

PASTEUR, ANAEROBİK YAŞAM VE FERMENTASYON

Nezahat GÜRLER

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
nezahatg@netone.com.tr

ÖZET

Bir kimyacı olan Louis Pasteur fermentasyon çalışmalarına odaklanarak, fermentasyonun canlılarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Pasteur 1861 yılında anaerobik yaşamı, özellikle butirik asit fermentasyonundan sorumlu olan zorunlu anaerob bakterileri saptamış, daha sonra insan ve hayvan hastalıklarından sorumlu bakteriler üzerine çalışmalarını sürdürmüştür.

1877 yılında, Pasteur ve Joubert ilk kez patojenik anaerob bakterilerden, sonradan adı Clostridium septicum'a döndürülen Vibriion septicque'i izole etmişlerdir.

Anahtar sözcükler: anaerobik yaşam, anaerob bakteriler, fermentasyon, Pasteur

SUMMARY

Pasteur, Anaerobic Life and Fermentation

As a biochemist, Louis Pasteur focused on fermentation, demonstrating that it was a vital process. In 1861, he demonstrated anaerobic life and the strict anaerobes, particularly those responsible for butyric fermentation. Pasteur turned to investigating the role of bacteria in human and animal diseases and described first time a pathogenic anaerobe, Vibriion septicque, now known as Clostridium septicum, with collaboration of Jubert in 1877.

Keywords: anaerobic bacteria, anaerobic life, fermentation, Pasteur

Louis Pasteur, Mikrobiyolojinin özellikle anaerob bakteriyolojinin gelişmesinde çok önemli katkıları olan bir bilim adamıdır^(3,5).

Pasteur'e kadar bilim adamları bilimin sadece teorik kısmı ile ilgilenmiş, uygulamalı bilim ele alınmamıştır. Pasteur teorik ve uygulamalı bilimlerin ayrı bilimler olamayacağını, bilimin teorik ve uygulamalı şekilde bir bütün olduğunu fikrini ileri sürmüştür. Pasteur kristallografi üzerine yapmış olduğu çalışmaları ile Strasburg'da onur ve maddi ödüle layık görülmüştür. Bu ödül nedeniyle kazandığı parayı kendi ihtiyaçları yerine, araştırmalarında kullanmak üzere laboratuvar malzemesi almak için kullanmıştır.

Buna rağmen Pasteur çalışmalarını çok sınırlı koşullarda gerçekleştirmiştir. Bu nedenle 1854 yılında daha 32 yaşında iken kendisine teklif edilen Kimya Bölümündeki görev ile Lille Üniversitesinde yeni kurulan Bilimler Bölümünün Dekanlık görevini kabul etmiştir.

Lille bölgesinde endüstriyel alanlarındaki

bazı konularda eğiticiliğin yanısıra, diğer bilimsel çalışmalara odaklandığı anlaşılmaktadır. Özellikle bu dönemde kimya üzerine yapmış olduğu çalışmalarının dikkat çekici olduğu bildirilmektedir⁽⁵⁾. Pasteur'un bu çalışmaları ve eğitimleri hayatının geri kalanı dönemi için bilimsel bir felsefe kılavuzu geliştirmesine neden olmuştur.

Pasteur Lille'e geldikten bir yıl sonra bölgenin temel endüstrisi olan alkolik fermentasyon sorunlarıyla ilgilenmeğe başlamıştır. Aslında kimyager olan Louis Pasteur'un (1822-1895) mikrobiyoloji ile ilgili ilk çalışmaları şarapların bozulma nedenini araştırması ile başlamıştır. O yıllarda Pasteur şarapların bozulma nedenini incelediğinde, alkolik fermentasyona bazı mikroorganizmaların neden olduğunu ve bazı mikroorganizmaların ise fermentasyonu bozduğunu fark etmiştir. Bu düşünce ile üzüm suyunu 63°C'de yarım saat ısıtılarak şarap yapımını bozan zararlı mikroorganizmaları öldürmüştür. Soğuduktan sonra şarap fermentasyonu yapan

mikroorganizmaları ilave ederek şarap elde etmiş ve ısıtma ile şarapların bozulmasını önlemiştir. Pasteur'un bu çalışmaları "pastörizasyon" esasını oluşturmuştur.

