

Lizozim Enzim Preparatlarının Antibakteriyal ve Antifungal Özellikleri

Handan ERKAN ŞAHİN^{*1}, **Adem YAVAŞ²**, **Filiz YILDIZ-AKGÜL³**, **Ayşe GÜRSOY⁴**¹ Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı, Ankara² Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi, Koçarlı, Aydın³ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, Koçarlı, Aydın⁴ Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, Dışkapı, Ankara

Öz: Bu çalışmada yumurta akından ve biyoteknolojik yolla elde edilen lizozim enzim preparatlarının antibakteriyal ve antifungal aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmada yumurta lizozimin 20, 30, 40, 50 ppm ve sonrasında 100, 150 ve 200 ppm konsantrasyonu ile biyoteknolojik lizozimin 2, 8, 10 ve 20 ppm konsantrasyonu laktik asit bakterileri (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*), *Saccharomyces cerevisiae* mayası ve *Aspergillus flavus* küfü üzerine denenmiştir. Sonuçta yumurta lizoziminin ve biyoteknolojik lizozim preparatlarının tüm konsantrasyonları laktik asit bakterilerin gelişimini etkilememiştir. Maya mikroorganizmaları da laktik asit bakterilerine benzer şekilde lizozimden etkilenmemiştir. 200 ppm lizozim konsantrasyonunda bile üreme göstermiştir. Yumurta lizoziminin küfler üzerine antifungal aktivitesi 50 ppm konsantrasyonda görülmüştür. Biyoteknolojik lizozimde ise 10 ppm de maya gelişimi olurken 20 ppm de maya gelişimi görülmemiştir. Buna karşın biyoteknolojik lizozimin tüm konsantrasyonlarında küf gelişmiştir. Sonuç olarak yumurta lizozimi laktik asit bakterileri ve mayaların gelişimini etkilemezken küfler üzerine antifungal aktivite göstermiştir. Biyoteknolojik lizozimin antibakteriyal ve antifungal aktivitesi sınırlı olmuştur.

Anahtar kelimeler: lizozim, laktik asit bakterileri, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*

Antimicrobial and Antifungal Properties of Lysozyme Enzyme Prepare

Abstract: In this study, the antibacterial and antifungal activities of lysozyme enzyme preparations obtained from egg white and biotechnologically were investigated. In the study, 20, 30, 40 and 50 ppm, after that 100, 150 and 200 ppm concentrations of egg lysozyme and 2, 8, 10 and 20 ppm concentrations of biotechnological lysozyme were tested on lactic acid bacteria (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*), yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) and molds (*Aspergillus flavus*). As a result, all concentrations of egg lysozyme and biotechnological lysozyme preparations did not affect the growth of lactic acid bacteria. Yeast microorganisms also showed growth even at 200 ppm, similar to lactic acid bacteria. Antifungal activity of egg lysozyme on molds was observed at 50 ppm concentration. In biotechnological lysozyme, while yeast growth was observed at 10 ppm, yeast growth was not observed at 20 ppm. In contrast, mold developed at all concentrations of biotechnological lysozyme. As a result, while egg did not affect the growth of lactic acid bacteria and yeasts, it showed antifungal activity on molds. The antibacterial and antifungal activity of biotechnological lysozyme has been limited.

Keywords: lysozyme, lactic acid bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus***GİRİŞ**

Teknolojinin gelişmesiyle beraber yapılan araştırmalar doğrultusunda, gıda sanayisinde özellikle doğal kaynaklı antimikrobiyal maddelerin kullanıldığı biyo-koruma metotlarına olan ilginin gün geçtikçe artması ve tüketici tercihinin de bu yönde değişmesiyle, doğal enzimlerin (lizozim) gıdalarda kullanım potansiyeli artış göstermektedir (Öztürkcan ve Acar, 2017).

Alexander Fleming tarafından ilk olarak 1922’de keşfedilmiş olan lizozim, muramidaz (EC.3.2.1.17) enzim yapısında olup ticari olarak kullanım alanına sahip tek antimikrobiyal maddedir (Yılmaz ve Tosun, 2012; Sudağidan ve Aydın, 2013; Öztürkcan ve Acar, 2017).

Lizozimler karakteristik özelliklerine (yapısı, katalizleme ve immünizasyon) göre tavuk tipi (c-tipi) lizozim, kaz tipi (g-tipi) lizozim ve omurgasız (i-tipi) lizozim olmak üzere 3 temel grupta sınıflandırılmaktadır. Ayrıca faj tipi lizozim, bakteri

lizozimi ve bitkisel kaynaklı lizozimler de kabul edilmektedir (Wu ve ark., 2019). Ancak her lizozim kaynağı endüstriyel üretim için kullanılmaz. Bugüne kadar üzerinde kapsamlı bir şekilde çalışılan ve lizozim içeriği bakımından en zengin olan kaynağı oluşturan tavuk yumurtası beyazı şu anda biyolojik olarak aktif lizozim preparatlarının ana kaynağını oluşturmakta ve tavuk yumurtası beyazı lizozimi (HEWL) olarak bilinmektedir (Le’snierowski ve Yang, 2021; Wang ve ark., 2012). Tavuğun yumurta albümininde bulunan ve yumurta ağırlığının %58-64’ünü oluşturan lizozim (muramidaz), albüminin yaklaşık %3,5’ini oluşturmaktadır (Lewko ve ark., 2021).

