



## Enterosin KP'nin Antibakteriyal Aktivitesi Üzerine Para-Hidroksi-Benzoik Asit ile Propil-Parabenin Sinerjit Etkisi

Zeliha Yıldırım<sup>1\*</sup>, Yaselin İlk<sup>1</sup>, Metin Yıldırım<sup>1</sup>

<sup>1\*</sup> Niğde Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 51240 Niğde, Türkiye

### MAKALE BİLGİSİ

Geliş 18 Kasım 2013  
Kabul 27 Aralık 2013  
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

#### Anahtar Kelimeler:

Enterosin KP  
*Enterococcus faecalis* KP  
Gıda koruyucuları  
pHBA  
Propil-paraben

### ÖZET

Bu çalışmada, *Enterococcus faecalis* KP tarafından üretilen enterosin KP'nin inhibitör aktivitesi üzerine gıda koruyucularından p-hidroksi-benzoik asit ve propil-parabenin etkisi incelenmiştir. Test mikroorganizması olarak enterosin KP bakteriyosinine dayanıklı olan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium kullanılmıştır. Enterosin KP (1600 AU/ml) tek başına ve p-hidroksi-benzoik asit (%0,1-0,3) ve propil-paraben (%0,008-0,16) ile birlikte kullanılarak *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium'un gelişimi üzerine inhibitör aktivitesi belirlenmiştir. Enterosin KP, p-hidroksi-benzoik asit (%0,1-0,3) ve propil-paraben (%0,008-0,16) ile birlikte kullanıldığında inhibitör aktivitesinin arttığı ve hatta *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium'un enterosin KP'ye karşı duyarlı hale geçtikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, enterosin KP diğer gıda koruyucu sistemleriyle birlikte kullanıldığında inhibitör aktivitesi ve spektrumunun arttığı saptanmıştır.

\* Sorumlu Yazar:

E-mail: zeliha.yildirim@nigde.edu.tr

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 2(1): 1-5, 2014

## The Synergist Effect of P-Hydroxybenzoic Acid and Propyl-Paraben on The Antibacterial Activity of Enterocin KP

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 November 2013  
Accepted 27 December 2013  
Available online, ISSN: 2148-127X

#### Keywords:

Enterocin KP  
*Enterococcus faecalis* KP  
Food preservatives  
pHBA  
Propyl-paraben

### ABSTRACT

In this study, the effects of food preservative p-hydroxybenzoic acid and propyl-paraben on the inhibitory activity of enterocin KP produced by *Enterococcus faecalis* KP were determined. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium, resistant to enterocin KP bacteriocin, were used as target organisms. The inhibitor activity of enterocin KP (1600 AU/ml) alone or in combination with p-hydroxybenzoic acid (%0.1-0.3) and propyl-paraben (%0.008-0.16) on the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium were determined. The inhibitory activity of enterocin KP was increased when used in combination with p-hydroxybenzoic acid and propyl-paraben at concentrations of 0.1-0.3% and 0.008-0.016%, respectively. Furthermore, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium became sensitive to enterocin KP. In conclusion, the use of enterocin KP in combination with other food preservatives principles resulted in an increase in its inhibitory activity and spectrum.

\* Corresponding Author:

E-mail: zeliha.yildirim@nigde.edu.tr

## Giriş

Günümüzde kaliteli, besin değeri yüksek, kimyasal koruyucu içermeyen, doğal ve az işlenmiş hazır gıdalara olan tüketici talepleri artmaktadır. Bundan dolayı geleneksel muhafaza teknikleri olan yüksek ısı işlem, tuzlama, asidifikasyon, kurutma ve kimyasal koruyucu yerine yeni muhafaza tekniklerine yönelme söz konusudur. En çok araştırılan yeni muhafaza teknikleri yüksek hidrostatik basınç, vurgulu elektrik alanları, modifiye atmosferde paketlenme ve biyokoruma gibi termal olmayan inaktivasyon tekniklerdir (Soomra ve ark., 2002; De Vuyst ve Leroy, 2007). Bu yöntemlerden özellikle biyokoruyucuların kullanım oranları gün geçtikçe artmaktadır. Gıdaların güvenliğini ve raf ömrünü iyileştirmek amacıyla koruyucu kültürlerin ve/veya bunlar tarafından üretilen antimikrobiyal bileşiklerin kullanılmasına biyokoruma yöntemi denilmektedir (Stiles, 1996). Biyokoruma yöntemlerinden birisi de laktik asit bakterileri (LAB) veya bunların üretmiş oldukları antimikrobiyal bileşik olan bakteriyosinlerin kullanılmasındır.

