SİDAS MEDYA
Akademik Gıda® / Academic Food Journal
ISSN Print: 1304-7582, Online: 2146-9377
*http://www.academicfoodjournal.com*

Akademik Gıda 11(3-4) (2013) 63-69

**Derleme Makale / Review Paper**

# Probiyotik Bakterilerin Yüksek Sıcaklık Stresine Karşı Adaptasyon Mekanizmaları

Firuze Ergin, Emine Mine Çomak Göçer, Ayşe Aşcı Arslan, Selda Yalçın, Ahmet Küçükçetin ✉

Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

*Geliş Tarihi (Received): 08.08.2013, Kabul Tarihi (Accepted): 10.11.2013*
✉ *Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): kucukcetin@akdeniz.edu.tr (A. Küçükçetin)*
0 242 310 65 69 0 242 227 45 64

## ÖZET

Probiyotik ürünlerden beklenen yararların sağlanabilmesi için üründe raf ömrü sonuna kadar belirli sayıda canlı probiyotik bakteri bulunması gerekmektedir. Bu nedenle probiyotik ürünlerin üretiminde kullanılacak probiyotik bakterilerin canlılığının yüksek düzeyde olması gerekmektedir. Gıda endüstrisinde kullanılan probiyotik bakteriler genellikle sıvı, toz ve dondurulmuş formda bulunmaktadır. Toz formun üretiminde kullanılan yöntemlerden biri de termal kurutmadır. Termal kurutma yöntemi, fermente süt ürünlerinin kurutulmasında ve probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonda da kullanılmaktadır. Ancak, termal kurutmada bakteriler yüksek sıcaklık stresi, ozmotik basınç stresi, oksidatif stres gibi farklı stres koşullarına maruz kalmaktadır. Probiyotik bakterileri yüksek sıcaklık stresinden korumak için geliştirilen yöntemlerden biri söz konusu bakterilerin stres faktörüne adaptasyonunun sağlanmasıdır. Probiyotik bakteriler yüksek sıcaklık stresine karşı hücrelerinde meydana gelen protein ve proteaz sentezindeki değişim ile adapte olabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Probiyotik bakteri, Yüksek sıcaklık stresi, Adaptasyon

## Adaptation Mechanisms of Probiotic Bacteria to High Temperature Stress

## ABSTRACT

To provide the expected benefits of probiotic products, it is necessary that probiotic bacteria maintain the adequate number of viable cells during the shelf life in the product. Therefore, probiotic bacteria to be used in the manufacturing of probiotic products must have a high level of viability. A probiotic bacterium used in the food industry has been usually in liquid, powder or frozen form. Thermal drying is a manufacture method of powder form, and it also uses drying of the fermented milk products and microencapsulation of probiotic bacteria. However, probiotic bacteria may be exposed to different stress conditions like high temperature, osmotic stress, oxidative stress etc. during thermal drying. Adaptation of probiotic bacteria to stress factors has been developed to protect probiotic bacteria against high temperature stress. Adaptation of probiotic bacteria to high temperature stress takes place with chancing protein and protease synthesis in their cell.

**Key Words:** Probiotic bacteria, High temperature stress, Adaptation

## GİRİŞ

İnsan sağlığı ile tüketilen gıdalar arasındaki yakın ilişki, sağlıklı beslenmeye yönelik araştırmaların giderek artmasına imkân sağlamıştır. Günümüzde tüketiciler, sağlıklı ve dengeli beslenme kavramına uygun gıdaları tercih etmektedirler [1, 2]. Fonksiyonel gıdalar, en basit şekilde temel beslenmenin yanında sağlığa yararları olan gıdalar olarak tanımlanmaktadır [3]. Başta fermente süt ürünleri olmak üzere fermente et ürünlerinde, bebek

mamalarında ve geliştirilme aşamasında olan birçok gıdanın üretilmesinde probiyotik bakteriler kullanılarak fonksiyonel gıdalar geliştirilmektedir [4].

Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliği'ne göre probiyotik bakteri; besinlerle alınan ve belirli miktarda alındığında bağırsak florasını dengeleyip konakçının sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı bakterileri, probiyotik gıda ise içerisinde raf ömrü sonuna kadar yeterli miktarda canlı probiyotik bakteri bulunduran ve bu canlılığı muhafaza eden ürünü ifade etmektedir [5, 6]. Probiyotik ürünlerden beklenen yararların sağlanabilmesi, içerdikleri probiyotik bakterilerin canlılıklarını korumasına ve bağırsak hücrelerine tutunarak kolonize olmasına bağlıdır [7]. Probiyotik bakteri içeren gıdaların işlenmesi ve tüketimi sonrası sindirimi süresince canlı kalabilmeleri; gıdanın üretiminde kullanılan bakterinin hazırlanış koşulları, bakteri suşu ve söz konusu probiyotik bakterilerin canlı olarak bağırsağa taşınmasını sağlayan gıda matriksinin seçimi gibi çok sayıda faktöre bağlıdır [8].