***Sorumlu Yazar:** handanerkan76@gmail.com

Bu çalışma doktora tezi çalışmasından üretilmiştir.

Geliş Tarihi: 3 Kasım 2022**Kabul Tarihi:** 23 Kasım 2022

Birçok bitki ve hayvan dokusunda bulunan lizozim enzimi, yumurta akında fazla miktarda bulunması nedeniyle (100 g yumurta akı kuru maddesinde 3,5 g civarında) ticari olarak yumurta akından üretilmektedir (Yaygın, 1989; Cankurt ve Sağdıç, 2019). Yumurta akı lizozimi 129 aminoasitten oluşan ve molekül ağırlığı 14,307 Da olan küçük molekülü hidrolitik bir enzimdir (Mine ve ark., 2004).

Son yıllarda lizozim biyoteknolojik yollarla mikroorganizmalardan da üretilmektedir. Mikrobiyal lizozim (LysochTM G4), *Streptomyces* sp. tarafından fermantasyon yoluyla üretilen bakteriyel lizozim konsantrasyon tozudur. İşlenmiş gıdalarda ve üretim sırasında Gram-pozitif ve Gram-negatif bozulmayı ve patojenik bakterileri inhibe ederek raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadır (Anonim, 2018).

Gıdaları uzun süre muhafaza edebilmek için ısıl işlem uygulama, soğutma, dondurma, kurutma ve fermantasyon gibi çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Daha önceleri kimyasal koruyucu olarak sadece tuz ve bazı organik asitler bilinirken, son zamanlarda çeşitli kimyasal maddelerin kullanımı da yaygınlaşmıştır. Bunlar ile ürünün raf ömrü uzatılabilmekte ancak sağlık endişelerini de beraberinde getirmektedirler. Dolayısıyla, gıdaların korunmasında doğal antimikrobiyal maddelerin kullanılması yönünde görüşler gelişmektedir (Güven, 1998; Cankurt ve Sağdıç, 2019).

Antifungal, antiviral ve özellikle Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyal etkili ve doğal kaynaklı bir koruyucu olan lizozimin gıdaların muhafaza edilmesi ve raf ömrünün uzatılması amacıyla gıda endüstrisinde kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Yılmaz ve Tosun, 2012; Lewko ve ark., 2021). Natamisin, sorbat, benzoat gibi antimikrobiyal ve antifungal maddeler yoğurtta başlıca sorunlardan birisi olan maya ve küf gelişmesini engellemek amacıyla kullanılmaktaydı (Gürsel ve ark., 2004; Sudağdan ve Aydın, 2013). Fakat 2009 yılında yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2009/25)'inde yoğurt üretiminde natamisin, sorbat gibi koruyucu maddelerin kullanımı yasaklanmıştır (Anonim, 2009). WHO ve FAO 1993 yılında, lizozimin toksik olmadığını bildirmiş olup Almanya, İtalya, Fransa, Japonya, İngiltere ve Avusturya gibi birçok ülke lizozimin gıdalarda kullanımına izin vermiştir. Bunun yanında lizozim, Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde nisin gibi "GRAS" statüsünde yer almaktadır (Öztürkcan ve Acar, 2017).

Prokaryot ve ökaryot canlılarda yaygın olarak bulunan lizozimin, antibakteriyal aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar sonucu Gram pozitif bakterilerde hücre zarının en önemli yapısı olan peptidoglikan tabakadaki N-asetilmuramikasit ve N-asetilglukozamin arasındaki β -1,4-glikozidik bağları hidrolize ederek diğer bir deyişle litik aktivite sonucu hücre zarının yapısal bütünlüğünün bozulmasına sebep olduğu

belirtilmektedir (Wang ve ark., 2005; Wang ve ark., 2012; Shimazakia ve Takahashib, 2018). Bu nedenle, lizozim, *Clostridium tyrobutyricum*'un vejetatif formunun hücre duvarını parçalayarak etki mekanizmasını göstermektedir. Dolayısıyla peynirlerin olgunlaşması sırasında söz konusu bakterinin gelişimi ve bütirik asit fermentasyonu yapması sonucu ortaya çıkan geç şişme kusurunun önlenmesi ve ekonomik kaybın önüne geçilmesi amacıyla peynir üretiminde doğal koruyucu olarak kullanılabilir (Wasserfall ve Teuber, 1979; Yaygın, 1989; Bogovic Matijas'ic ve ark., 2007; Brandle ve ark., 2016). Lizozimin peynir üretiminde koruyucu olarak kullanılabilmesi nitrat kullanımına alternatif bir uygulama olarak karşımıza çıkmaktadır. Fransa 1981 yılında peynir üretiminde endüstriyel olarak lizozimin uygulanmasına izin veren ilk ülke olmuştur (Yaygın, 1989). Lizozime, mevcut AB mevzuatına (Avrupa Parlamentosu ve 95/2 / EC sayılı Avrupa Parlamentosu ve Konsey Direktifi No.) ve Codex Alimentarius'a (Codex Standard 283 1978) göre peynirde koruyucu madde (E1105) olarak kullanımına izin verilmektedir (Bogovic Matijas'ic ve ark., 2007). Peynirlerde kullanım miktarı, kilogram peynir başına 50 ila 350 mg lizozim arasında değişmektedir (Schneider ve ark., 2010; Schneider ve ark., 2011).

