

Geobacillus toebii HBB-218 Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Konserve Gıdalarda *Bacillus coagulans* ve *Geobacillus stearothermophilus*'u Engellemek Amacıyla Uygulanması[§]

The Use of Bacteriocin Produced by Geobacillus toebii HBB 218 to Prevent the Growth of Bacillus coagulans and Geobacillus thermophilus in Canned Food

Ayşe Alkış Ceylan*,**[ⓧ], Gamze Başbülbul*,**[ⓧ]

*Aydın Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın

**Adnan Menderes Üniversitesi, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi, REDPROM, Aydın

Öz

Amaç: Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen ve üreticiye yakın akraba türlerin gelişmesinde engelleyici bir etki gösteren protein yapıda bileşiklerdir. Son yıllarda, termofilik bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, termostabil olmaları nedeniyle ısı işlem görmüş gıdaların korunmasında dikkat çekmiştir. Bu çalışmada, *Geobacillus toebii* HBB-218 suşu tarafından üretilen ve toebisin 218 olarak adlandırılan bakteriyosinin konserve gıdalarda *Bacillus coagulans* DSM 1 ve *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22'nin gelişimine karşı etkisi incelenmiştir.

Yöntem: Bakteriyosin üreticisi olan *Geobacillus toebii* HBB-218 bakterisi sıvı besiyerinde inkübe edilmiş ve hücresiz kültür sıvıları liofilize edilerek aktivite hesaplanmıştır. Toebisin 218 olarak adlandırılan bakteriyosin, konserve mısır, konserve bezelye ve salçaya inoküle edilen indikatör bakterilerin vejetatif hücreleri ve endosporları üzerinde test edilmiştir. İndikatör bakteri olarak *B. coagulans* DSM 1 ve *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 kullanılmıştır. Farklı zaman aralıklarında gıda örneklerinden canlı hücre sayımları yapılmış ve kontrol grubu ile kıyaslanmıştır.

Bulgular: *B. coagulans* DSM 1 ve *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22'nin vejetatif hücreleri ile yapılan deney düzenleğinde liofilize edilmiş bakteriyosin bakteri hücre sayısında kademeli bir azalmaya neden olmuştur. Yirmi dört saat sonunda ise canlı bakteri hücrelerine rastlanmamıştır. Aynı işlem, söz konusu bakterilerin endosporları ile de denenmiştir. Endosporlarla kurulan deney düzeneklerinde, sayım sonuçları incelendiğinde, üremenin 2-7 veya 7-15 günler arasında sonlandığı görülmüştür.

Sonuç: Çalışmanın sonuçlarına göre, Toebicin 218'in, konserve yiyeceklerde *G. stearothermophilus* ve *Bacillus coagulans*'a karşı biyokoruyucu olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Bakteriyosin, *Geobacillus toebii*, konserve gıda, termofilik

ABSTRACT

Objective: Bacteriocins are proteinaceous compounds produced by bacteria and have an inhibitory effect on the development of closely related species. In recent years, bacteriocins produced by thermophilic bacteria have attracted much attention because of their thermostability which is important for protection of heat-processed food. In this study, a bacteriocin, which is tentatively named as toebicin 218 produced by *Geobacillus toebii* strain HBB-218 was used against the growth of *Bacillus coagulans* DSM 1 and *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 in canned food.

Methods: As bacteriocin producer *Geobacillus toebii* HBB-218 was incubated in liquid medium. After incubation cell-free culture supernatants were lyophilized to estimate activity of bacteriocin in supernatants. Toebicin 218 was tested on vegetative cells and endospores of indicator bacteria inoculated into canned corn, canned pea and tomato paste. *B. coagulans* DSM 1 and *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 were used as indicator bacteria. Viable bacterial cells of food samples were counted at different time intervals and compared with control plates.

Results: In the experiment performed using vegetative cells of *B. coagulans* DSM 1 and *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22, lyophilized bacteriocin induced a gradual decrease in bacterial cell counts. After 24 hours, any viable cell was not observed. The same procedure was also tested with endospores of the bacteria in question. In the experimental set ups established with endospores, when the bacterial counts were examined it was seen bacterial growth was terminated within 2-7 or 7-15 days.

Conclusion: According to the results of the study, Toebicin 218 has a potential to be used as a biopreservative in canned food against *G. stearothermophilus* and *B. coagulans*.

