium butyricum* hücrelerine absorblanırken, dayanıklı hücrelerce absorblanmadığını ortaya koymuştur. Bundan dolayı nisinin hücredeki ilk hedefinin hücre membranı olduğu ve takibinde sitoplazmik membranı parçaladığı ve sitoplazmik materyalin dağılmasına neden olduğu ileri sürülmüştür. Sporlarda da çimlenme sonunda sitoplazmik membranın derhal parçalandığı ortaya konulmuştur (46). Linnett ve Strominger (47) tarafından da yüksek nisin konsantrasyonunun

Bacillus stearothermophilus ve *E. coli*'de peptidoglikan sentezini inhibe ettiği saptanmıştır (12).

L.helveticus tarafından üretilen lactocin 27, DNA, RNA ve ATP seviyesine etki etmez iken, protein sentezini sınırlandırarak bakteriostatik etki göstermektedir. *Streptococcus cremoris* tarafından üretilen diplococcin ise hassas hücrelerde doğrudan DNA ve RNA sentezini durdurmakta ve hücre lizise uğramaksızın ölmektedir. Günümüzde nisin, 40'ı aşkın ülkede pastörize işlenmiş peynirlerde gıda preservative olarak kullanılmaktadır. Bir çok ülkede de buna ilaveten süt tatlılarında, taze sütte bazı konserve gıdalarda (patates, bezelye, hazır çorba, domates gibi) ve alkollü içkilerde kullanılmaktadır (12,44). Ülkemizde de peynirlerde kullanımına müsaade edilmiştir.

5.Diğer Antimikrobiyal Bileşenler

5.1.Diasetil Üretimi ve Antimikrobiyal Etkisi

Streptococcus, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Pedococcus* cinslerinin bazı tür ve suşları tarafından üretilen diasetil, tereyağı kokulu sıvı bir bileşiktir. Tere-

hibe olmuştur. Diasetilin etkisi, Gram negatif bakteriler için lethal, Gram pozitif bakteriler için ise genellikle gelişmeyi durdurucu olarak belirtilmektedir. Gelişmeyen hücrelerde ise etkilenme görülmediği bildirilmiştir (48).

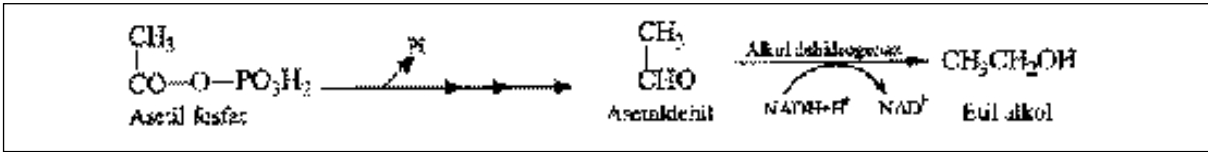
5.2.Alkol Üretimi ve Antimikrobiyal Etkisi

Heterofermentatif laktik asit bakterileri tarafından şekerlerin fermentasyonu sonucu diğer metabolitler ile birlikte alkol de üretilmektedir.

$C_6H_{12}O_6$ Asidik ve alkolik glikoliz reaksiyonları
 $CH_3CHOHCOOH + CH_3CH_2OH + CO_2$
Örneğin *Leuconostoc mesenteroides*, şeker metabolizmasında oluşan iki ara üründen asetil fosfatı asetil - Coa üzerinden asetaldehit ve etil alkole indirgemektedir (4). (Şekil 4).

Etil alkol yaygın olarak kullanılan ve uygun yoğunlukta olduğunda orta etkinlikte bir antimikrobiyal ajandır. Çeşitli vejetatif hücrelere karşı alkolün yıkıcı etkisi, halen tartışmalı olmakla birlikte, genellikle patojen bakterilerin büyük çoğunluğuna karşı bakte-

Şekil 4. *Leuconostoc mesenteroides* tarafından asetil fosfatın etil alkole indirgenmesi.



yağı ve diğer sütçülük ürünlerine ilaveten, kırmızı ve beyaz şarap, brandy kavrulmuş kahve, silaj ve diğer fermente gıdalarda da oluşabilmektedir (48).