Bazı küf türleri insan ve hayvan sağlığını tehdit eden toksik ve kanserojenik etkiye sahip mikotoksinler üretirler. Mikotoksinlerin oluşumu önemli oranda gıda kayıplarına da neden olmaktadır. Bu olumsuzlukları gidermek için bazen antifungal katkıların kullanılması kaçınılmaz hale gelmektedir. Bu nedenle küflere karşı propiyonik, sorbik ve benzoik asitlerin tuzları, kükürtdioksit ve natamisin gibi kimyasal maddelerin kullanılması gerekmektedir (Topal 1993; Güven, 1998; Cankurt ve Sağdıç, 2019). Ancak kimyasal koruyucuların sağlık üzerine olumsuz etkileri tüketicileri doğal alternatiflere yönlendirmektedir (Cankurt ve Sağdıç, 2019).

Lizozimin antibakteriyal aktivitesi üzerine yoğun çalışmalar yapılmış olmasına rağmen antifungal etkisi ve laktik asit bakterilerine olan antibakteriyal etkisi üzerinde çalışmalar sınırlı sayıdadır (Wang ve ark., 2012).

Bu sebeple gerçekleştirilen bu çalışmada yumurta akından ve biyoteknolojik yolla elde edilen lizozim enzim preparatlarının, starter kültür olarak çok fazla kullanılan laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* ve ürünlerde bozulmaya sebep olan *Aspergillus flavus* küfü ile *Saccharomyces cerevisiae* mayası üzerine olan antibakteriyal ve antifungal aktivitesi araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada kullanılan yumurta akı lizozimi (Lysoch E4) ve biyoteknolojik yolla elde edilen lizozim (Lysoch G4) preparatları FMI Gıda Kimya İthalat-İhracat Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti (İzmir) 'nden temin edilmiştir. Termofilik laktik asit bakterileri Yo-Flex Express 1 Chr. Hansen (Denmark), *Saccharomyces cerevisiae* Pakmaya (Türkiye) firmasından ve *Aspergillus flavus* ise ATCC 9643 2'li stik (01182P) Sigma (USA) firmasından temin edilmiştir. Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer de deneme kapsamında kullanılmıştır.

Yöntem

Örneklerin hazırlanması

Laktik asit bakterileri (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*) MRS (De Man, Rogosa And Sharpe) Broth besiyerinde 35°C'de 48 saat aktive edilmiştir. Aktive edilen bakteriden 1 ml quartz tüpe alınarak 600 nm dalga boyunda absorbans değeri 0,063 olacak şekilde spektrofotometrede (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate, USA) 0,5 Mac-Farland olacak şekilde konsantrasyon ayarlanmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* mayası Malt extract broth besiyerinde 32°C'de 96 saat aktive edilmiştir. Konsantrasyon 0,5 Mac-Farland olacak şekilde ayarlanmıştır. *Aspergillus flavus* Potato Dextrose Agar katı besiyeri üzerine bir öze yardımıyla inoküle edilmiş ve 32°C'de 96 saat aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Hif konsantrasyonu 10⁸ olacak şekilde ayarlanmıştır.

Lizozim enzim preparatları ise mikrodilüsyon tüplerinde konsantrasyonları yumurta lizozimi için 20, 30, 40 ve 50 ppm (firma önerisi) sonrasında 100, 150 ve 200 ppm; biyoteknolojik lizozimin ise 2, 8, 10 ve 20 ppm şeklinde stok çözeltiden hazırlanmıştır.

Antibakteriyel Aktivite

Laktik asit bakterileri olarak *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plate üzerine 10³, 10⁴, 10⁵ ve 10⁶ kob/mL laktik asit bakterisi ekilmiş ve üzerine yumurta akı lizoziminden 20, 30, 40 ve 50 ppm; biyoteknolojik lizozimden 2, 8, 10 ve 20 ppm konsantrasyonlarda inoküle edilmiştir. 37°C'de 48 saat süreyle anaerobik ortamda inkübe edilmiştir. Besiyeri olarak MRS Broth ve MRS Agar kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plate 24 saat inkübasyon sonucunda plate okuyucu spektrofotometre kullanılarak (Thermo

Scientific™ Multiskan™ GO Microplate, USA) 600 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. İçerisinde bakteri bulunmayan kuyucukların absorbans değeri, diğer grupların absorbans değerlerinden çıkarılarak %'de inhibisyon hesaplaması yapılmıştır.

Yoğurt Denemesi

%16 kurumaddeli rekonstitüe süte %3 oranında laktik asit bakterileri ilavesi yapılmış (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*) ve içerisine yumurta akı lizoziminden 50, 100, 150 ve 200 ppm oranında ve biyoteknolojik lizozimden 2-8-10 ve 20 ppm oranında katılmıştır. 42°C'de 3 h süresince asitlik gelişimleri pH olarak ölçülmüştür.