Keywords: Bacteriocin, *Geobacillus toebii*, canned food, thermophilic

Alındığı tarih:

13.02.2019

Kabul tarihi:

27.05.2019

Yayın tarihi:

30.09.2019

ORCID Kayıtları

A. Alkış Ceylan 0000-0002-9226-2715

G. Başbülbul 0000-0001-8151-6321

✉ gbasbulbul@adu.edu.tr

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Gıdaların korunması, tüketici sağlığına zarar veren veya ekonomik kayıplara neden olan mikroorganizmalar nedeniyle sürekli gündemde olan bir konudur. Gıdaların korunması ve raf ömürlerinin uzatılmasında kullanılan birtakım yöntemler bulunmaktadır. Çeşitli paketlenme yöntemleri, ısı işlemler, dondurarak kurutma/soğutma, bakteriyosinler gibi antimikrobiyal katkıları bu yöntemlerin arasında yer almaktadır⁽¹⁾.

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, protein özelliğinde ve antagonistik etki gösteren bileşiklerdir. Üretici türe yakın akraba türlere karşı bakteriyostatik veya bakteriyosidal etki modu ile dar veya geniş bir aktivite spektrumu gösterirler. Tüketicilerin taze, besleyici ve kimyasal madde içermeyen yiyeceklere olan talebi, bakteriyosinleri, gıda endüstrisi için doğal bir biyokoruyucu hâline getirmektedir. Literatürde, mezofilik bakteri gruplarından uzun yıllardır birçok bakteriyosin rapor edilmiş olmasına rağmen⁽³⁻¹⁰⁾, *Geobacillus* suşlarında çalışılan bakteriyosinlerin çoğu yakın zamanlarda çalışılmaya başlamıştır⁽¹¹⁻¹⁸⁾.

Bacillus coagulans ve *Geobacillus. stearothermophilus* (eski adı *Bacillus stearothermophilus*) Gram pozitif endospor oluşturan bakterilerdir, asit ve asitlenmiş gıdalarda "ekşime" tarzında bozulmaya neden olabilirler^(19,20). *B. coagulans* endosporlarının konserve meyve ve domates ürünlerinde 4.1-5.0 pH arasında çimlenebileceği rapor edilmiştir⁽²¹⁾. Yüksek sıcaklığa dayanıklı *G. stearothermophilus* sporları, özellikle tropik iklimlerde düşük asitli konserve yiyeceklerde ekşime tarzı bozulmalardan sorumludur.

Bu çalışmada, çeşitli konserve gıdalarda toebisin 218'in *G. stearothermophilus* DSM-22 ve *B. coagulans* DSM-1'in vejetatif hücrelerine ve endosporlarına karşı inhibe edici etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Edindiğimiz bilgilere göre, bu çalışma *Geobacillus toebii* suşundan bir bakteriyosinin gıdalar üzerindeki etkisinin test edildiği ilk çalışmadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri suşları ve büyüme koşulları: Toebisin 218 üreticisi *G. toebii* HBB-218 suşu topraktan izole edilmiş ve 16S rDNA analizi ile tanımlanmıştır⁽¹⁵⁾. *G. stearothermophilus* DSM-22 (tip suş) ve *B. coagulans* DSM-1 Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonundan elde edilmiştir (DSMZ, Braunschweig, Almanya). *G. toebii* HBB-218, 55°C'de beyin-kalp infüzyon (BHI) buyyon ortamında geliştirilmiştir. *G. stearothermophilus* DSM-22 ve *B. coagulans* DSM-1, sırasıyla 45°C ve 37°C'de triptik soy agar (TSA)'da rutin olarak büyütülmüştür.

Gıda örnekleri: Konserve mısır (pH 6.6), konserve bezelye (pH 6.4) ve konserve domates salçası (pH 4.4), Aydın'daki marketlerden sağlanmıştır. İnokülüm için mısır ve bezelye konservelerinin sıvı fraksiyonları kullanılmıştır. Örnekler aseptik olarak açılmış ve aynı anda bakteriler ile inokule edilmiştir.