Gıda endüstrisinde kullanılan probiyotik bakteriler piyasada genellikle sıvı, toz veya dondurulmuş formda bulunmaktadır [9]. Toz formun taşıma ile depolama kolaylığı nedeniyle maliyeti sıvı ve dondurulmuş formlara göre daha düşüktür [10]. Toz formun üretiminde termal ve dondurarak kurutma yöntemleri kullanılmaktadır. Toz formun üretiminde kullanılan termal kurutma yöntemleri dondurarak kurutma yöntemlerine göre daha yüksek verime ve daha düşük maliyete sahip olduğundan dolayı tercih edilmektedir [7]. Termal kurutma toz formun üretiminin yanı sıra son zamanlarda yoğurt ve kefir gibi fermente süt ürünlerin kurutulmasında ve bakterilerin mikroenkapsülasyonunda da kullanılmaktadır. Probiyotik bakterilerin ve probiyotik bakteri içeren fermente süt ürünlerinin termal kurutma yöntemiyle toz formlarının üretiminde ve mikroenkapsülasyonunda hem uygun bir taşıyıcı matrisin belirlenmesi hem de kurutma esnasında çalışılacak sıcaklık aralığına dikkat edilmesi oldukça önemlidir [11]. Termal kurutma işlemi sırasında probiyotik bakteriler yüksek sıcaklık stresi, ozmotik stres, oksidatif stres gibi farklı stres koşullarına maruz kalmaktadır [12, 13]. Söz konusu stres koşullarının olumsuz etkilerini azaltmak için kurutma ortamına farklı koruyucuların (prebiyotikler, şekerler, gamlar vs.) ilave edilmesi, stres koşullarına karşı adaptasyonunun sağlanması gibi yöntemler uygulanmaktadır [14, 15].

Yapılan bir çalışmada *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633, *Bifidobacterium infantis* CCRC 14661, *Bifidobacterium longum* B6, *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 ve *Bifidobacterium longum* CCRC 14633 bakterileri %10 (w/w) jelatin, arabik gam ve çözünebilir nişasta içeren taşıyıcı ortam içinde çıkış sıcaklığı 50°C olan püskürterek kurutucuda kurutulmuş ve kurutma sonrası canlı kalma oranları karşılaştırılmıştır. Ayrıca *B. longum* B6 ve *B. infantis* CCRC 14633 bakterileri %10 (w/w) yağsız süt tozu, jelatin, arabik gam ve çözünebilir nişasta içeren taşıyıcı ortam içinde çıkış sıcaklığı 50, 55 ve 60°C olan püskürterek kurutucuda kurutulmuş ve kurutma sonrası canlı kalma oranları karşılaştırılmıştır. %0.05 oranında sistein içeren MRS sıvı besiyeri içinde 37°C'de durma evresine kadar geliştirilen bakteriler, belirtilen taşıyıcı ortamlara miktarı $10^{10}$-$10^{11}$ kob/g olacak şekilde ilave edilmiş ve püskürterek kurutucuda kurutulmuştur. *B. infantis* suşlarının arabik gamın taşıyıcı olarak kullanıldığı ortamda, *B. longum* suşlarının ise jelatinin taşıyıcı olarak kullanıldığı ortamda daha fazla canlı kalma oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Yağsız süt tozunun taşıyıcı olarak kullanıldığı ortamda *B. longum* B6 ve *B. infantis* CCRC 14633 bakterilerinin en yüksek canlı kalma oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Çıkış sıcaklığının 50°C olduğu ve yağsız süt tozunun taşıyıcı ortam olarak kullanıldığı koşullarda *B. longum* B6 ve *B. infantis* CCRC 14633'ün canlı kalma oranlarının sırasıyla %82.6 ve %16.0 olduğu belirlenmiştir. Çıkış sıcaklığı 60°C'ye çıkarıldığında ise *B. longum* B6'nın canlı kalma oranının %63.2'ye düştüğü saptanırken, *B. infantis* CCRC 14633'ün canlı kalma oranının %1.6'ya düştüğü tespit edilmiştir [12].

Desmond ve ark. [15] yaptıkları çalışmada *Lactobacillus paracasei* NFBC 338'in yüksek sıcaklık stresine adaptasyonunun püskürterek kurutucuda gerçekleşen kurutma işleminden sonraki canlı kalma düzeyine etkisini incelemişlerdir. *L. paracasei* NFBC 338'i %20 kurumaddeli rekonstitüye süt içerisinde 37°C'de çoğalma evresine kadar geliştirdikten sonra yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyon amacıyla 52°C'de 15 dakika tutmuşlar ve çıkış sıcaklığının 95-100°C ve 100-105°C arasında olduğu püskürterek kurutucuda kurutmuşlardır. Çıkış sıcaklığının 95-100°C olduğu koşullarda yüksek sıcaklık stresine karşı adapte edilmeyen *L. paracasei* NFBC 338'in canlı kalma oranının %4.3 olduğu saptanırken, yüksek sıcaklık stresine karşı adapte edilen *L. paracasei* NFBC 338'in canlı kalma oranının %24.0 olduğu tespit edilmiştir. Püskürterek kurutucunun çıkış sıcaklığı 100-105°C'ye çıkarıldığında ise yüksek sıcaklığa adapte edilen *L. paracasei* NFBC 338'in canlı kalma oranının adapte edilmeyen *L. paracasei* NFBC 338'e göre 18 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Kurutma işlemi sırasında maruz kaldıkları sıcaklık derecelerinin çok yüksek olmasından dolayı probiyotik bakteriler, canlılıklarını yitirebildikleri gibi adaptasyon mekanizmalarını aktif hale getirerek canlılıklarını devam da ettirebilmektedir [16, 17]. Probiyotik bakterinin karşılaştığı herhangi bir strese adaptasyon sağlayabilmesi için ölüm eşiği altındaki (sublethal) stres koşullarına maruz kalması ve söz konusu strese yanıt vermesi gerekmektedir [18, 19]. Probiyotik bakteriler yüksek sıcaklık stresine karşı proteaz ve sıcaklık şok proteinlerinin sentezlenmesini arttırarak yanıt vermektedir [20].