Antifungal Aktivite

Saccharomyces cerevisiae Malt Extract Broth (105397 Merck, Almanya) besiyerinde 3 gün süre ile aktif hale getirilmiştir. 0,5 McF (yaklaşık 10⁸ kob/mL) olacak şekilde dilüsyonu ayarlanmış ve bu dilüsyondan besiyerine ekim yapılmıştır. Yumurta lizoziminden 50, 100, 150 ve 200 ppm konsantrasyonda biyoteknolojik lizozimden ise 2, 8, 10 ve 20 ppm konsantrasyonlarda plate kuyucuklarına aktarılmıştır. Kontrol amaçlı natamisin 10 ppm düzeyinde uygulanmıştır. 37°C'de 48 saatlik inkübasyon sonucu platelerde oluşan bulanıklığa göre Malt Extract Agar besiyerine ekim yapılmış ve yine 37°C'de 48 saatlik inkübasyon sonucu oluşan koloniler değerlendirilmiştir.

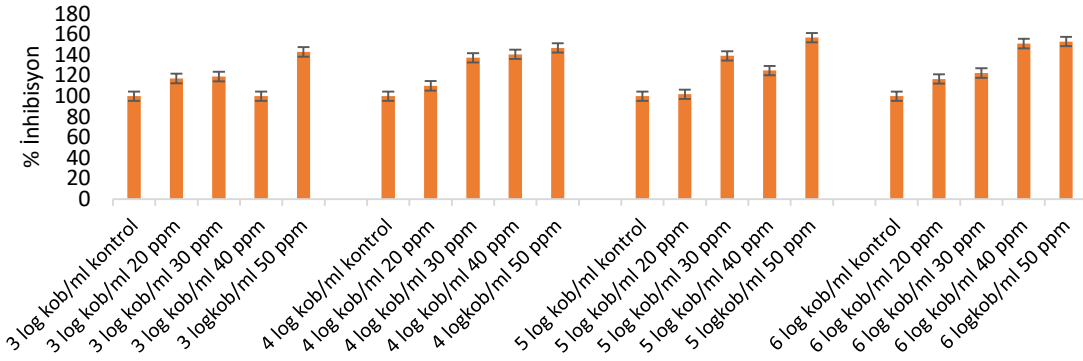
Aspergillus flavus Potato Dextrose Agar (110130 Merck, Almanya) besiyerine bir öze yardımıyla aktarılmış ve hif oluşumu için 32°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan hifler steril ringer çözeltisi içine alınarak 0,5 McF (yaklaşık 10⁸ kob/ml) olacak şekilde dilüsyon ayarlandı. Maya için uygulanan prosedürler aynen uygulanmıştır. 96 kuyucuklu plate içine besiyeri olarak Potato Dextrose Broth kullanılmış ve oluşan koloniler değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Antibakteriyel Aktivite

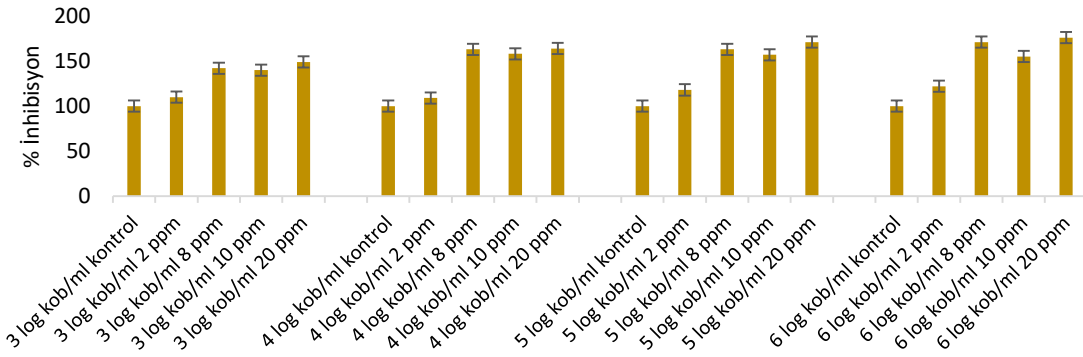
MRS Broth besiyeri bulunan plateler içine laktik asit bakterilerinden 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ kob/ml olacak şekilde ekimi yapılmış ve üzerlerine lizozim enzim preparatları eklenmiş ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen absorbans değerlerinde canlı hücre oranı hesaplanmış ve yumurta lizozimi ile mikrobiyal lizozimin antimikrobiyal aktivitesine ilişkin grafikler Şekil 1 ve 2'de verilmiştir.

Yumurta Akı Lizozimi-24 saat



Şekil 1. Yumurta lizozimin antibakteriyal aktivitesi

Biyoteknolojik Lizozim-24 saat



Şekil 2. Biyoteknolojik lizozimin antibakteriyal aktivitesi

Bakterinin üremesini önleyen, gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük antibakteriyal ajan konsantrasyonu, Minimum inhibitör Konsantrasyonu (MİK) olarak değerlendirilmektedir. Laktik asit bakterileri için yumurta lizoziminde MİK belirlenememiştir. Çünkü uygulanan tüm konsantrasyonlarda üreme görülmüştür. Bu yüzden MRS Agar besiyerine tekrardan bir ekim yapılarak koloniler sayılmamıştır. Fakat yumurta akı lizoziminin daha yüksek

konsantrasyonlarında termofilik laktik asit bakterilerinin gelişiminin nasıl etkilendiğini görmek amacıyla, %16 kurumaddeli rekonstitüe süte % 3 oranında laktik asit bakterileri ilavesi yapılmış ve içerisine yumurta akı lizoziminden 50-100-150 ve 200 ppm; biyoteknolojik lizoziminden de 2-8-10 ve 20 ppm oranında katılmıştır. 42 °C'de 3 h süresince asitlik gelişimleri pH olarak ölçülmüştür. Denemeye ilişkin veriler aşağıdaki Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Yumurta akı ve biyoteknolojik lizozim ilaveli sütlerde pH değişimi, n=2 (0. saat)