Bu çalışmaların ardından Pasteur bazı mikroorganizmaların oksijen bulunmayan ortamlarda, anaerob koşullarda ürediğini, fermentasyon olayının anaerob bakterilerle yoğun ilişkisini göstermiştir.

Pasteur laboratuvarında içlerinde besiyeri bulunan cam kapların ağızlarını pamukla kapattıktan sonra kaynar suda ısıtmış ve kendi haline bırakılan bu besiyerlerinde soğuduktan sonra da mikroorganizma üremesinin meydana gelmediğini göstermiştir. Pamuğun havayı geçirdiği fakat mikroorganizmaları geçirmedeğini gözlemleyerek steril durumun devamı için cam kapların ağızlarının pamukla kapatılması gerektiğini bildirmiştir^(5,9).

Mikrobiyolojin kurucularından olan Pasteur'un bu buluşları/gözlemleri o yıllarda tüm dünyada ilgi ile izlenmiştir⁽³⁾.

Pasteur tüm hayatı boyunca bira yapımı, şarap yapımı, ipek böceği hastalıkları ve aşı sorunları ile ilgili konularda çok önemli gözlemler/araştırmalar yapmıştır. Özellikle kuduz aşısını geliştirerek insanların kuduzdan korunmasını sağlamıştır.

Pasteur, Lille'e geldikten kısa süre sonra şeker pancarı suyunun fermentasyonu sonucu alkol (etilalkol - etanol) üretimi ile uğraşan Bay Bigo ile tanışmıştır. Bay Bigo pek çok olayda bilinmeyen bir nedenle fermentasyon işlemi sırasında alkolün bazı maddelerle kontamine olduğundan yakındır. Pasteur başlangıçta alkolik fermentasyon sorunlarına çok sıcak bakmasa da inceleme sözü vererek, fabrikaya gidip birkaç kez örnekler alarak, laboratuvarında inceler. Topladığı fermentasyon suyunu mikroskopta inceleyerek, gördüklerinin resmini çizer.

Kendinden önce bu konuyu araştıranlardan farklı olarak Pasteur mikroskopta maya hücrelerinin (kürecik şeklinde organizmalar) yanında mayaya benzemeyen daha küçük yapılar fark etmiştir. Optik olarak aktif bulunan fermente sıvılardan birinin amil-alkol olduğunu bildirmiştir. Pasteur bu gözlemine dayanarak, daha önce ilgilendiği konuları da düşünerek sadece canlı objelerin optik olarak aktif organik

bileşikler yapacağı sonucunu çıkarmıştır. Pasteur amil alkolle ilgili bu çalışmalarından kısa süre sonra, genel inanışın tersine, fermentasyonun kimyasal bir süreç olmadığı, canlı hücrelerle (mayalarla) ilişkili olduğu sonucuna varmıştır ve bu canlılara (yaşayan mayalara) mikrop veya mikroorganizma ismini vermiştir.

Pasteur'un fermentasyonla ilgili 1857'de yayınladığı "Laktik asit fermentasyonu" başlıklı makalesi mikrobiyolojinin bilimsel başlangıcı, daha doğru bir deyişle biyokimya ve biyolojik bilimlerin başlangıcı olmuştur. Pasteur'un laktik asit ve alkolik fermentasyon üzerine çalışmaları mikrobiyoloji biliminin temeli sayılmaktadır⁽⁶⁾. 1861'de Pasteur butirik asit fermentasyonunu keşfetmiş ve bu olayın hareketli, spor oluşturan vibriyolar (mikroorganizmalar) ile ilişkili olduğunu, bu canlıların oksijen bulunmadığında amonyum, fosfat ve şeker içeren basit besiyerlerinde üreyebildiğini saptamıştır. Pasteur oksijensiz ortamda üreyen bu canlılar için "hava olmadan yaşam, hava onları öldürür" tanımlamasını yapmıştır.

Pasteur, ayrıca butirik vibriyonların spor formlarının kuruluğa ve yüksek oksijen basıncına dirençli olduğunu ve daha sonra tekrar vejetatif forma dönebilme yeteneğine sahip olduklarını belirtmiştir. Pasteur, butirik vibriyolardan olan *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum* grubunun basit bir mineralli besiyerinde üreyebildiğini, *C.butyricum* ve *C.acetobutylicum*'un mannitolü fermente ederek butil alkol oluşturduğunu bildirmiştir.