## YÜKSEK SICAKLIK STRESİNE KARŞI ADAPTASYON MEKANİZMALARI

Yüksek sıcaklık stresi, hücrenin mikrobiyal aktivitesini ve gelişmesini sağlayan birçok bölgesini olumsuz şekilde etkilemektedir. Yüksek sıcaklık stresine maruz kalan bakterilerde kolay hasar görebilen yağ asitlerini bulunduran hücre zarı zarar görmektedir. Hücre zarının zarar görmesiyle birlikte hücrenin genetik materyali olumsuz etkilenmekte ve proteinler denatüre olarak kümeleşmektedir [21, 22]. Denatürasyon sırasında

proteinlerin konformasyonel yapısını oluşturan bazı bağlar parçalanmakta ve böylece protein katlanmış şeklini koruyamayarak düz şekil almaya başlamaktadır [23].

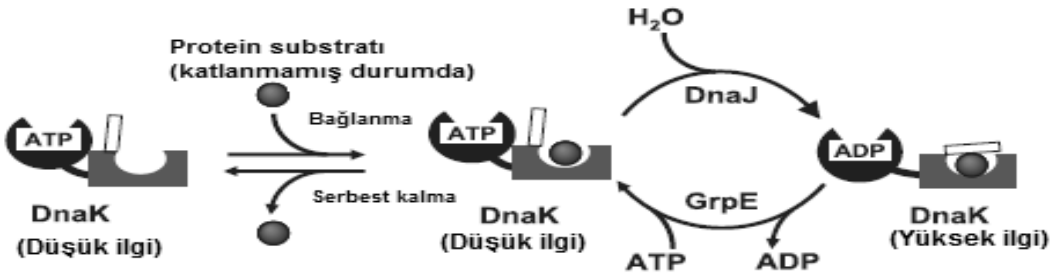
Probiyotik bakteriler hücredeki proteinlerin korunmasını, yeni sentezlenen proteinlerin katlanmasını, katlanmamış ya da kısmen katlanmış proteinlerin katlanmasını ve elverişsiz koşullar altında düzeltilemeyecek kadar hasar görmüş proteinlerin hücreden atılmasını sağlayan mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmalardan birini oluşturan moleküler şaperonlar; translasyon (protein oluşum basamağı) sırasında ve sonrasında yeni sentezlenen proteinlerin katlanması, sıcaklık stresi süresince protein kümeleşmesinin önlenmesi ve yüksek sıcaklık stresi sonucunda hasar gören ya da katlanmayan proteinlerin onarımı gibi birçok işleve sahiptir [24, 25]. Şaperonlar, stres koşullarının olmadığı durumlarda sentezlenseler de çoğunlukla hatalı katlanmış hücresel proteinlerin artmasına neden olan yüksek sıcaklık stresine ve diğer stres koşullarına bağlı olarak sentezlenmektedir. Bundan dolayı birçok şaperon, sıcaklık şok proteinleri (HSPs) ya da strese duyarlı protein olarak adlandırılmaktadır [26, 27].

HSPs, gram negatif ve gram pozitif bakterilerde yüksek sıcaklık stresi süresince farklı sistemlerin kontrol ettiği genler tarafından düzenlenmektedir. Yapılan fizyolojik çalışmalarda, laktik asit bakterilerinde bulunan sıcaklık şok proteinlerinin gram pozitif bakterilerde bulunan sıcaklık şok proteinleri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir [28]. HSPs, gram pozitif bakterilere model olarak gösterilen *Bacillus subtilis*'te düzenlenme şekillerine göre dört genel sınıfta tanımlanmaktadır [29]. Buna göre, I. sınıf genler GroE ve DnaK operonlarını (tek bir operatör tarafından kontrol edilen gen grubu) içermekte ve HrcA baskılayıcı proteininin CIRCE olarak adlandırılan operatör bölgesine bağlanması ile kontrol edilmektedir. DnaK operonu I. sınıf sıcaklık şok genlerinin ilk gen ürünüdür. II. sınıf genler, *B. subtilis*'te bulunan sigma B faktörünün kontrolü altındaki genleri içermektedir. Bu genlerin sentezi ve aktivitesi stres koşulları altında artmaktadır. III. sınıf genler, CIRCE operatör bölgesinden ve sigma B faktöründen bağımsız olarak tanımlanmaktadır. Bu sınıfın üyeleri clpC, clpE, ve clpP operonlarıdır. III. sınıf genlerin transkripsiyonu (DNA'dan RNA'ya genetik bilginin aktarımı) CtsR olarak adlandırılan baskılayıcı protein tarafından düzenlenmektedir. IV. sınıf genler; HrcA, sigma B, CtsR ve diğer tanımlanmış düzenleme mekanizmalarından bağımsız olarak sentezlenmektedir. Söz konusu sınıfa ait stres genlerine ftsH, lonA ve htpG örnek verilmektedir [30, 31]. Probiyotik bakteriler DnaK-DnaJ-GrpE ve GroES-GroEL şaperonları tarafından oluşturulmuş iki kompleks şaperon sistemine, HSPs'den daha küçük molekül ağırlıklarına sahip küçük sıcaklık şok proteinlerine (sHSPs) ve şaperonlar tarafından düzeltilemeyen zarar görmüş proteinlerin parçalanarak hücre dışına atılmasını sağlayan protezlara sahiptir.