Saat	Yumurta Lizozimi			
	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm
1.	6,65±0,01	6,65±0,01	6,65±0,01	6,65±0,01
2.	5,83±0,02	5,77±0,01	5,75±0,02	5,77±0,01
3.	5,27±0,02	5,12±0,02	5,15±0,01	5,21±0,03
3,25.	4,97±0,03	4,99±0,01	5,02±0,01	5,01±0,01
3,50.	4,82±0,01	4,83±0,02	4,83±0,02	4,82±0,02
3,45.	4,70±0,01	4,71±0,01	4,71±0,01	4,73±0,02
4.	4,52±0,02	4,59±0,02	4,61±0,01	4,64±0,01

Çizelge 1 devam. Yumurta akı ve biyoteknolojik lizozim ilaveli sütlerde pH değişimi, n=2 (0. saat)

Saat	Biyoteknolojik Lizozim			
	2 ppm	8 ppm	10 ppm	20 ppm
1.	6,65±0,01	6,65±0,01	6,65±0,01	6,65±0,01
2.	5,96±0,02	5,95±0,01	5,95±0,01	5,94±0,02
3.	5,59±0,01	5,59±0,02	5,60±0,02	5,61±0,01
3,25.	5,09±0,03	5,10±0,03	5,08±0,01	5,13±0,01
3,50.	4,91±0,02	4,93±0,01	4,96±0,01	5,01±0,02
3,45.	4,70±0,02	4,72±0,03	4,76±0,02	4,78±0,01
4.	4,60±0,03	4,65±0,01	4,64±0,02	4,65±0,02

Çizelge 1’de yumurta akı lizoziminin laktik asit bakterisi gelişimini yüksek konsantrasyonlarda bile etkilemediği görülmektedir. 3 saatlik fermentasyon süresince pH değişimi birbirine çok yakın değerler göstermiştir. Aynı durum biyoteknolojik lizozimde de elde edilmiştir. 20 ppm konsantrasyon laktik asit bakterileri gelişimini minimum düzeyde etkilemiş gibi gözükse de 3 saatlik fermentasyon sonucunda inkübasyon bitiş pH sı olan 4,60’a ulaşmıştır.

Lizozimin etki mekanizmasında aslında iki görüş mevcuttur: Bunlardan ilki lizozimin, peptidoglikanların β -1,4 glikozidik bağlantısını hidrolize etmesi diğeri muramidaz aktivitesinin, murein tabakasının parçalanmasıyla bakteri hücre duvarının mekanik gücünün azalması sonucunda bakterilerin ölümüyle sonuçlanmasıdır (Wang ve ark., 2005). Dolayısıyla, Gram negatif bakterilerin dış yüzeyindeki ana bileşen, proteinler ve fosfor ile birlikte koruyucu bir lipopolisakkarit (LPS) tabakası olduğundan, lizozimin bakterisit etkisi bazı Gram pozitif bakterilerle sınırlı kalmıştır (Wu ve ark., 2019). Diğeri ise muramidaz aktivitesinden bağımsızdır, ancak büyük ölçüde yapısal faktörler, katyonik ve hidrofobik özellikler ile alakalıdır. Bu, lizozimin bu tipik Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesinin, muramidaz aktivitesinden bağımsız olduğunun doğrudan genetik kanıtı olarak kabul edilebilir ve antimikrobiyal aktivite, yapısal özelliklere atfedilebilir (Ibrahim ve ark., 2001).

Lizozim 25-30 mg/L oranında, starter kültür aktivitesini etkilemezken, *C. tyrobutyricum*’un peynirde gelişimini önlemektedir. Ayrıca 20-200 mg/L oranlarında ise *L. monocytogenes* gelişimini önlemektedir (Davidson ve ark., 2002).

Değişik gıdalardan izole edilen 14 adet *S. aureus* suşunun gelişme ve biyofilm oluşturmaları üzerindeki etkileri kantitatif mikropilaka yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/ml konsantrasyonlardaki lizozimin, bakteri gelişmesini engelleme yönünde hiçbir etkisinin olmadığı ve tüm suşların lizozime karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir (Sudağdan ve Aydın, 2019).