Pasteur ayrıca anaerobik *Vibrio*'ların kalsiyum tartarat ve kalsiyum laktatı fermente edebildiğini gözlemiştir. 1863'de oksijensiz ortamda üreme özelliklerine göre mikroorganizmaları aerob ve anaeroplolar olmak üzere ikiye ayırmıştır.

Pasteur etlerin bozulmadan muhafaza edilmesini araştırmış, bu amaçla sodyum benzoat kullanılabileceğini düşünmüştür. Sodyum benzoat kullanımı Pasteur'un çok önemli çalışmalarındandır. 1879 yılında bir kasabın ricası üzerine, koyunun gövdesine sodyum benzoat uygulamış ve hayvanın kesiminden hemen sonra boyun arterinden sodyum benzoat vermiş, bozulmanın gecikmesini sağlamıştır. Böylece sodyum benzoat, Pasteur tarafından

denenmiş olan, hâlâ günümüzde konservecilikte kullanılan en önemli yiyecek antioksidanlarından biri olmuştur.

Fermentasyon, anaerop koşullarda yani oksidatif-fosforilasyon olamadığı durumlarda, glikoliz yoluyla ATP (adenozin trifosfat) üretimini sağlayan önemli bir biyokimyasal süreç olarak tanımlanabilir⁽²⁾.

Pasteur'ün ilk çalışmalarını yaptığı fermente içkilerin en önemlileri olan bira ve şarap üretiminden kısaca bahsetmek istiyorum. Şarap ve bira gibi içkiler hafif alkollü içkiler olup fermentasyon yoluyla elde edilirler ve bu nedenle bu içkiler fermente içkiler olarak da anılırlar.

Fermente içkilerin damıtılması ve alkol oranlarının yoğunlaştırılması ile yüksek alkollü içkiler elde edilir. Konyak üzümünden veya şaraptan, viski arpa maltından veya şerbetçi otu kullanılmamış biradan, rum şeker kamışı melasından elde edilir. Ayrıca rakı, cin, votka gibi içkiler dinlendirilmeden kullanılan, damıtık, yüksek alkollü içkilerdir.

Fermente içkilerden bira, arpadan elde edilen maltın mayşeleme suretiyle şekerlendirilmesi ve sonra şerbetçiotu ile muamele edilip fermentasyona uğratılmasıyla elde edilen karbondioksitli, besleyici ve hafif alkollü bir içkidir. Bira fermentasyonunda saf bira mayası olan *Saccharomyces cerevisiae* kullanılır.

Şarap ise taze üzüm şirasının alkolik fermentasyonu ile elde edilen bir içkidir. Ayrıca vişne, elma ve benzeri birçok meyveden de şarap yapılabilir.

Şarap yapılacak üzümler özeldir. Yemeklik, kurutmalık veya pekmezlik-pestillik üzüm çeşitlerinden şarap yapılmaz. Şaraplık üzümlerde alkol-asit oranı aranır. Uygun üzüm çeşitleri üzüm değirmenlerinden geçirilerek çekirdekler kırılmadan parçalanır. Beyaz üzümler hemen bekletilmeksizin preslere alınarak sıkılır. Şıra elde edilir. Isıtma ve soğutma işlemleri uygulanır.

Sıcak ve soğukta tortu yapabilecek azotlu bileşikler çöktürülür ve renk değişimine neden olabilen oksidaz ve polifenolaz enzimleri inaktive edilir. Seperatörlerden geçirilerek kısmen berraklaştırılmış şıralar kükürtlenerek fermentasyon başlatılır. Fermentasyon 25°C ısıda, *S. cerevisiae* elipsoides ve *S.cerevisiae* pastörianus

mayaları ile sağlanır.

Fermentasyon 8-10 gün sürerse de, saf maya ve kontrollü fermentasyon ile bu süre 5 güne kadar düşebilir. 8-10 günlük esas fermentasyon veya birincil fermentasyondan sonra aktarma yapılarak taze şaraptan tortu maddeleri ayırt edilir. Yeniden kükürtleme yapılır.