Bakteriyosin preparatının hazırlanması: *G. toebii* HBB-218, BHI buyyon besiyerinde 55 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 8.000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant alınmış ve 0.20 µl por çaplı steril membran filtreden süzölmüştür. Hücresiz kültür süpernatantları (CFS) -50°C'de 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir (Freezone 6, Model 77520; Labconco Co. Kansas City, MO, ABD). Liyofilize preparat, steril distile su içinde % 0.1 konsantrasyonda hazırlanarak indikatör bakteri *G. stearothermophilus* DSM-22'ye karşı bakteriyosin aktivitesi belirlenmiştir⁽²²⁾. Aktivite AU/mL= d x (1.000 / 50) (d En son zon görülen seyreltme) formülüne göre hesaplanmıştır (Resim 1).

İnokülüm ve endospor süspansiyonlarının hazırlanması: *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin üssel fazındaki vejetatif hücreleri yiyecek ve içeceklere inoküle edilmeden önce TSB'da 45°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. *B. coagulans* DSM 1, TSB'da 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Endospor preparatları için ise TSA besiyerlerine *G. stearothermophilus* DSM-22 ve *B. coagulans* DSM-1 stok kültürlerinden swab ile

ekim yapılarak *G. stearothermophilus* DSM-22, 20-25 gün 45°C'de, *B. coagulans* DSM-1 37°C'de 4-5 gün inkübe edilmiştir. Endospor konsantrasyonu mikroskop altında incelenip %90 seviyesine ulaştığında petrilere steril distile su eklenerek kültürler tüplere toplanmış ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra, süpernatantlar atılarak pellet üç kez yıkanmıştır. Son olarak, pellet steril distile suda çözülerek daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır^(19,23).

Deney düzeneklerinin kurulması: Gıda örnekleri, bir sette logaritmik gelişme fazındaki, 14 saatlik *G. stearothermophilus* DSM-22 (1 mL) hücreleri ve diğer sette logaritmik fazdaki 12 saatlik *B. coagulans* DSM-1 (1 mL) hücreleri ile inoküle edilmiştir. Teobicin 218 (1280 AU/mL) tek başına veya %1.5 laktik asit çözeltisi ile kombinasyonlar halinde örnekler eklenmiştir. Kontrol grubundaki bütün tüpler, *G. stearothermophilus* DSM-22 için 45°C'de ve *B. coagulans* DSM-1 için 37°C'de inkübe edilmiştir. Aynı prosedür, *G. stearothermophilus* DSM-22 ve *B. coagulans* DSM-1 endosporları için daha önce belirtildiği gibi hazırlanan endospor süspansiyonları (3×10^6 cfu/mL) kullanılarak uygulanmıştır. Örnekler periyodik olarak alınıp, homojenize edilmiş ve ardışık seyreltilerek üç tekrarlı olarak koloni sayımı için TSA petrilere yayılmıştır. Canlı hücre sayısı, cfu/mL ya da cfu/g olarak belirtilmiştir ve sayım için belirlenen alt limit 10 CFU'dur.

BULGULAR

Toebicin 218'in gıda örneklerinde vejetatif *G. stearothermophilus* DSM-22 hücreleri üzerindeki etkisi: Toebicin 218 ilave edilmiş konserve mısır, konserve bezelye ve domates salçası örneklerinde, canlı hücre sayısı 2-4 saat içerisinde gittikçe azalmıştır. Konserve mısır, konserve bezelye ve domates salçası örneklerinde, sırasıyla 1.8, 1.5 ve 1.7 log birim azalmalar belirlenmiştir. Toebicin 218 laktik asit kombinasyonu ile test edildiğinde kısmen farklı sayımlar gözlenmiş; mısır, bezelye ve domates salçası örneklerinde 4 saatlik inkübasyon sonunda canlı hücre sayısında sırasıyla 1.5, 1.6 ve 1.7 log birim azalmalar görülmüştür. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonunda ise, kontrol grubu haricindeki düzeneklerde canlı hücre belirlenememiştir (Tablo 1).