## DnaK-DnaJ-GrpE Şaperon Sistemi

DnaK şaperonu, 44 kDa molekül ağırlığına sahip $NH_2$ terminal ATPaz bölgesi ve 25 kDa molekül ağırlığına sahip COOH terminal bölgesi ile her iki bölgenin ortasında bulunan 15 kDa molekül ağırlığına sahip iyi korunmuş substrat bağlanma bölgesinden oluşmaktadır [32]. DnaK şaperonunun stres koşulları altında doğal konformasyonel yapısı bozulmuş proteinleri düzenlemedeki rolleri; protein kümeleşmesinin önlenmesini, proteinlerin doğal katlanma şekillerinin tanınmasını ve kümeleşmiş proteinleri çözerek tekrar doğal konformasyonel yapılarına katlanmasını sağlamaktır [33].

*In vitro* analizler DnaK'nın şaperon aktivitesini gösterebilmesi için ATP'ye ihtiyaç duyduğunu (Şekil 1) ve bu aktivitenin DnaJ ile GrpE tarafından düzenlendiğini ortaya koymuştur [34, 35].




Şekil 1. DnaK-DnaJ-GrpE çalışma mekanizması [24]

*Lactobacillus plantarum* LP-Onlly'nin yüksek sıcaklık stresine yanıtının araştırıldığı bir çalışmada, 37°C'de çoğalma evresinin ortasına ($OD_{620}$=0.55) ve durma evresine ($OD_{620}$=1.95) kadar geliştirilen *L. plantarum* LP-Onlly sıcaklık stresine karşı adaptasyonun sağlanması amacıyla 45°C'de 30 dakika MRS-Thio sıvı besiyeri içinde tutulduktan sonra söz konusu bakteri 55°C'de 15 dakika yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılmıştır. Çalışmada 37°C'de çoğalma evresinin ortasına ve durma evresine kadar geliştirildikten sonra sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmış ve sağlanmamış bakterilerin yüksek sıcaklık stresine maruz kaldıktan sonraki canlılık düzeyleri karşılaştırılmıştır. Çoğalma evresinin ortasına kadar geliştirildikten sonra 45°C'de sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmış bakterilerin canlı kalma düzeyinin sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmamış bakterilere göre 1.6 log daha yüksek olduğu saptanmıştır. Durma evresine kadar geliştirildikten sonra 45°C'de sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmış bakterilerin canlı kalma

düzeyinin ise sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmamış bakterilere göre 1.0 log daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çoğalma ve durma evrelerinde sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmış *L. plantarum* LP-Onlly'de yapılan RT-PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) analizi sonucunda DnaK ve DnaJ sentez düzeyinin çoğalma evresinde durma evresine göre yaklaşık 2 kat, GrpE'nin 3.5 kat, GroES'in 1.5 kat fazla olduğu tespit edilirken GroEL'in sentez düzeyinin ise her iki evrede de aynı olduğu belirlenmiştir [36].

Yüksek sıcaklık stresinin *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RD 546'nın canlılığına ve protein sentez düzeyine olan etkisinin incelendiği bir çalışmada, söz konusu bakteriye 65°C'de 50 dakika yüksek sıcaklık stresi uygulanmıştır. Çalışmada yüksek sıcaklık uygulamasının 10. dakikasında *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RD 546 sayısının başlangıca göre yaklaşık 7 log düşüş gösterdiği, 10 ile 20. dakikalar arasında ise *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RD 546'nın yüksek sıcaklık stresine adaptasyon sağlayarak sayısının yaklaşık 3 log arttığı belirlenmiştir. 20 ile 50. dakikalar arasında ise *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RD 546 sayısının tekrar düşüş gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca 10 ile 20. dakikalar arasında *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RD 546 sayısındaki artışa paralel olarak DnaK ve GroEL şaperonlarının sentezinde artış olduğu tespit edilmiştir [37].

## GroES-GroEL Şaperon Sistemi

GroES-GroEL şaperon sistemi, yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmasında ve maruz kalınan sıcaklık stresi süresince denatüre olarak yapıları bozulmuş proteinlerin tekrar katlanmasında önemli rol oynamaktadır. Bu sistem HrcA baskılayıcı proteininin CIRCE olarak adlandırılan operatör bölgesine bağlanması ile kontrol edilmektedir [8]. GroEL şaperonu GroES ile birlikte ATP varlığında düzenlenen katlanma işlevini yerine getirmektedir. GroEL şaperonu, iki iç oyuktan oluşan ve her oyukta yedi alt birim bulunduran varile benzer tetradekamerik bir yapıdan oluşmaktadır [38]. Şekil 2'de görüldüğü üzere yapısı bozulmuş protein ATP kullanarak GroEL şaperonunun oyuğuna tutunmaktadır. Daha sonra GroES şaperonu bu oyuğun üstünü kubbe şeklinde kaplamakta ve böylece korumalı bir ortamda proteinler doğal konformasyonel yapılarına katlanmaktadır [39,40]. Eğer ortamda yeterli miktarda ATP bulunmaz ise GroEL şaperonuna bağlı protein katlanamamaktadır [41].