Kırmızı şaraplarda işlemler biraz farklılık göstermektedir. Kırmızı üzümlerde renk maddeleri kabuk kısmında, kabuğun iç kısmında bulunduğundan, değirmenden geçen üzümler preslenmeden önce 3-5 gün (cibre) ön fermentasyona tabi tutulur. Enzimatik faaliyetlerle ve oluşan alkolle renk ve maddeleri çözünerek şıraya geçer⁽¹⁾. Renk maddesinin şıraya geçirilmesi, enzim preparatları veya mayşe denilen değirmenden geçirilmiş üzümlerin 45-55°C'de 1-2 saat ısıtılması ile de sağlanabilir.

Gerek kırmızı, gerekse beyaz şarap üretiminde fermentasyon süresi bittiğinde ve aktarma yapıldıktan sonra kaplar doldurulur, fermentasyon sırasında kaplarda bırakılmış boşluklar tamamlanarak ikinci fermentasyon başlatılır. İkinci fermentasyonda taze şarap içinde kalan şekerler fermentasyona uğrar ve bu şekilde mayalar şekerlerin tamamını tüketmiş olur.

Bu sırada başka olaylar da meydana gelir. Şırada bulunan malik asit, malolaktik fermentasyona uğrayarak laktik aside dönüşür. İkinci fermentasyon 3 ay sürer. Bu sırada malolaktik fermentasyon dinlendirme sırasında hızlanarak sürer. İkinci fermentasyon bitince şaraplar yeniden aktarılır. İkinci aşamada şarapların havalandırılmaması gerekir. Bundan sonra şarapların ağızları tamamen kapatılır ve dinlendirilmeye bırakılır. Dinlendirilme sırasında malolaktik fermentasyonla birlikte aminoasitlerden yüksek moleküllü alkollerin de oluşumu başlar. Dinlenme sırasında meydana gelen yüksek alkollerin bir bölümü yüksek yağ asitleriyle esterler meydana getirir. Eski şarapların tercih edilmesinin en önemli nedeni olan hoş kokulu esterler oluşur. Dinlenme sırasında mahzen sıcaklığı kırmızı şaraplar için 12-14°C, beyaz şaraplar için 8-10°C olmalı, mahzen nemi ise ideal olarak % 70 olmalıdır. Dinlendirme işlemi sonrası elde edilen ürün şişelere doldurulur. Bu sırada hava ile temas olabildiğinden, bulanıklık oluşabilir. Bu aşamada da durultma işlemi ve filtrasyon

yapılmalıdır.

Fermentasyon işlemi ile yapılan diğer gıda ürünleri; turşu, çeşitli peynir tipleri, yoğurt ürünleridir.

Günümüzde atık suların arıtılması, çeşitli atık ürünlerden biogaz üretimi de fermentasyon yoluyla çeşitli anaerop bakteriler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir.

Fermentasyonun endüstriyel amaçlı yaygın kullanımın yanı sıra, tıpta kullanılan bazı kimyasal maddelerle, penisilin, tetrasiklin, oksitetrasiklin, eritromisin, linkomisin, gentamisin, streptomisin ve sefalosporinler gibi antibiyotiklerin üretiminde de fermentasyon en önemli aşamadır^(1,8).

Pasteur'ün temellerini attığı anaerop bakteriyolojinin önemli bir bölümünde insan sağlığı ile ilgili anaerop bakteriler yer almaktadır.

Anaerop bakteriler insan vücut florasının en yaygın üyeleridir. Sporlu olan *Clostridium* cinsi bakteriler ise insan, hayvan vücudunun endojen florasında bulunmalarının yanı sıra, sporları doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Anaerop bakteriler gastrointestinal sistem, genital sistem ve solunum yollarının florasında sayısal olarak aerop bakterilerden daha fazla bulunurlar. Ancak insanda hastalık oluşturmaları için travma, anaerop bakterilerin fazla bulunduğu doku ve organlara cerrahi girişim uygulanması, malignite, diyabet gibi bazı özel durumların bulunması gerekir.

Anaerop bakterilerden sporlu olan *Clostridium* cinsi bakteriler Pasteur tarafından 1861 yılında izole edilmesine rağmen özellikle sporsuz olanların izolasyonu, tanımlanmaları yıllar sonra mümkün olmuştur.