Diasetilin inhibitör etkisini araştırmak için kullanılan konsantrasyonlar 170ppm seviyesini aşmaktadır. Kültür katılan gıdalardaki diasetil seviyesi ise genellikle bu değerden çok daha az bulunmaktadır. Bundan dolayı muhtemeldir ki diasetil tek başına koruyucu etkide önemli rol oynamamaktadır. Bununla birlikte diğer metabolitler ile beraber düşünüldüğünde önemli olabileceği ifade edilmektedir (12,49),

Üç farklı ticari kaynaktan elde edilen diasetilin 10 LAB, 4 maya, 12 Gram pozitif ve 14 gram negatif bakteriden oluşan 40 kültüre karşı test edilmesi sonucunda, diasetilin $pH \leq 7.0$ 'da aktif, $pH > 7.0$ 'da ise inaktif olduğu belirlenmiştir. Laktik asit bakterileri pH 5-7 arasında 100-350µg/ml konsantrasyonda in-

risit etki göstermektedir. Bakteri sporlarına karşı ise etkisizdir (50-53).

Alkolün mikroorganizmalar üzerine bahsedilen bakterisit etkisi; onun konsantrasyonu, muamele süresi ve molekül ağırlığı ile ilişkilidir. Alkolün birçok gaye için en etkili olduğu konsantrasyonu %70 olarak belirtilmektedir (50-52). Bununla birlikte, uzun süreli dezenfeksiyon için %50'lik alkol konsantrasyonu en uygun olarak belirtilmiştir. %75'den yukarı konsantrasyonlarda ise germisit etki önemli derecede azalmaktadır (51-53).

Alkollerin bakteriosidal etkisinin mekanizması proteinleri denatüre etmek özelliklerine dayandırılmaktadır (15,50-52,54). Ayrıca, sitoplazma zarındaki lipid yapıyı bozup zarın işlevine etki ettiği de belirtilmektedir (54,55).

Alkol, zayıf nüfuz kabiliyeti ve organik maddeler tarafından inaktive edilmesi dolayısıyla bir gıda muhafaza ajanı olarak tavsiye edilmemektedir. Ancak, bununla birlikte diğer antimikrobiyal maddelerin etkinliğini artırmaktadır. Hatta, Shapero ve ark. (56) etil alkolü *S. aureus*'a karşı etkili bulmuşlar ve su aktivitesinin düşürülmesi ile kombine şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir (15).

5.3. Mikroorganizmaların Karbondioksit Üretimi Ve Antimikrobiyal Etkisi

Heterofermentatif laktik asit bakterileri yukarıda görüldüğü üzere şekerleri fermente ettiklerinde laktik asit, asetik asit ve etil alkol gibi ürünlerin yanında CO_2 'de üretmektedirler.

Laktik asit bakterileri, aerobik solunum yapan mikroorganizmalar ile kıyaslandıklarında CO_2 'e çok daha fazla dayanıklı bulunmuşlardır. 12 adet fakültatif anaerob mikroorganizma ile yapılan bir çalışmada da (%100 CO_2 atmosferi, 25°C sıcaklıkta) bir kaç *Enterobacter* hariç Laktobasiller yine en dayanıklı cins olarak görülmüştür (57).

Hücrelerin CO_2 'e karşı kritik hassasiyetinin nelerden kaynaklandığı hususundaki çalışmalar sonucu, bir takım fikirler ileri sürülmüştür. Aeroblar üzerine antimikrobiyal aktivitenin daha yüksek bulunması nedeni ile, bazı araştırmacılar solunum metabolizması yolunda inhibisyon bölgelerinin bulunması fikrini desteklemişler ve dekarboksilaz, özellikle de süksinat dehidrogenazın inhibisyonunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, CO_2 'in küfler üzerine etkisinin ise karboksilasyon/dekarboksilasyon veya TCA siklusu enzimlerinin inhibisyonuna atfedilebileceği belirtilmiştir (57).