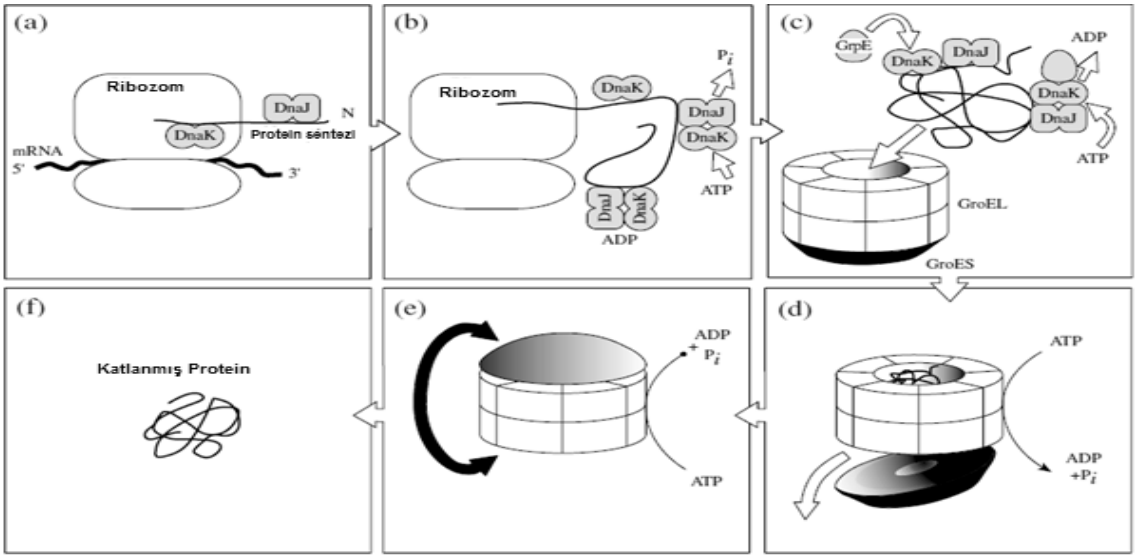
*Lactobacillus rhamnosus* HN001'in yüksek sıcaklık stresine adaptasyonunun akışkan yataklı kurutucuda gerçekleşen kurutma işleminden sonraki canlı kalma düzeyine etkisinin incelendiği bir çalışmada, 37°C'de çoğalma evresinin ortasına ($OD_{610}$=0.7) ve durma evresine ($OD_{610}$=1.6) kadar geliştirilen *L. rhamnosus* HN001'e MRS sıvı besiyeri içinde 50°C'de 30 dakika yüksek sıcaklığa karşı adaptasyon işlemi uygulanmıştır. Yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmış ve sağlanmamış *L. rhamnosus* HN001, 0.1 M fosfat tamponu içeresine aktarıldıktan sonra akışkan yataklı kurutucuda kurutulmuş ve 30°C'de 14 hafta süresince depolanmıştır. Depolama süresinin sonunda durma evresinde yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmış *L. rhamnosus* HN001'in canlılık düzeyinde 1.6 log, çoğalma evresinin ortasında yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmış *L. rhamnosus* HN001'in canlılık düzeyinde 4.2 log azalma görülürken, çoğalma evresinin ortasında yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmamış kontrol örneğinde ise 7.3 log birimlik azalma saptanmıştır. Ayrıca çalışmada, yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmış çoğalma evresinin ortasındaki ve durma evresindeki *L. rhamnosus* HN001 ile aynı evrelerdeki yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmamış *L. rhamnosus* HN001'in protein sentez düzeyleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. *L. rhamnosus* HN001 çoğalma evresinden durma evresine geçtiğinde GroEL'in sentez düzeyinin 10 kat arttığı saptanmıştır. Durma evresinde yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmış *L. rhamnosus* HN001'de GroEL sentez düzeyi aynı evrede yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmamış *L. rhamnosus* HN001'e göre 1.5 kat artış gösterirken, çoğalma evresinin ortasında yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmış *L. rhamnosus* HN001'de GroEL sentez düzeyi aynı evrede yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmamış *L. rhamnosus* HN001'e göre 15 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir [42].