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, küçük katyonik, hidrofobik veya amfilik antimikrobiyal proteinler/peptitlerdir. Bakteriyosinler gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilere karşı etkili olup, bu etkilerini bakterisidal veya bakteriyostatik şekilde gösterebilmektedirler. Doğal kaynaklı ve güvenli olmaları, insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve korunacak gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın gıda kaynaklı bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etme özellikleri ile bakteriyosinler önemli biyokoruyucular arasında yer almaktadırlar (Klaenhammer, 1993; Papagianni, 2003; Cutter ve ark., 1995).

Bakteriyosinler, mikroorganizmaların sitoplazmik membranı üzerinde etkilidirler. Membranın negatif yüklü fosfolipit gruplarına ya da protein yapılı reseptörlere bağlanarak membran içine girerler ve gözenek oluştururlar. Böylece proton itici gücün azalmasına, küçük bileşiklerin hücreden sızmasına ve dolayısıyla hücrenin ölmesine neden olurlar (Montville ve Chen, 1998; Mcauliffe ve ark., 2001).

Gıdaların muhafazasında yararlanılan farklı yöntemlerin antimikrobiyal etkinlikleri hurdle teknolojisinin uygulanması ile iyileştirilebilir. Hurdle teknolojisi, optimum düzeylerinin altında kullanıldıklarında sinerjistik etki yaratan iki veya daha fazla antimikrobiyal ajanın birlikte kullanılması olarak tanımlanabilir. Bu yaklaşım özellikle hem olumsuz koşullarda muhafaza edilen gıdaların stabilitesinin iyileşmesinde hem de gıdanın kabul edilebilirliğinin artmasında önemli rol oynamaktadır. Stres koşulları altında hasarlı hale gelen mikrobiyal hücreler, daha önce dayanıklı oldukları fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı duyarlı hale gelebilirler (Leistner ve Gorris, 1995). Hurdle teknolojisinde bakteriyosinler önemli yer almaktadır. Hurdle teknolojisinde bakteriyosinler, koruyucu kimyasal maddeler, doğal antimikrobiyaller, pH, ısı uygulaması, modifiye atmosferde paketlenme, vurgulu elektrik alanı, yüksek hidrostatik basınç ve diğer termal olmayan uygulamalar ile kombine şekilde kullanılmaktadır.

Gıda endüstrisinde koruyucu olarak para-hidroksi benzoik asit (pHBA) ve esterleri antimikrobiyal etkilerinin fazla olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. pHBA veya 4 hidroksibenzoik asit, benzoik asidin fenolik bir türevi olup paraben olarak bilinen esterlerinin hazırlanmasında yararlanılan temel bileşiktir. pHBA'nın metil, etil ve propil esterleri gıda endüstrisinde koruyucu olarak kullanılmaktadırlar. Güvenli kabul edilen (GRAS statüsünde) bir gıda koruyucusudur. Gıdalarda kullanım dozu %0,1 düzeyindedir. Antimikrobiyal etkisi pH'ya bağlı olmayıp alkil zincirinin uzunluğuna bağlıdır. Uzunluk arttıkça etkinliği de o derece artmaktadır. Ancak, sudaki çözünürlüğü ester grubundaki karbon sayısına bağlı olduğundan karbon sayısı arttıkça çözünürlüğü de azalmaktadır. İyi bir antifungal etkiye sahip olmalarına karşın sınırlı düzeyde antibakteriyal etki göstermektedirler. Antibakteriyal etkinlikleri açısından ise Gram-negatif bakterilere kıyasla Gram-pozitif bakteriler üzerinde etkilidirler.