Ette bozulmaya neden olan 5 tür bakteride CO_2 'in varlığında solunum aktivitesinin düştüğü görülmüştür. Fakat fakültatif anaerobların gelişmesi CO_2 ile etkilenmemektedir (57).

Tan ve Gill (58) *P. fluorescens* ile yapılan araştırma sonucunda ekstrasellüler CO_2 konsantrasyonundaki her 1mM artışın, intrasellüler pH'da 0.03 birimlik düşüye neden olduğunu, ancak CO_2 varlığında elde edilen gelişme inhibisyonunun temel nedeninin intrasellüler pH düşüşü olmadığını belirt-

mişlerdir.

6. Sonuç

Sonuç olarak; laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitesinden, bu metabolitlerden yalnızca birinin değil, bir kaçının ortak etkisinin mesul olduğu kabul edilmelidir. Bu kombine etki dolayısı ile, laktik asit bakterileri çeşitli gıdaların muhafazasında önemli rol oynamaktadır. Özellikle son yıllarda tüketicilerde doğal ve katkısız ürünlere olan talep artışı, gıda muhafazasında kimyasal koruyucuların kullanımının azaltılması veya tamamen kaldırılması ve alternatif olarak doğal inhibitör maddelerin kullanımına olan ilgiyi artırmıştır. Tüm bunlar, laktik asit bakterilerinin 60 yılı aşkın süredir ilmen ispatlanmış olan antimikrobiyal özellikleri üzerinde araştırmaların gelecekte daha da artan sayılarla devam edeceğine işaret etmektedir. Ülkemizde de bu konuda çok çeşitli alanlarda, kapsamlı araştırmaların yapılmasına ve desteklenmesine büyük ihtiyaç olduğu inancındayız.

KAYNAKLAR

1. Shape ME, Fryer TF, Smith DG: Identification of the Lactic Acid Bacteria. "Gibbs, M.M. and Skinner, F.A (ed): Identification Methods for Microbiologist" Part A. p. 245, Academic Press, New York (1966).
2. Nickerson JT, Sinskey AJ: Microbiology of Food and Food Processing. p. 306 American Elsevier Publishing Company, New York (1974).
3. Moat AG,: Biology of the Lactic, Acetic and Propionic Acid bacteria. "Demain, A.L. and Solomon, N.A. (ed): Biology of Endustrial Microorganisms" p. 143, the Benjamin/Cummins Publishing Company Inc., Menlo Park, California (1985).
4. Schlegel HG: General Microbiology. p. 587, Cambri University Press, Cambridge (1986).
5. Andersson R: Food Processing, Lactic Acid Bacteria in the Production of Food, SIK-Publication, Food Laboratory Newsletter 14: 17 (1989).
6. Tunail N, Köşker Ö: Süt Mikrobiyoloji. s 138, Ankara Üni. Zir.Fak. Yay. 1116, ders kitabı, 320, Ankara Üni. Basımevi (1989).
7. Şain İ: Mikrobiyolojiye Giriş. s. 237, Eser Matbaası, Samsun (1990).
8. Gökalp H.Y: Değişik Olgunlaşma Sıcaklıklarında Farklı Starter Kültürleri Uygulayarak Türk tipi Sucuk Üretimi. (Doçentlik Tezi) s. 178, Atatürk Üni. ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Tek. Bölümü, Erzurum (1982).
9. Evren M: Turşudan Laktik Asit Bakterilerinin İzçolas-