Desmond ve ark. [43] yapmış oldukları çalışmada yüksek sıcaklık adaptasyonu süresince *L. paracasei* NFBC338'de sentezlenen proteinlerin tespitini ve yüksek sıcaklığa karşı adaptasyonu sağlanmış *L. paracasei* NFBC338'in yüksek sıcaklık stresi sonucunda canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Çoğalma evresindeki *L. paracasei* NFBC338'in MRS sıvı besiyeri içinde 52°C'de 15 dakika yüksek sıcaklığa karşı adaptasyonu sağlandıktan sonra söz konusu bakteriye 60°C'de 30 dakika yüksek sıcaklık stresi uygulanmıştır. Yüksek sıcaklık adaptasyonu süresince *L. paracasei* NFBC338'de 12 proteinin sentezinde artış olduğu tespit edilmekle birlikte en fazla artışın GroEL şaperonunun sentezinde olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmamış *L. paracasei* NFBC338'in canlılığının yüksek sıcaklık stresi sonunda başlangıç düzeyine göre 2 log kob/ml azalış gösterdiği tespit edilirken, yüksek sıcaklığa karşı adaptasyonu sağlanmış *L. paracasei* NFBC338'in canlılığının yüksek sıcaklık stresi sonunda başlangıç düzeyine göre 0.5 log kob/ml azalış gösterdiği saptanmıştır.

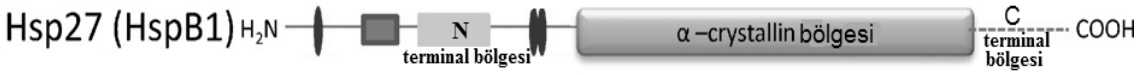
## Küçük Sıcaklık Şok Proteinleri (sHSPs)

Küçük sıcaklık şok proteinleri; stres koşulları altında diğer şaperon sistemleriyle beraber proteinin doğru katlanmasını sağlayan, ATP'den bağımsız olarak faaliyet gösteren ve 12-43 kDa molekül ağırlığında olan şaperon benzeri bir protein grubudur. Bu protein grubu, hücrede stresten etkilenmiş proteinleri kendisine bağlayarak ilgili şaperon gruplarına ulaştırmaktadır [44]. sHSPs, N terminal bölgesi ile C terminal bölgesi arasında bulunan değişik dizilim ve uzunluklarda olabilen çok iyi korunmuş α-kristallin ile karakterize edilmektedir (Şekil 3). Küçük sıcaklık şok proteinleri

bakteri türlerine göre oldukça farklılık göstermektedir [45, 46].




Şekil 2. GroES-GroEL çalışma mekanizması [41]



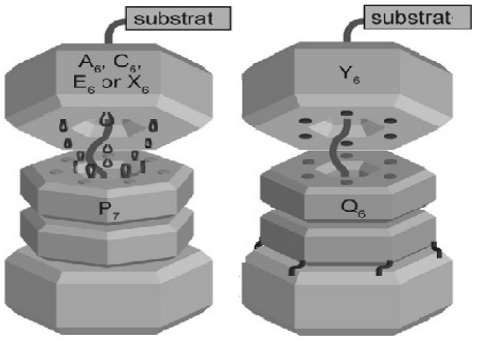

Şekil 3. Hsp27 (hspB1)'nin yapısal bölgeleri [47]

Yüksek sıcaklık stresinin *L. acidophillus* NCFM'deki sHSP 16 geninin transkripsiyonu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, çoğalma evresinin ortasına ($OD_{600}$=0.6) kadar geliştirilen *L. acidophillus* NCFM'ye MRS sıvı besiyerinde 45°C ve 53°C'lerde 5 ve 15 dakika yüksek sıcaklık stresi uygulanmıştır. Yapılan RT-PCR analizi ile yüksek sıcaklık stresi uygulanan *L. acidophillus* NCFM'de 16.16 kDa ağırlığına sahip küçük sıcaklık şok proteini (sHSP16) tespit edilmiştir. 45°C ve 53°C'lerde 5 dakikalık yüksek sıcaklık uygulamasında sHSP16 trankripsiyonunun belirgin bir şekilde etkilendiği belirlenmiştir. 45°C ve 53°C'de 15 dakikalık yüksek sıcaklık uygulamasından sonra sHSP16 sentezinin yüksek sıcaklık stresi uygulanmayan *L. acidophillus* NCFM'ye göre sırasıyla 7 ve 18 kat arttığı tespit edilmiştir [48].

## Proteazlar

Kazeinolitik proteaz (Clp) hem normal koşullar altında hem de stres koşulları altında farklı hücresel işlemler için öneme sahiptir (Şekil 4). Clp komplekslerinin iki bileşenli yapısını silindir şeklinde iki farklı proteolitik çekirdek (ClpP ve ClpQ) ve ATPaz işlevine sahip farklı şaperon halkaları meydana getirmektedir. ClpP proteolitik çekirdeği ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpL ve ClpX gibi aktif şaperonlarla, ClpQ proteolitik çekirdeği ise ClpY şaperonu ile etkileşime girerek farklı proteaz kompleksleri oluşturabilmektedir [49, 31]. Oluşan Clp proteaz kompleksleri, birden çok polipeptit zincirinden oluşan proteinleri parçalayan serin proteaz aktivitesine sahip olmaktadır. Yüksek sıcaklık stresi uygulamalarından sonra Clp proteaz, şaperonlar tarafından tekrar katlanamayan zarar görmüş proteinleri parçalamaktadır [50].

Yapılan bir çalışmada, 37°C'de $OD^{600}$=0.5 değerine ulaşıncaya kadar geliştirilen L. rhamnosus E97800'e 50°C'de 10 dakika yüksek sıcaklık stresi uygulanmış ve ClpL1 ile ClpL2'nin yüksek sıcaklığa bağlı sentezlenme miktarları incelenmiştir. Yüksek sıcaklık stresi uygulanan *L. rhamnosus* E97800'de ClpL1 ve ClpL2'nin sentez miktarları yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılmayan *L. rhamnosus* E97800'e göre sırasıyla 20 ve 3 kat artış göstermiştir [51].