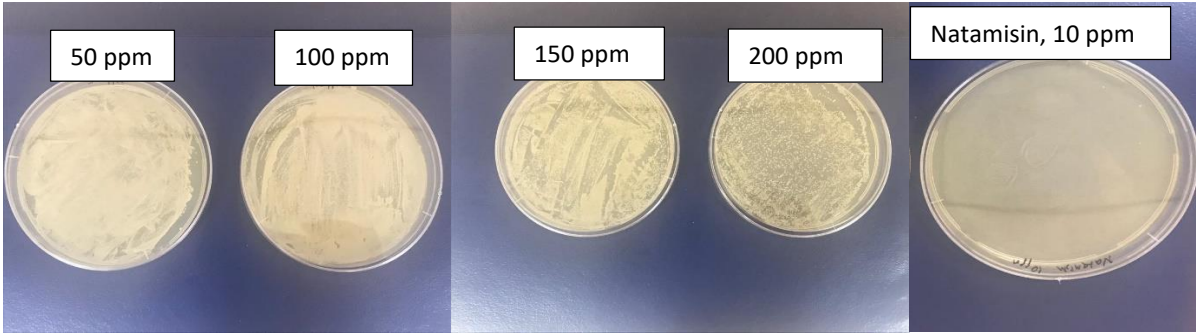
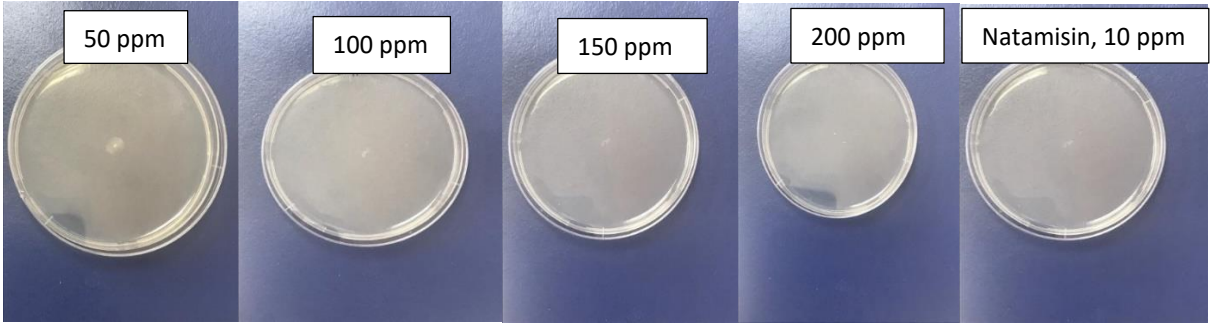
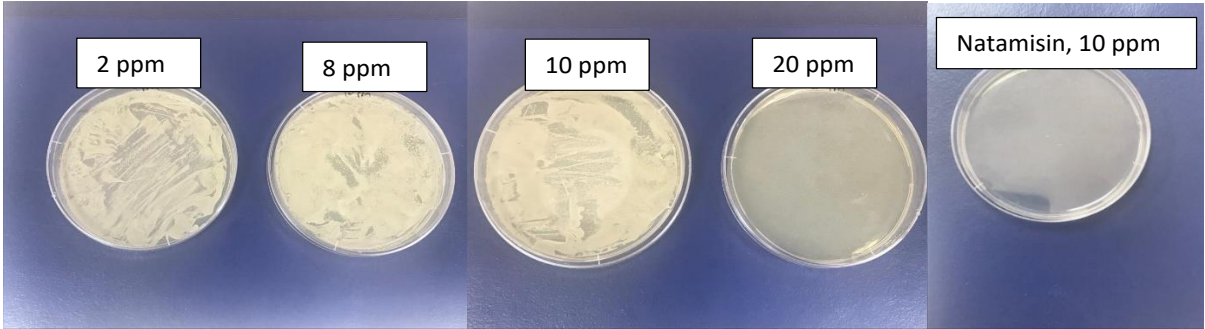
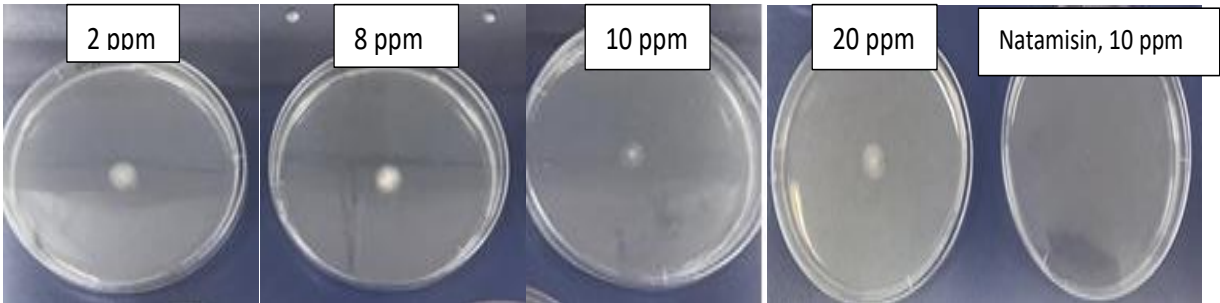
Şaraplardan izole edilen laktik asit bakterileri üzerine lizozimin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, lizozimin laktik asit bakterilerine olan etkisinde tür ve suşun önemli olduğu ve bazı laktobasil suşlarının, 1000 ve 2000 mg/L gibi yüksek konsantrasyonların varlığında hayatta kalarak lizozime karşı oldukça dirençli olduğu bulunmuştur (Dias ve ark., 2015).