- yonu ve Bunlardan Starter Kültür Üretiminin Araştırılması. (Yüksek Lisan tezi) s. 65, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Samsun (1991).
10. Mayra-Makinen A, Biret M: Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. "Salminen, S. and von Wright, A. (ed): Lactic Acid Bacteria" p. 65, Marcel Dekker Inc., New York (1993).
11. Schillinger U, Lücke F-K: Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. Appl. Environ. microbiol. 55: 1901 (1989).
12. Davidson PM, Hoover DG: Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. "Salminen, S. and von Wright, A. (ed): Lactic Acid Bacteria" p. 127, Marcel Dekker Inc. New York (1993).
13. Hutton MT, Chehakk PA, Hanlin JH: Inhibition of Botulinum toxin production by *Pediococcus acidilactici* in temperature abused refrigerated foods, J. Food Safety 11: 255 (1991).
14. Boston K, Uğur M, Özgen Ö, Aksu H: Laktik asit solusyonlarına daldırmanın broiler karkaslarının mikrobiyolojik kalitesine etkisi, İstanbul Üniversitesi Vet. Fak. Dergi 21: 443 (1995).
15. Banwart GJ: Basic Food Microbiology. p. 773. AVI Book, Published by Von Nosrand Reinhold, New York (1989)
16. Eklund T: Organic Acids and Esters. "Gould, J.W. (ed): Mechanism of Action of Food Preservation Procedures. p. 161, Elsevier applied Science New York (1989).
17. Booth IA, Kroll RG: The Preservation of Food By Low pH. "Goud, J.W. (ed): Mechanism of Action of Food Preservation Procedures. p. 119, Elseier Applied Science, new York (1989).
18. Shelef AA: Antimicrobial Effects of Lactates: A Review, J Food Protect.57: 445 (1994).
19. Huang L, Forsberg CV, Gibbins LB: Influence of external pH and fermentation products on clostridium acetobutylicum intracellular pH and cellular distribution of fermentation products. Appl. and Environ. Microbiol. 51: 1230 (1986).
20. Salmond CV, Kroll RG, Booth IR: The effects of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. J Gen Microbiol. 130: 2845 (1984).
21. Moon NJ: Inhibition of growth of acid tolerant yeast by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures, J Appl Bact 55: 453 (1963).
22. Juven BJ, Meinersmann RJ, Stern NJ: Antagonistic effects of Lactobacilli and *Pediococcus* to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry, J.Appl. Bact. 70:95 (1991).
23. Jay JM: Modern Food Microbiology. p. 701, Fourth Edition, Chapman & Hall One Penn Plaza New York, NY 10119, USA (1992).
24. Gill CO, Newton KG: Effects of lactic acid concentration on growth on meat of gram negative psychrotrophs from a meatworks, Appl Environ Microbiol 43: 284 (1982).
25. Dahiya RS, Speck ML: Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 51: 1568 (1968).
26. Juuffs HS, Babel FJ: Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactic cultures in milk stored at low Temperature. J. Dairy Science 58: 1612 (1975).
27. Price RJ, Lee JS: Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. J. Milk Food Technol. 33:13 (1970).
28. Wilkins KM, Boards RG: Natural Antimicrobial Systems. "Gould, J.W. (ed): Mechanism of Action of Food Preservation Procedures." p. 285, Elsevier Applied Science, New York (1989).
29. Reiter B, Harmulu G: Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications. Food Protect. 47: 724 (1984).
30. Juven BJ, Weisslowicz H, and Harel, S: Detection of hydrogen peroxide produced by meat lactic starter cultures. J. Appl. Bacteriol. 65:357(1988).
31. Nickerson JT, Sinskey AJ: Microbiology of Food and Food Processing. p. 234, American Elsevier Publishing Company, New York (1972).
32. Juven BJ, Schved F, Lindner P: Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. J Food Protect. 55: 157 (1992).
33. Rosenkranz HS: 1973, Sodium Hypochlorite and Sodium Perborate, Preferential Inhibitors of DNA Polymerase-Deficient Bacteria. "Alinti : Banwart, G.J: Basic Food Microbiology" p. 773, AVI Book, Von Nosrand Reinhold, New York (1989).
34. Hoffman ME, Meneghini R: 1979. Action of Hydrogen Peroxide on Human Fibroblast in Culture. "Alinti: Banwart, G.J: Basic Food microbiology" p. 773, AVI Book, Published by Von Nosrand reinhold, New York (1989).
35. Harris LJ, Daeschel MA, Stiles ME, Klaenhammer TR: Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 52: 384 (1989).
36. Okereke A, Motville TJ: Bacteriocin Inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. J. Food Protect 54:349 (1991).
37. Schillinger U: Bacteriocins of lactic acid bacteria. (Yayınlanmamış Notlar) Federal Meat Research Center, Kulmbach, Germany (1990).
38. Geis A, Singh J, Teuber M: Potential of lactic Streptococci to produce bacteriocin. App. Environ. Microbiol. 45: 205 (1983).
39. Pucci MJ, Vedamuthi ER, Kunka BS, Vanderberg PA: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-I produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2349 (1988).
40. Barefoot SF, Klaenhammer TR: Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrob Agents Chemother. 26: 328 (1984).
41. Joerger MC, Klaenhammer TR: Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus*