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, ancak, gıda kaynaklı patojen bakterilerden *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium'a karşı inhibitör etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (İsleroglu ve ark., 2012).

Gıda koruyucularının bakteriyosinlerin inhibitör spektrumu üzerine az araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı enterosin KP'nin inhibitör aktivitesi ve spektrumu üzerine pHBA ve propil-parabenin etkisini belirlemektir.

## Materyal ve Yöntem

### *Mikroorganizmalar ve Besiyerleri*

Bu çalışmada, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium test mikroorganizması, *Enterococcus faecalis* KP ise enterosin KP üreticisi olarak kullanılmıştır. Laktik asit bakterileri de Mann Rogosa Sharpe (MRS, Fluka), diğer bakteriler ise Brain Hearth Infusion (BHI, Merck) besiyerinde geliştirilmiştir. *E. faecalis* KP 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.

### *Enterosin KP'nin Hazırlanması*

*E. faecalis* KP MRS besiyerine %0,1 oranında inoküle edilip 32°C'de 18 saat inkübasyon işlemine tabi tutulduktan sonra bakteri kültürü santrifüj edilip (6000 x g/20 dk) filtrat 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 8000 g/ 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 (Moreno ve ark., 2002).

#### Gıda Koruyucuları ve pH’nın Enterosin KP’nin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Para-hidroksi benzoik asit (%0,1, 0,2 ve 0,3) ve propil-paraben (%0,08 ve 0,16) farklı oranlarda BHI 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. Gıda koruyucularının enterosin KP aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için test mikroorganizmaları olan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium ilave edildikten (600 nm’de OD değeri 0,1) sonra enterosin KP 1600 AU/mL düzeyinde katılmıştır. Hazırlanan örnekler 35-37°C’de 16 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon işleminin belirli aralıklarında örnekler alınıp 600 nm’de absorbans değeri okunmuştur.

#### İstatistiksel analizler

Araştırmadan elde edilen veriler p<0,05 seviyesinde varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılık ise LSD testi kullanılarak (p<0,05) belirlenmiştir (SAS, 1995).