Toebicin 218'in gıda örneklerinde *G. stearothermophilus* DSM-22 endosporları üzerindeki etkisi: Toebicin 218'in *G. stearothermophilus* DSM-22 endosporları üzerindeki etkisini test etmek için örnekler inkübasyonun belirli aralıklarında (0, 1, 2 ve 7 gün) alınmış ve canlı hücre sayımı yapılmıştır. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonunda yalnızca Toebicin 218 eklenmiş tüplerde kontrol grubuna göre mısır, bezelye ve salçada sırasıyla 1.8, 1.5 ve 0.8 log azalma görülmüştür. Toebicin 218 ve laktik asitin birlikte eklendiği mısır, bezelye ve salça örneklerinde ise sırasıyla 1.7, 1.6 ve 0.8 log birimlik azalma tespit edilmiştir. Bir haftalık inkübasyon sonrasında, test edilen örneklerde, kontrol grubu haricinde, canlı hücreye rastlanmamıştır (Tablo 2).

Tablo 1. Toebicin 218 ve Toebicin 218+laktik asit kombinasyonunun farklı gıda örneklerinde *Geobacillus stearothermophilus* DSM-22'nin vejetatif hücreleri üzerine etkisi.

İnkübasyon süresi (günler)	Canlı hücre sayısı								
	Konserve mısır			Konserve bezelye			Domates salçası		
	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit
0	5.03±0.03	5.03±0.03	5.03±0.03	5.03±0.06	5.03±0.06	5.03±0.06	4.41±0.06	4.41±0.06	4.41±0.06
2	5.03±0.01	4.48±0.12	4.79±0.00	5.02±0.03	3.56±0.10	3.69±0.02	3.55±0.15	3.24±0.18	3.13±0.06
4	4.98±0.01	3.25±0.00	3.48±0.13	5.02±0.02	2.96±0.04	3.42±0.10	4.40±0.02	2.70±0.12	2.63±0.11
24	5.56 ±0.04	ND*	ND*	5.41±0.29	ND*	ND*	3.57±0.29	ND*	ND*

*Plaklarda canlı hücre sayılmamıştır.

Tablo 2. Toebicin 218 ve Toebicin 218 + laktik asit kombinasyonunun farklı gıda örneklerinde *Bacillus coagulans* DSM1'in vejetatif hücreleri üzerine etkisi.

İnkübasyon süresi (günler)	Canlı hücre sayısı								
	Konserve mısır			Konserve bezelye			Domates salçası		
	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit
0	4.74±0.00	4.74±0.00	4.74±0.00	5.17±0.07	5.17±0.07	5.17±0.07	4.02±0.18	4.02±0.18	4.02±0.18
2	4.86±0.06	3.06±0.03	3.17±0.07	4.76±0.14	3.24±0.00	3.13±0.1	4.08±0.08	3.23±0.40	3.3±0.20
4	4.78±0.02	2.63±0.01	2.83±0.17	4.72±0.05	2.70±0.06	2.63±0.05	4.4±0.18	2.28±0.16	2.35±0.62
24	4.87±0.20	ND*	ND*	5.53±0.00	ND*	ND*	2.71±0.27	ND*	ND*

*Plaklarda canlı hücre sayılmamıştır.

Tablo 3. Toebicin 218 ve Toebicin 218 + laktik asit kombinasyonunun farklı gıda örneklerinde *Geobacillus stearothermophilus* DSM-22 endosporları üzerine etkisi.

İnkübasyon süresi (günler)	Canlı hücre sayısı								
	Konserve mısır			Konserve bezelye			Domates salçası		
	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit
0	5.03±0.03	5.03±0.03	5.03±0.03	5.03±0.06	5.03±0.06	5.03±0.06	4.41±0.06	4.41±0.06	4.41±0.06
2	5.03±0.01	4.48±0.12	4.79±0.00	5.02±0.03	3.56±0.10	3.69±0.02	3.55±0.15	3.24±0.18	3.13±0.06
4	4.98±0.01	3.25±0.00	3.48±0.13	5.02±0.02	2.96±0.04	3.42±0.10	4.40±0.02	2.70±0.12	2.63±0.11
24	5.56 ±0.04	ND*	ND*	5.41±0.29	ND*	ND*	3.57±0.29	ND*	ND*

*Plaklarda canlı hücre sayılmamıştır.

Tablo 4. Toebicin 218 ve Toebicin 218 + laktik asit kombinasyonunun farklı gıda örneklerinde *Bacillus koagulans* DSM-1 endosporları üzerine etkisi.