- helveticus 481. J. Bacteriol. 167: 439 (1986).
42. Zajdel JK, Ceglowski P, Dobrzanski WT: Mechanism of action of Lactostrepcin 5, a bacteriocin Produced by *Streptococcus cremoris* 202. Appl. Environ. Microbiol. 49: 969 (1985).
43. Klaenhammer TR: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70:337 (1988).
44. Delves-Broughton J: Nisin and its use as a food preservative. Food Technol. 44: 100 (1990).
45. Ramseier HR : The action of nisin on *Clostridium butyricum*. Arch. Microbiol. 37: 57 (1960).
46. Lueck E: Antimicrobial food additives. Springer-Verlag, Berlin (1980).
47. Linnett PE, Strominger JL: Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 4: 231 (1973).
48. Jay J M: Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Environ. Microbiol. 44:525 (1982).
49. Gilliland S E: Role of Starter Culture Bacteria in Food Preservation. "Gilliland, S.E. (ed): Bacterial Starter Cultures for Foods."p. 175 CRC Press, Inc. Boca Raton Florido (1986).
50. Volk WA, Wheeler M F: Basic Microbiology. p. 592, J.B. Lippincott Company. Philadelphia-Toronto (1973).
51. Güngör M: Anseptik ve Dezenfektan Maddelerin Genel Kimyasal ve Farmakolojik Özellikleri. "E. Çetin (ed) Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizasyon İşlemleri ve Hastanede Uygulanışları" s. 246, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Rektörlük No: 2919, Fakülte No: 137, İstanbul Tıp Fak. Yayını (1982).
52. Özdemir N: Kimyasal Dezenfektanlar. "E. Çetin (ed) Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizasyon İşlemleri ve Hastanede Uygulanışları" s. 246, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Rektörlük No: 2919, Fakülte No: 137, İstanbul Tıp Fak. Yayını (1982).
53. Sağduyu H: Dezenfektan Maddelerin Genel Kullanımı Özellikleri. "E. Çetin (ed): Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizasyon İşlemleri ve Hastanede Uygulanışları" s. 246, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Rektörlük No: 2919, Fakülte No: 137, İstanbul Tıp Fak. Yayını (1982).
54. Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR: Microbiology Concepts and Applications. p. 896, International Edition, McGraw-Hill, Inc. New York (1993).
55. Tümbay E: Dezenfektanların ve Antiseptiklerin Bakterisit Etkileri ve Etki Mekanizmaları. "E. Çetin (ed) : Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizasyon İşlemleri ve Hastanede Uygulanışları" s. 246, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Rektörlük No: 2919, Fakülte No: 137, İstanbul Tıp Fak. Yayını (1982).
56. Shapero M, Nelson DA, Labuza TP: Ethanol inhibition of *Staphylococcus aureus* at limited water Activity. J. Food Sci. 43: 1467 (1978).
57. Jones MV: Modified Atmospheres. "Gould, J.W. (ed): Mechanism of Action of Food Preservation Procedures"p.247, elsevier Applied Science, New York (189).
58. Tan KH, Gill CO: Physiological basis of CO₂ inhibition of meat spoilage bacterium, *Pseudomonas fluorescens*. Meat Science 7:9 (1982).