#### Bulgular ve Tartışma

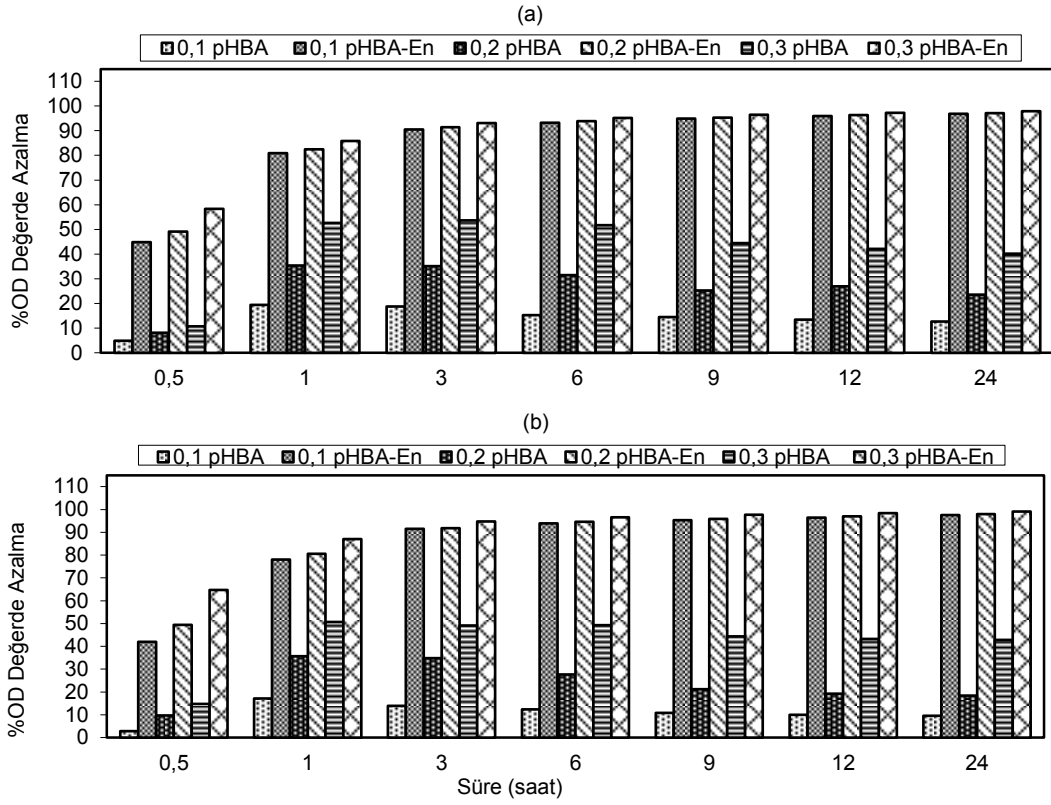
pHBA ve propil-paraben enterosin KP aktivitesi üzerindeki etkisi Şekil 1 ve 2’de verilmiştir. Şekil 1’de görüldüğü üzere pHBA’nın tek başına kullanıldığı örneklerde istatistiksel olarak önemli olmasa da indikatör bakterilerden *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium gelişiminin yavaşladığı ve ilave edilen miktara bağlı olarak da absorbans değerindeki azalmanın arttığı belirlenmiştir (P>0,05). pHBA enterosin KP ile birlikte kullanıldığında aktivitesinin arttığı ve *E. coli* O157:H7 ile *Salmonella* Typhimurium’un gelişimini çok etkili bir şekilde azalttıkları belirlenmiştir (P<0,01). pHBA %0,1, 0,2 ve 0,3 düzeyinde enterosin KP ile kombine uygulandığında kontrol örneğine göre *E. coli* O157:H7 absorbans değerinde ilk 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonunda sırasıyla %47,8, 57,2 ve 64,4, *Salmonella* Typhimurium’un absorbans değerinde ise %38,1, 50,9 ve 62,6 oranında bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 1). İnkübasyon işlemi (24 saat) esnasında da belirtilen örneklerde absorbans değerlerinde istatistiksel olarak önemli olmasa da göreceli bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir (P>0,05).

pHBA gibi, propil-paraben de *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium’a karşı enterosin KP’nin aktivitesini arttırdığı yani sinerjist etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Sadece propil-parabenin kullanıldığı örneklerde bakterilerin gelişiminin yavaşladığı, ancak