İnkübasyon süresi (günler)	Canlı hücre sayısı								
	Konserve mısır			Konserve bezelye			Domates salçası		
	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit
0	5.76±0.03	5.76±0.03	5.76±0.03	5.3±0.09	5.3±0.09	5.3±0.09	5.56±0.07	5.56±0.07	5.56±0.07
1	5.76±0.11	4.41±0.25	4.5±0.01	5.71±0.01	3.68±0.22	3.39±0.06	5.19±0.16	2.27±0.01	2.23±0.12
2	4.68±0.06	3.65±0.01	3.45±0.15	5.17±0.08	2.75±0.01	2.63±0.14	2.71±0.14	2.01±0.15	2.21±0.20
7	4.57±0.12	ND*	ND*	4.52±0.03	ND*	ND*	2.21±0.05	1.73±0.04	1.86±0.12
15	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	2.5±0.30	ND*	ND*

*Plaklarda canlı hücre sayılmamıştır.

Toebicin 218'in gıda örneklerinde vejetatif *B. coagulans* hücreleri üzerindeki etkisi: Toebicin 218'in *B. coagulans* DSM1 üzerindeki etkisine bakıldığında, mısır, bezelye ve salça örneklerinde 4 saat içinde sırasıyla canlı hücre sayılarının 2.1, 2.5, 1.7 log birim azaldığı görülmüştür. Dört saat sonra laktik asit takviyeli örneklerde benzer sonuçlar gözlenmiştir. Yirmi dört saatlik inkübasyonun sonunda, kontrol

dışında test edilen tüm gıda numunelerinde koloni sayılarının limit seviyesinin altında olduğu görülmüştür (Tablo 3).

Toebicin 218'in gıda örneklerinde *B. coagulans* endosporları üzerindeki etkisi: Toebicin 218'in tek başına *B. coagulans* endosporlarına karşı test edilmesi sonucunda mısır, bezelye ve salça örneklerindeki

koloni sayımlarında sırasıyla 2.1, 2.6, ve 3.6 log birimlik düşüş gözlenmiştir. Örneklere uygulanan laktik asit takviyesi benzer seviyedeki canlı hücre sayılarını 2.3, 2.7, 3.4 log birim kadar düşürmüştür. Konserve mısır ve konserve bezelye için 7 günlük inkübasyonun sonunda canlı hücreye rastlanmazken, domates salçasında bir hafta inkübasyon sonunda kontrol grubunda hala canlı bakteri olduğu belirlenmiştir (Tablo 4).



Resim 1. Toebicin 218'in *Geobacillus stearothermophilus*'a karşı aktivitesi.

TARTIŞMA

Yaptığımız çalışma sonucunda, Toebicin 218'in gıdalarda bulunan her iki bakterinin büyümesine karşı etkili olduğu bulunmuştur. Vejetatif hücre ilaveli deney düzeneklerinde 24 saat içinde tamamen inaktivasyon gözlenirken, endospor içeren gıdalarda 2-7 veya 7-15 gün arasında canlı hücre sayımı, limit seviyenin altında kalmıştır.

Laktik asit, antimikrobiyal özelliğe sahip bir organik asittir ve genellikle düşük pH seviyelerinde bakteriyosinin net yükünü artırabilmesi nedeniyle bakteriyosinlerle birlikte kullanılır. Böylece laktik asit, bakteriyosinin hücre çeperi içinden translokasyonunu kolaylaştırır ayrıca bakteriyosinin çözünürlüğünü artırır⁽²³⁾. Ancak çalışmamızda, laktik asit takviyesinin *G. stearothermophilus* endosporları dışında belirgin bir mikrobiyal inaktivasyon etkisi yoktur. Yirmi