Şekil 4. Clp kompleksinin yapısı [49]

Htr (yüksek sıcaklık gereksinimi)A hücre zarında bulunan ve şaperon işlevine sahip serin proteazıdır. *E. coli*'de HtrA proteazı düşük sıcaklıklarda şaperon olarak görev almasına karşın normal ve yüksek sıcaklıklarda

katlanmamış proteinlere karşı doğrudan proteaz görevi üstlenmektedir. Smeds ve ark. [52] yaptıkları çalışmada *Lactobacillus helveticus*'u 37°C'de çoğalma evresine ($OD_{600}$=0.8) kadar geliştirdikten sonra gelişim ortamının sıcaklığını 52°C'ye yükselterek *L. helveticus*'un yüksek sıcak stresine karşı adapte olmasını sağlamışlardır. Yüksek sıcaklığa adaptasyon uygulamasının sonunda *L. helveticus*'da HtrA transkripsiyon miktarının iki katına çıktığını tespit edilmiştir.

## SONUÇ

Yapılan çalışmalar, yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyonu sağlanmış probiyotik bakterilerin endüstriyel proseslerde karşılaştıkları yüksek sıcaklık uygulamalarına karşı tolerans gösterebildiklerini ortaya koymuştur. Starter kültür üretimi ile toz ürün üretimi amacıyla yoğurt ve kefir gibi süt ürünlerinin kurutulması sırasında yüksek sıcaklık stresine maruz kalan probiyotik bakterilerin canlı kalma düzeylerini arttırmaya yönelik çalışmaların artarak devam etmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR


[1] Şener, A., 2009. Serbest ve Mikroenkapsüle Probiyotik Bakterilerin Ticari Dondurma Üretiminde Kullanılabilirliği Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 156 s.

[2] Turgut, T., 2006. Bazı Probiyotik Bakterilerin Dondurma Üretiminde Kullanım İmkânları. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye, 168 s.

[3] Gürsoy, O., Kınık, Ö., Gönen, İ., 2005. Probiyotikler ve gastrointestinal sağlığa etkileri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 35: 136-148.

[4] Çomak, E.M., 2010. Farklı İnkübasyon Sıcaklıkları ve Sonlandırma pH'larının Acidophiluslu Yoğurdun Fizikokimyasal, Mikrobiyolojik, Duyusal ve Probiyotik Özellikleri Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, Türkiye, 124 s.

[5] Anonim., 2006. Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliği. Tebliğ No: 2006/34. T.C. Resmi Gazete 07.07.2006 tarih 26221 sayı. Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü, Ankara.

[6] Anonim., 2012. Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete 11.02.2012 tarih 28201 sayı. Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü, Ankara.

[7] Ying, D., Sun, J., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Augustin, M.A., 2012. Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose. *Journal of Food Engineering* 109: 597-602.

[8] Corcoran, B.M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross R.P., 2008. Life under stress: The probiotic stress response and how it may be manipulated. *Current Pharmaceutical Design* 14: 1382-1399.

[9] Üçüncü, M., 2010. Süt Mamulleri Teknolojisi. Meta Basım Matbaacılık. İzmir, Türkiye, 571s.

[10] Paéz, R., Lavari, L., Vinderola, G., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N., Reinheimer, J., 2012. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International* 48: 748-754.

[11] Nale, Z., 2013. Prebiyotik Eklenmiş Kefirin Püskürterek Kurutulması ve Ürünün Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, Türkiye, 120s.

[12] Lian, W.C., Hsiao, H.C., Cho, C.C., 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology* 74: 79-86.

[13] Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology* 96: 1024-1039.

[14] Chavez, B.E., Ledeboer, A.M., 2007. Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology: An International Journal* 25: 1193-1201.

[15] Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F, Collins, K., Ross, R.P., 2001. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal* 12: 183-190.

[16] Fu, N., Chen, X.D., 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International* 44: 1127-1149.

[17] Dikici, A., 2009. Çevresel stres faktörlerine karşı bakteriyel adaptasyonlar ve mekanizmaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergi*si 4(3): 59-68.

[18] Ergin, F., Göçer, E.M.Ç., Aşcı, A.A., Küçükçetin A., 2012. Probiyotik bakterilerin düşük sıcaklık stresine adaptasyonu. *Akademik Gıda* 10(4): 65-69.

[19] Streit, F., Corrieu, G., B´eal, C., 2007. Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. *Journal of Biotechnology* 128: 659-667.

[20] Gündüz, A., 2010. Model Sistemlerde Laktik Asit Bakterileri (*Lactobacillus bulgaricus ve Lactococcus lactis* Üzerine Stres Faktörlerinin Etkisinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye, 94s.

[21] Serrazanetti, D.I., Guerzoni, M.E., Corsetti, A., Vogel, R., 2009. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiology* 26: 700-711.

[22] Smith, W.M., Dykes, G.A., Soomro, A.H., Turner, M.S., 2013. Molecular mechanisms of stress resistance in *Lactococcus lactis*. http://www.formatex.info/microbiology2/1106-1118.pdf (Erişim tarihi: 03.02.2013).