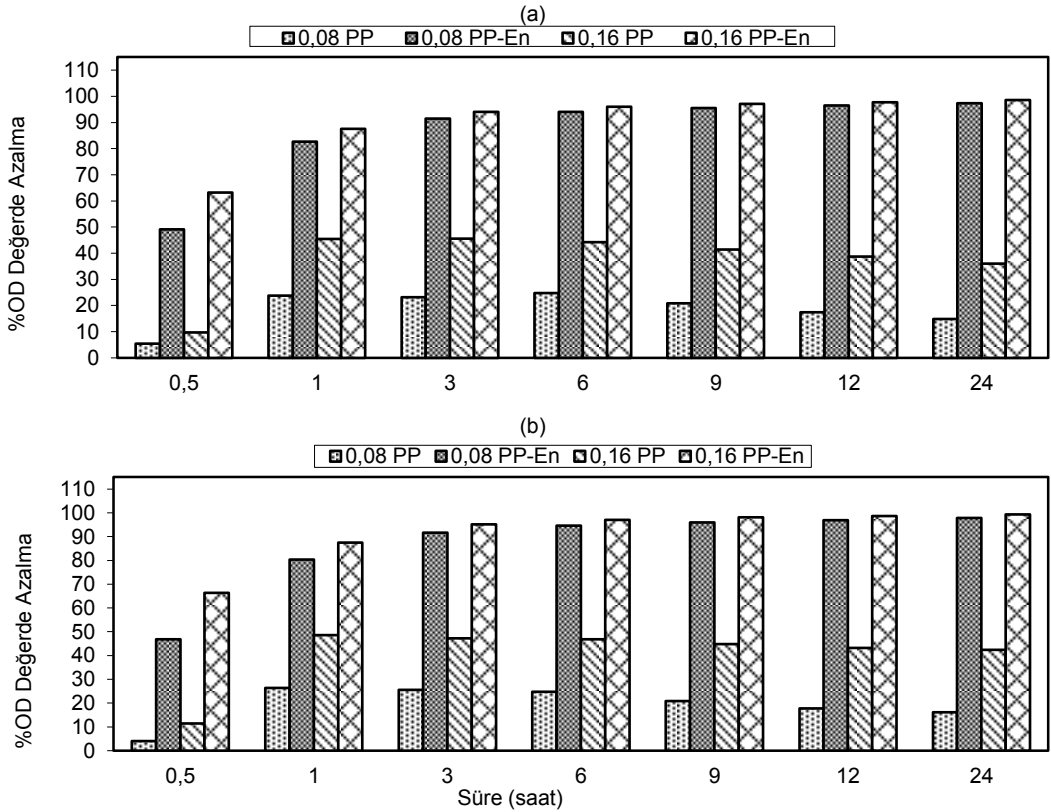
propil-paraben enterosinle kombine uygulandığında bakterilerin gelişiminin önlendiği görülmüştür (Şekil 2). Propil-paraben %0,08 ve 0,16 oranında enterosin KP ile birlikte kullanıldığında ilk 30 dakikada sırasıyla *E. coli* O157:H7 absorbans değerinde %48,2 ile %62,2, *Salmonella* Typhimurium’da ise %45,0 ile %65,1 oranında bir azalmaya neden olmuştur (P<0,01). İnkübasyon işlemi boyunca da örneklerin absorbans değerlerinin az da olsa azaldığı gözlenmiştir (P>0,05). Bunlara ilaveten propil-parabenin enterosin KP’nin aktivitesi üzerindeki sinerjist etkisinin pHBA’ye göre daha yüksek ve *E. coli* O157:H7’nin *Salmonella* Typhimurium’a göre daha fazla duyarlı olduğu gözlenmiştir.

pHBA-enterosin KP ve propil-paraben-enterosin KP kombinasyonlarının enterosin KP bakteriyosinine dayanıklı olan Gram-pozitif bakterilere etkisini belirlemek için indikatör bakteri olarak gıda kaynaklı patojen bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* bakterisi kullanılmıştır. Analiz sonucunda pHBA ve propil-parabenin yalnız kullanıldıkları örneklerde *Staphylococcus aureus*’un gelişimini yavaşlattığı belirlenmiştir (Şekil 3). İnkübasyon süresinin sonunda kontrol örneğinin absorbans değeri (600 nm) yaklaşık 2,128 iken %0,08 ve %0,16 propil-paraben içeren örneklerde 1,175 ile 1,345; %0,1 ve 0,3 pHBA içeren örneklerde ise 1,784 ile 1,154 olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). Enterosin KP+ propil-paraben ve enterosin KP+pHBA içeren örneklerde ise bakteri gelişiminin tamamen önlendiği saptanmıştır (P<0,01). Buradan da anlaşılacağı üzere gerek propil-paraben gerekse pHBA *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı inhibitör etki göstermeyen enterosin KP’nin aktivite kazanmasına neden olmuştur. pHBA %0,1, 0,2 ve 0,3 düzeyinde enterosinle birlikte uygulandığında kontrol örneğine göre *Staphylococcus aureus* absorbans değerinde 30 dakikalık süre sonunda %52,6, 64,9 ve 74,4; propil-paraben %0,08 ve 0,16 oranında enterosin KP ile birlikte kullanıldığında ise %62,4 ile %79,2 düzeyinde bir azalmaya neden olmuştur (P<0,01)(Şekil 3). İnkübasyon işlemi (24 saat) esnasında da belirtilen örneklerde absorbans değerlerinde az da olsa bir düşüşün olduğu tespit edilmiştir. *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium bakterilerinde olduğu gibi propil-paraben’in pHBA’ya göre *Staphylococcus aureus*’a karşı enterosin KP aktivitesi üzerindeki sinerjist etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca kullanılan test bakteriler karşılaştırıldığında Gram-pozitif bakterilerin Gram-negatif bakterilere göre propil-paraben ve pHBA’ya daha fazla duyarlı olduğu gözlenmiştir.