dört saatlik inkübasyonun sonunda, vejetatif bakteri hücreleri ile inoküle edilen örneklerde canlı hücreler gözlenmezken, endosporlarla kontamine olmuş gıda numunelerinde hâlâ yaşamda kalan hücreler mevcuttur. Bu durum, Toebicin 218'in vejetatif hücre membranlarında por oluşturma etkisi ile açıklanabilir (yayınlanmamış veri). Bakteriyel endosporlar vejetatif hücrelerle karşılaştırıldığında birkaç istisna dışında bakteriyosin uygulamasına karşı daha dirençlidir⁽²⁴⁻²⁶⁾. Çalışmamızda, endospor inoküle edilen örneklerde hücre sayısında (en az 2.1 log ünite - en fazla 3.2 log ünite) güçlü azalma gözlenmiştir. Ayrıca *G. stearothermophilus* endosporlarının, konserve bezelye ve mısır örneklerinde hücre sayısında daha yüksek azalma seviyeleri ile bakteriyosin uygulamasına daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Viedma ve ark.⁽¹⁹⁾, 2009 konserve ve hindistancevizi sütlerinde *G. stearothermophilus*'a karşı test edilen Enterocin AS-48 için de benzer sonuçlar bildirmiştir. Araştırmacılar, hindistancevizi sütündeki bakteri inaktivasyonunun vejetatif hücreler için endosporlardan daha hızlı olduğunu bulmuşlardır. Enterocin AS-48 aynı zamanda *B. coagulans*'ın vejetatif hücreleri ve endosporlarına karşı konserve meyve ve bitkisel gıdalarda da test edilmiştir. *B. coagulans* hücreleri domates salçasında 37°C'de 24 saat içinde 3 log birim azalmış ve 15 günlük inkübasyonun sonunda hiçbir canlı hücre gözlenmemiştir. Çalışmamızda domates salçası ile kurulan deney düzeneklerinin kontrol gruplarında hücre sayısı azalırken konserve bezelye ve mısırdaki hafif bir artış yaşanmıştır. Bu durum domates salçasında kullanılan bazı kimyasal maddeler veya katkı maddeleri ile ilgili olabilir.

Başka bir çalışmada, enterocin EJ97, hindistan cevizi sütü, konserve bezelye ve mısır, hindistan cevizi suyunda *G. stearothermophilus* CECT48 ve CECT 49 suşlarına karşı test edilmiştir. Otuz günlük inkübasyonun sonunda canlı hücre sayılarının limit seviyelerinin altında olduğu belirlendi ve araştırmacılar, mikrobiyal inaktivasyondaki değişikliklerin bakteriyosin konsantrasyonuna ve kullanılan gıdanın türüne bağlı olduğunu belirtmişlerdir⁽²⁰⁾. Enterocin EJ97 aynı zamanda *B. coagulans*'a karşı konserve mısır ve

bezelye sıvılarında EDTA içeren veya içermeyen polietilen paketlemede kullanılmıştır. Mikroskopik incelemelere göre, bakteri ve EDTA ile muamele edilmiş örneklerde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölü hücre seviyesinin %97 olduğu bulunmuştur⁽²⁷⁾.