İtalyan sert peynirinin starter kültürlerinde lizozime karşı yüksek duyarlılığa sahip birçok suş bulunmuştur, oysa Carini ve ark. (1985) bu peynirlerin üretiminde kullanılan lizozim konsantrasyonlarında birçok laktik asit bakterisinin etkilenmediğini belirtmiştir. Ayrıca, Gouda peyniri üretiminde kullanılan starterin lizozime çok dirençli olduğunu düşünmüştür (Brandle ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin lizozim enzimine karşı dirençli olduğu sonucu bizim bulgularımızla benzerlik göstermiştir.

Antifungal aktivite

Yumurta akından ve biyoteknolojik yolla elde edilen lizozim enzimlerinin *Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus flavus* üzerine olan antifungal özellikleri Şekil 3, 4, 5 ve 6 da görülmektedir.

Yumurta lizoziminin 50, 100, 150 ve 200 ppm konsantrasyonlarında bile maya gelişimi gözlenmiştir. 200 ppm gibi yüksek konsantrasyonlar denenmesine karşın maya üremesi tüm petrilere görülmüştür (Şekil 3). Yumurta lizozimi mayalar üzerinde antifungal aktivite göstermemiştir. Yumurta lizozimi *Aspergillus flavus* üzerine 50 ppm konsantrasyonda antifungal etki göstermiştir. 100-150 ve 200 ppm de ise hiç küf gelişimi görülmemiştir (Şekil 4). Benzer sonuçlar bakteriyolojik lizozimde de elde edilmiştir. Bakteriyolojik lizozime ilişkin görseller aşağıda verilmiştir (Şekil 5 ve Şekil 6). Bakteriyolojik lizozim konsantrasyonlarından 10 ppm e kadar tüm petrilere üreme görülmüş sadece 20 ppm konsantrasyonda antifungal aktivite sergilemiştir (Şekil 6).

Şekil 3. *Saccharomyces cerevisiae* üzerine yumurta lizoziminin antifungal etkisiŞekil 4. *Aspergillus flavus* üzerine yumurta lizoziminin antifungal etkisiŞekil 5. *Saccharomyces cerevisiae* üzerine bakteriyolojik lizozimin antifungal etkisiŞekil 6. *Aspergillus flavus* üzerine bakteriyolojik lizozimin antifungal etkisi

Bakteriyolojik lizozimin küfler üzerine bir miktar antifungal etkisi görsellerde gözükse de 20 ppm in üzerinde çalışılması gerekmektedir (Şekil 6).

Lizozimin, *Candida*, *Sprothrix*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, and *Aspergillus* gibi küflerin de aralarında bulunduğu pek çok küf üzerinde minimum inhibisyon etkisi incelenmiş, sadece

Fusarium graminearum PM162 (1600 µg/ml) ve *A. ochraceus* MM184 (3260 µg/ml) üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Davidson ve ark., 2002).

Üstünkol (2006) lizozimin *A. flavus* ve *A. parasiticus* küflerinin gelişimi üzerinde etkisini araştırdığı çalışmasında 0-500 ve 1500 ppm konsantrasyonda lizozim enzimi kullanımının küfler üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığını bildirmiştir.

Laktoferrin ve lizozimin (20, 40 ve 80 pg/ml) ayrı ve farklı konsantrasyonlarının *C. krusei* ve *C. albicans* küfleri üzerine olan antifungal aktivitesi Samaranayake ve ark. (1997) tarafından araştırıldığı bir çalışmada, her iki *Candida* türünde, laktoferrin ve lizozimin fungisidal etkisinin ayrı ayrı doza bağlı olduğu gözlenmiştir.

Çok düşük lizozim konsantrasyonları (6.25 mg/ml) önemli ölçüde *Candida* biyofilm oluşumunu inhibe ettiği ve 100 mg/ml lizozim, *Candida* hücrelerinin %45'ini öldürmesine rağmen, konsantrasyonunu daha da artırmanın (240 mg/ml'ye kadar) böyle bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. 100

KAYNAKLAR

- Anonim (2009) Fermente Süt Ürünleri Tebliği. Türk Gıda Kodeksi, Tebliğ No: 2009/25, Ankara.
- Anonim (2018) LysochTM G4 fermented lysozyme. Handary%20Bacterial%20Lysozyme.pdf brochure. Belgium.
- Bogovic Matijasic B, Koman Rajsp M, Perko B, Rogelj I (2007) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. International Dairy Journal, 17: 157-166.
- Brandle J, Doming KJ, Kneifel W, (2016) Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. Food Control, 67: 96-113.
- Cankurt H, Sağdıç O (2019) Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Su Ekstraktlarının ve Uçucu Yağlarının Model Gıda Olarak Blok Tip Eritme Peynirinde *Clostridium tyrobutyricum* ve Toplam Maya-Küf Sayıları Üzerine Etkisi. Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi, 21: 46-52.
- Carini S, Mucchetti G, Neviani E (1985) Lysozym: Activity against clostridia and use on cheese production a review. Microbiologie, Aliments Nutrition, 3: 299-320.
- Davidson P. M, Juneja V.K. Branen J.K (2002) Antimicrobial Agents. In Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. and Thorngate III, J.H., ed. Food Additives (Second Edition, Rev,sed and Expanded), Chapter 20, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Dias R, Vilas-Boas E, Campos F M, Hogg T, Couto J A (2015) Activity of lysozyme on *Lactobacillus hilgardii* strains isolated from Port wine. Food Microbiology, 49: 6-11.
- Gürsel A, Şenel E, Yaman Ş, (2004) Yoğurтта maya ve küf gelişimine karşı biyokoruyucu kültür kullanımı. Gıda, 29(4): 283-289.
- Güven M (1998) Antimikrobiyal maddeler ve süt teknolojisinde kullanım olanakları. Gıda, 23(5): 365-369.