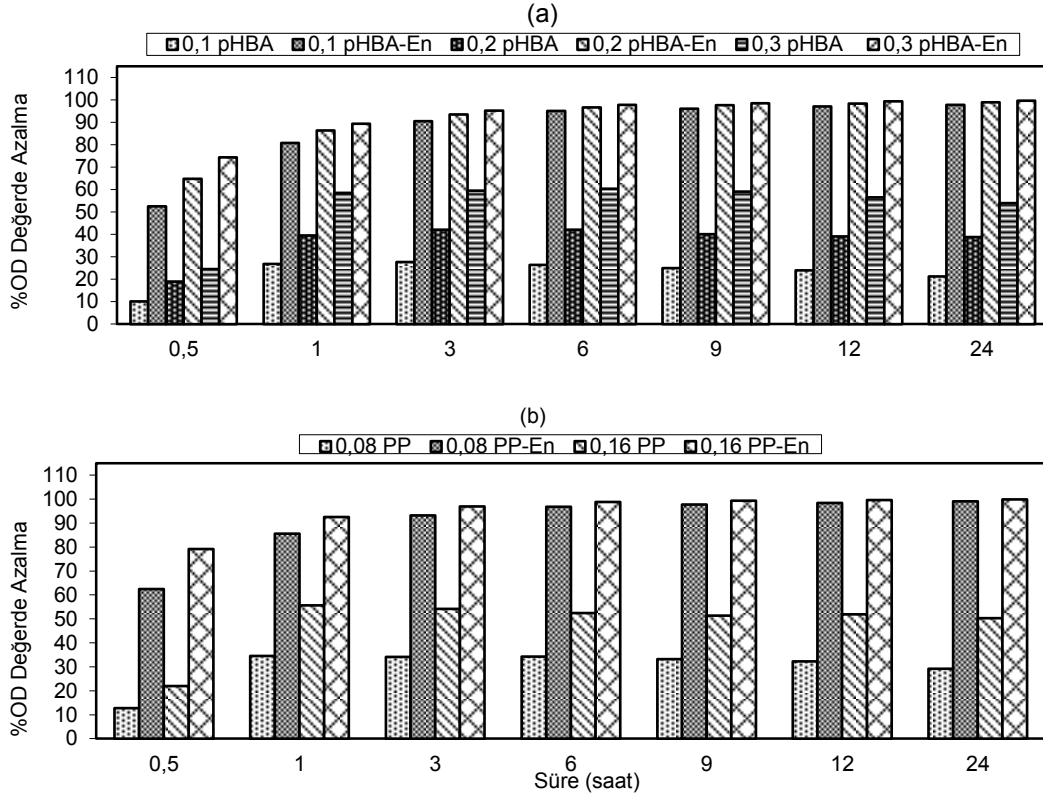
Propil-paraben ve pHBA’nın nisin, özellikle de sakasin P ve kurvasin A’nın *L. innocua*, *Lb. curvatus*, *E. coli* ve *Salmonella heidelberg*’e karşı aktivitesini artırdığı Ganzle ve ark. (1999) tarafından da bulunmuştur. Garcia ve ark. (2003, 2004)’da Na-benzoatın enterosin EJ97 bakteriyosininin *Bacillus coagulans* ve *L. monocytogenes*’e karşı aktivitesini arttırdığını saptamışlardır.