Bu çalışmada, Toebicin 218'in konserve gıda örneklerinde hem *G. stearothermophilus* hem de *B. coagulans*'ın vejetatif hücrelerinin ve endosporlarının gelişimini inhibe ettiği bulunmuştur. Bu özelliklerinden dolayı, Toebicin 218 bakteriyosini konserve gıda ürünlerinde bozulmaya neden olan ve endospor oluşturan bakterileri inhibe etmek için güvenli bir biyolojik koruyucu olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından verilen bir proje ile (ADU-FEF 15012) desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Mogoşanu GD, Grumezescu AM, Bejenaru C, Bejenaru LE. Natural products used for food preservation. In: Grumezescu AM: Food Preservation, Academic Press, Elsevier, 2017:365-411.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804303-5.00011-0>
<https://doi.org/10.1016/C2015-0-01051-6>
2. O'sullivan L, Ross RP, Hill C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*. 2002;84(5-6):593-604.
[https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01457-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01457-8)
3. Stein T, Düsterhus S, Stroh A, Entian KD. Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(4):2349-53.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2349-2353.2004>
4. Aymerich T, Garriga M, Jofré A, Martin B, Monfort JM. The use of bacteriocins against meat-borne pathogens. In: Nolle LML, Toldra F (eds.) *Advanced Technologies for Meat Processing*, London, CRC Press, New York, Marcel Dekker, 2006; 401-18.
<https://doi.org/10.1201/9781420017311.ch15>
5. Jofré A, Aymerich T, Garriga M. Assessment of the effectiveness of antimicrobial packaging combined with high pressure to control *Salmonella* sp. in cooked ham. *Food Control*. 2008;19(6):634-8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.06.007>
6. Randazzo CL, Pitino I, Scifò GO, Caggia C. Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. *Food Control*. 2009;20(8):756-63.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.020>
7. Nieto-Lozano JC, Reguera-Useros JI, Peláez-Martínez MDC, Sacristán-Pérez-Minayo G, Gutiérrez-Fernández AJ, de la Torre AH. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control*. 2010;21(5):679-85.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.007>
8. Grande Burgos MJ, Pulido RP, del Carmen López Aguayo M, Gálvez A, Lucas R. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):22706-27.
<https://doi.org/10.3390/ijms151222706>
9. Makhmal S, Kanawjia SK, Giri A. Effect of microGARD on keeping quality of direct acidified Cottage cheese. *J Food Sci Technol*. 2015;52(2):936-43.
<https://doi.org/10.1007/s13197-013-1055-2>
10. Goñi MG, Tomadoni B, Audisio MC, Ibarra C, Roura SI, Moreira MR, Ponce AG. Application of bacteriocins from *Enterococcus hirae* on butterhead lettuce seeds inoculated with *Escherichia coli* O157:H7. *Int Food Res J*. 2016;23(6):2653-60.
11. Yule R, Barridge BD. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus stearothermophilus* strain NU-10. *Can J Microbiol*. 1976;22(12):1743-50.
<https://doi.org/10.1139/m76-257>
12. Sharp RJ, Bingham AHA, Comer MJ, and Atkinson A. Partial characterization of a bacteriocin (thermocin) from *Bacillus stearothermophilus* RS93. *Microbiology*. 1979;111(2):449-51.
<https://doi.org/10.1099/00221287-111-2-449>
13. Novotny JF, Perry JJ. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58(8):2393-6.
14. Pokusaeva K, Kuisiense N, Jasinskyte D, Rutiene K, Saleikiene J, Chitavichius D. Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*. *Cent Eur J Biol*. 2009;4(2):196-203.
<https://doi.org/10.2478/s11535-009-0009-1>
15. Başbülül Özdemir G, Biyik HH. Isolation and characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Geobacillus toebii* strain HBB-247. *Indian J Microbiol*. 2012;52(1):104-8.

- <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0227-x>
16. Başbülbül Özdemir G, Biyik HH. Isolation and characterization of toebicin 218, a bacteriocin, produced by *Geobacillus toebii* HBB-218. *Afr J Biotechnol.* 2012;11(30):7711-9. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1331>
 17. Garg N, Tang W, Goto Y, Nair SK, Van Der Donk WA. Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(14):5241-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116815109>
 18. Pranckute R, Kaunietis A, Kananaviciute R, Lebedeva J, Kuisiene N, Saleikiene J, Citavicius D. Differences of antibacterial activity spectra and properties of bacteriocins, produced by *Geobacillus* sp. bacteria isolated from different environments. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2015;5(2):155-61. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.5.2.155-161>
 19. Viedma PM, Abriouel H, Omar NB, López RL, Valdivia E, Gálvez A. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* in canned food and coconut milk samples by addition of enterocin AS-48. *Food Microbiol.* 2009;26(3):289-93. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.007>
 20. Viedma PM, Abriouel H, Omar NB, López RL, Gálvez A. Effect of enterocin EJ97 against *Geobacillus stearothermophilus* vegetative cells and endospores in canned foods and beverages. *Eur Food Res Technol.* 2010;230(3):513-9. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1194-x>
 21. Brackett RE. Fruits, vegetables, and grains. In: Doyle M, Beuchat LR, Montville TJ (Eds.), *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers.* ASM Press, Washington, 2001:127-38.
 22. Abriouel H, Valdivia E, Martinez-Bueno M, Maqueda M, Gálvez A. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J Microbiol Method.* 2003;55(3):599-605. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00202-1)
 23. Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar NB. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol.* 2007;120(1-2):51-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>
 24. Abriouel H, Maqueda M, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Valdivia E. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(3):1473-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1473-1477.2002>
 25. Grande MJ, Lucas R, Abriouel H, et al. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int J Food Microbiol.* 2005;104(3):289-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.010>
 26. Lucas R, Grande MJ, Abriouel H, et al. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem Toxicol.* 2006;44(10):1774-81. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.05.019>
 27. Viedma PM, Ercolini D, Ferrocino I, et al. Effect of polythene film activated with enterocin EJ97 in combination with EDTA against *Bacillus coagulans*. *LWT-Food Sci Technol.* 2010;43(3):514-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.020>