[23] Anonim,2013.http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/gida/moduller/proteinlerin_ozellikleri.pdf (Erişim tarihi: 03.02.2013).

[24] Sugimoto, S., Al-Mahin, A., Sonomoto, K., 2008. Molecular chaperones in lactic acid bacteria: Physiological consequences and biochemical properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106(4): 324-336.

[25] Varmanen, P., Savijoki, K., 2011. Responses of lactic acid bacteria to heat stress. *Food Microbiology and Food Safety*, Tsakalidou, E., (ed) and Papadimitriou, K., (ed). Springer, US, pp 55-66.

[26] Wei-Yin NG, E., 2009. Effect of Starter Cultures on *Lactobacillus acidophilus* Survival and Gene Expression in Yogurt. M. Sc. Thesis, Faculty of California Polytechnic State University, San Luis Obispo, 120 p.

[27] Han, M.J., Yun, H., Lee, S.Y., 2008. Microbial small heat shock proteins and their use in biotechnology. *Biotechnology Advances* 26: 591-609.

[28] De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S., Maguin, E., 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 187-216.

[29] De Angelis, M., Gobbetti, M., 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics* 4: 106-122.

[30] Girgis, H.S., Smith J., Luchansky, J.B., Klaenhammer, T.R., 2003. Stress Adaptations of Lactic Acid Bacteria. In: Yousef, A.E., (ed) and Juneja, V.K., (ed), Microbial stress adaptation and food safety. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 159-211.

[31] Suokko, A., 2008. The Stress Responses of Probiotic Lactobacilli and a Bifidobacterium with Special Emphasis on Clp Family Proteins. Academic Dissertation, Faculty of Veterinary Medicine of the University of Helsinki, Finland, 55p.

[32] Bukau, B., Horwich, A.L., 1998. The Hsp70 and Hsp60 review chaperone machines. *Cell* 92: 351-366.

[33] Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 670-684.

[34] Al-Mahin, A., Sugimoto, S., Higashi, C., Matsumoto, S., Sonomoto, K., 2010. Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli* dnaK. *Applied and Environmental Microbiology* 76(13): 4277-4285.

[35] Hu, B., Mayer, M.P., Tomita, M., 2013. Hsp70-mediated protein refolding in e-cell. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6503/ (Erişim tarihi: 03.02.2013).

[36] Liao, Q., Hang, X., Liu, X., Pan, J., Zhang, H., Yang, H., 2010. The influence of pH on heat stress response by probiotic *Lactobacillus plantarum* LP-Onlly. *Annals of Microbiology* 60: 341-348.

[37] Gouesbet, G., Jan, G., Boyaval, P., 2002. Two-dimensional electrophoresis study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thermotolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3): 1055-1063.

[38] Falke, S., Fisher, M.T., Gogol, E.P., 2001. Structural changes in GroEL effected by binding a denatured protein substrate. *Journal of Molecular Biology* 308: 569-577

[39] Richter, K., Haslbeck, M., Buchner, J., 2010. The heat shock response: Life on the verge of death. *Molecular Cell* 40(2): 253-266.

[40] Weissman, J.S., Rye, H.S., Fenton, W.A., Beechem, J.M., Horwich, A.L., 1996. Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell* 84: 481-490.

[41] Vorob'eva, L.A., 2004. Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40(3): 217-224.

[42] Prasad, J., McJarrow, P., Gopal, P., 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2): 917-925.

[43] Desmond, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P., 2004. Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10): 5929-5936.

[44] Capozzi, V., Weidmann, S., Fiocco, D., Rieu, A., Hols, P., Guzzo, J., Spano, G., 2011. Inactivation of a small heat shock protein affects cell morphology and membrane fluidity in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Research in Microbiology* 162: 419-425.

[45] Guzzo, J., 2012. Biotechnical applications of small heat shock proteins from bacteria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44: 1698-1705.

[46] Nakamoto, H., Vígh, L., 2007. The small heat shock proteins and their clients. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 294-306.

[47] Acunzo, J., Katsogiannou, M., Rocchi, P., 2012. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), αB-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44: 1622-1631.

[48] Capozzi, V., Arena, M.P., Crisetti, E., Spano, G., Fiocco, D., 2011. The *hsp 16* gene of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* is differently regulated by salt, high temperature and acidic stresses, as revealed by reverse transcription quantitative PCR (qRT-PCR) analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 5390-5405.

[49] Kress, W., Maglica, Z., Weber-Ban, E., 2009. Clp chaperone-proteases: Structure and function. *Research in Microbiology* 160: 618-628.

[50] De Angelis, M., Gobbetti, M., 2011. Stress Responses of Lactobacilli. *Food Microbiology and Food Safety*, Tsakalidou, E., (ed) and Papadimitriou, K., (ed). Springer, US, pp 219-249.

[51] Suokko, A., Savijoki, K., Malinen, E., Palva, A., Varmanen, P., 2005. Characterization of a mobile *clpL* gene from *Lactobacillus rhamnosus. Applied and Environmental Microbiology* 71(4): 2061-2069.

[52] Smeds, A., Varmanen, P., Palva, A., 1998. Molecular characterization of a stress-inducible gene from *Lactobacillus helveticus. Journal of Bacteriology* 180(23): 6148-6153.