Şekil 1. Enterosin KP'nin *E. coli* O157:H7 (a) ve *Salmonella Typhimurium* (b)'a karşı inhibitör aktivitesi üzerine pHBA'nın etkisi. En, enterosin KP; pHBA, p-hidroksi benzoik asit (%0,1, 0,2 ve 0,3); OD, absorpsiyon değeri.



Şekil 2. Enterosin KP'nin *E. coli* O157:H7 (a) ve *Salmonella Typhimurium* (b)'a karşı inhibitör aktivitesi üzerine propil parabenin etkisi. En, enterosin KP; PP, propil paraben (%0,08-0,16); OD, absorpsiyon değeri.



Şekil 3. Enterosin KP'nin *Staphylococcus aureus*'a karşı inhibitör aktivitesi üzerine pHBA (a) ve propil- parabenin etkisi (b). En, enterosin KP; pHBA, p-hidroksi benzoik asit (%0,1, 0,2 ve 0,3); PP, propil paraben (%0,08-0,16); OD, absorbans değeri.

### Sonuç

Gıda koruyucularından pHBA ve propil-paraben enterosin KP ile kombine uygulandığında hem bakteriyosinin aktivitesinin hem de spektrumunun arttığı tespit edilmiştir. Gıda endüstrisinde büyük bir sorun yaratan Gram-negatif patojen bakterilerden *E. coli* O157:H7 ile *Salmonella* Typhimurium ve antibiyotik dirençliği yüksek olan Gram-pozitif patojen bakteri *Staphylococcus aureus*'un inhibe edilmesinde gıdalarda kullanımına izin verilen kimyasal koruyucularla enterosin KP'nin birlikte kullanımı hurdle teknolojisinin ideal uygulamalarından biri olacağı düşüncesindeyiz. Ayrıca enterosin KP ile kombine uygulanmasından dolayı kullanılacak kimyasal koruyucu madde miktarı da azaltılabilir.

### Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen TOVAG-1020282 nolu projeden üretilmiştir

### Kaynaklar

- Anonim. 1995. "User's Guide: Statistics", Version 6.12 Ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Cutter CN, Siragusa GR. 1995. Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *Journal of Food Protection*, 58: 977-983.
- De Vuyst L, Leroy F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal Molecular Microbiology Biotechnology*, 13: 194-199.
- Galvez A, Abriouel H, Lopez RL, Omar NB. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 51-70.
- Ganzle MG, Weber S, Hammes WP. 1999. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 46: 207-217.

- Garcia MT, Ben Omar N, Lucas R, Perez-Pulido R, Castro A, Grande MJ, Martínez-Canamero M, Galvez A. 2003. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 on *Bacillus coagulans* CECT 12. *Food Microbiology*, 20: 533-536.
- Garcia MT, Lucas R, Abriouel H, Omar NB, Perez R, Grande MJ, Canamero MM, Galvez A. 2004. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 Against '*Bacillus macroides/Bacillus maroccanus*' isolated from zucchini pure. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 731-737.
- Iseroglu H, Yıldırım Z, Tokatlı M, Nilgun O, Yıldırım M. 2012. Partial characterisation of enterocin KP produced by *Enterococcus faecalis* KP, a cheese isolate. *International Journal of Dairy Technology*, 65: 90-97.
- Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology*, 12: 39-86.
- Leistner L, Gorris LGM. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*, 6: 41-46.
- Mcauliffe O, Ross RP, Hill C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Reviews*, 25: 285-308.
- Montville TJ, Chen Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50: 511-519.
- Moreno MR, Leisner JJ, Tee LK, Ley C, Radu S, Rusul G, Vancanneyt M, De Vuyst L. 2002. Microbial analysis of Malaysian Tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 147-57.
- Papagianni M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances*, 21: 465-499.
- Soomro AH, Masud T, Anwaar K. 2002. Role of Lactic acid bacteria in preservation and human health- a review. *Pak. J. Nutr.* 1: 20-24.
- Stiles ME, Holzapfel WH. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: 1-29.