Mikrobiyoloji alanındaki gelişmelerle özellikle moleküler yöntemlerle, bir çok anaerop bakterinin tanısı mümkün olmuştur. Günümüzde klinikte en önemli anaerop bakteriler *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. ve diğer anaerop koklar ile *Clostridium* cinsinde bulunan bazı türlerdir. Klinik önemi olan anaerop bakterilerden *Bacteroides fragilis*'in ayrı bir yeri vardır. *B. fragilis* başta beta-laktam antibiyotikler olmak üzere birçok antibiyotiğe dirençli olması nedeniyle klinikte sorun oluşturan bir bakteridir. Yine son zamanlarda giderek önemi

artan, gastrointersinal sistem kaynaklı hastane infeksiyonu etkenleri arasında 1-2. sıralarda yer alan, antibiyotikle ilişkili diyare ve psödomembranöz kolitten sorumlu tutulan, antimikrobik maddelere çoğul dirençli olan *Clostridium difficile* de zorunlu anaerop bakteriler arasında yer almaktadır.

Sayın Hocam Prof Dr Enver Tali Çetin günümüzde bile hâlâ sorunları bitmemiş olan anaerop bakterilerle ilgili birçok çalışmalar yapmış, bu konuda bir kitabın hazırlanmasını sağlamıştır.

Hocamız, tıbbi önemi olan anaerop bakterilerin dışında Kültür Koleksiyonları ve Endüstriyel Mikrobiyoloji (KÜKEM) Derneğinin başkanlığını yaptığı yıllarda anaerop bakterilerin endüstriyel önemini vurgulamak amacıyla, endüstriyle birlikte çeşitli toplantılar yapmış, endüstrinin özellikle fermentasyon ve anaerop bakteriler konusunda dikkatini çekmiştir. Hocamızın endüstriyel mikrobiyoloji konularını detaylı bir şekilde kapsayan "Endüstriyel Mikrobiyoloji" adında bir kitabının bulunması bu konulara duyduğu ilginin en güzel göstergesi olarak kabul edilebilir⁽⁴⁾.

KAYNAKLAR

1. Aktan N. Alkollü içkiler üretimi, "Çetin ET (ed). Endüstriyel Mikrobiyoloji" kitabında s.322-9, İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı-Bayda Yayını No.2, İstanbul (1983).
2. Caldwell DR. Microbial Physiology - Metabolism, Chapter 8, s.117-42, C.Brown Publishers, Oxford (1995).
3. Çetin ET. Genel ve Pratik Mikrobiyoloji, Sermet Matbaası, İstanbul (1973).
4. Çetin ET (ed). Endüstriyel Mikrobiyoloji, İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı-Bayda Yayını No.2, İstanbul (1983).
5. Dubos R. Pasteur and Modern Science, American Society for Microbiology, Washington DC (1998).
6. Gürler N. Anaerop infeksiyonlar ve laboratuvar tanısı, "Ulusoy S, Leblebicioğlu H (eds). Anaerop Bakteri İnfeksiyonları" kitabında, s.9-34, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara (2005).
7. Gürler N. Anaerop bakterilerin tanısında zorluklar ve klinikte sorun oluşturan anaerop bakteriler, XXXIV.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı s.167-9, Girne - Kıbrıs (2010).
8. Nester EW, Anderson DG, Roberts EC, Pearsall NN, Nester MT. Microbiology. A Human Perspective, 4.baskı, s.801-17, McGraw Hill, Boston-Toronto (2004).
9. Sebald M, Hauser D. Pasteur, oxygen and the anaerobes revisited, *Anaerobe* 1995;1(1):11-6.

Genel Oturum 1 sunuları

İNFEKSİYON KONTROL PROGRAMLARI: KALİTE İYİLEŞTİRME VE HASTA GÜVENLİĞİ SORUNU

Yöneten: **H.Erdal AKALIN**

- İnfeksiyon kontrol: Bir kalite iyileştirme ve hasta güvenliği programı
H.Erdal AKALIN
- Türkiye’de enfeksiyon kontrolü ile ilgili son gelişmeler
Recep ÖZTÜK
- İnfeksiyon kontrol ve hasta güvenliği konusunda yapılanlara örnekler
Yeşim ÇETİNKAYA ŞARDAN