mg/ml lizozim ile birlikte nistatin, amfoterisin B ve ketokonazol, ilaçsız kontrollere kıyasla *Candida* biyofilm mikroorganizmalar üzerinde sinerjistik etki göstermiştir. Sonuç olarak lizozimin, inatçı kandidal enfeksiyonlar için gelecekteki tedavi stratejilerinde antifungallere güvenli bir yardımcı olabileceği ifade edilmiştir (Samaranayake ve ark., 2009).

SONUÇ

Yumurta akından ve biyoteknolojik olarak elde edilen lizozim enziminin laktik asit bakterileri, maya ve küf mikroorganizmaları üzerine olan antibakteriyel ve antifungal özelliklerinin araştırıldığı bu çalışmada, her iki lizozim enzim preparatının laktik asit bakterilerine karşı antibakteriyel etkisinin olmadığı ya da çok yüksek konsantrasyonlarda kullanılması gerektiği görülmüştür. Lizozim enzimleri mayalara karşı etkili değil fakat küf oluşumunda antifungal etki göstermiştir. Sonuç olarak laktik asit bakterilerinin starter olarak kullanıldığı ürünlerde, küf gelişimini önlemek amacıyla lizozim enzim preparatları kullanılabilir.

- Ibrahim H R, Matsuzaki T, Aoki, T (2001). Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. FEBS Letters, 506: 27-32.
- Le'snierowski G, Yang T (2021) Lysozyme and Its Modified Forms: A Critical Appraisal of Selected Properties and Potential. Trends in Food Science and Technology, 107: 333-342.
- Lewko L, Krawczyk J, Calik J (2021) Effect of genotype and some shell quality traits on lysozyme content and activity in the albumen of eggs from hens under the biodiversity conservation program. Poultry Science, 100(3), 100863.
- Mine Y, Ma F, Lauriau S (2004) Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52:1088-1094.
- Öztürkcan SA, Acar S (2017) Yaygın Olarak Kullanılan Antimikrobiyal Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Genel Bir Değerlendirme. İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1: 1-17.
- Samaranayake Y H, Samakanayake L P, Wu F C, So M (1997) The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candh albicans*. A PMIS 105: X75-XR3.
- Samaranayake Y.H, Cheung B.P.K, Parahitayawa N, Seneviratne CJ, Yau JYY, Yeung KWS, Samaranayake LP (2009) Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms on denture acrylic surfaces. Archives of Oral Biology 54: 115-126.
- Schneider N, Cord-Michael B, Pischetsrieder M (2010) Analysis of lysozyme in cheese by immunocapture mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 878: 201-206.
- Schneider N, Werkmeister K, Becker CM, Pischetsrieder M (2011) Prevalence and stability of lysozyme in cheese. Food Chemistry, 128:145-151.

- Shimazakia Y, Takahashib A (2018) Antibacterial activity of lysozyme-binding proteins from chicken egg White. *Journal of Microbiological Methods*, 154: 19-24.
- Sudağidan M, Aydın A (2013) Lizozim ve Nisinin Gıda Kaynaklı *Staphylococcus aureus* Suşlarında Gelişim ve Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkileri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 39(2): 254-263.
- Topal Ş (1993) Gıdalarda Küf Kontaminasyonu Riskleri ve Önlemleri. *Gıda Sanayiinde Mikrobiyoloji ve Uygulamaları. TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gıda ve Soğutma Teknolojileri Bölümü*, Yayın No: 124, 174-178.
- Üstümkol N (2006) Farklı Ortam Koşullarında Nisin, Lizozim ve Bazı Bitkisel Kaynakların Küf Gelişiminin Kontrol Altına Alınması Üzerine Etkileri. *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, 101 s.
- Wang S, Ng Tzi Bun, Chen T, Lin D, Wu J, Rao P, Ye X (2005) First report of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327: 820-827.
- Wang S, Ye X, Rao P (2012) Isolation of a novel leguminous lysozyme and study on the antifungal activity. *Food Research International*, 47: 341-347.
- Wasserfall F, Teuber M (1979) Action of egg white lysozyme on *Clostridium tyrobutyricum*. *Applied and environmental microbiology*, 38(2): 197-199.
- Wu T, Jiang Q, Wu D, Hu Y, Chen S, Ding T, Ye X, Liu D, Chen J (2019) What Is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. *Food Chemistry*, 274: 698-709.
- Yaygın H (1989) Peynirlerde Görülen Geç Şişmeye Karşı Lysosym Kullanılması. *Gıda*, 14(6):3 37-341.
- Yılmaz B, Tosun H (2012) Sütte Bulunan Doğal Antimikrobiyal Sistemler ve Bunların Gıda Sanayiinde Kullanımı. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1): 11-20.