

## LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE PROTEOMİK ÇALIŞMALAR

Fadime Kıran, Özlem Osmanağaoğlu\*

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji AbD, Tandoğan, Ankara

Geliş tarihi / Received: 28.03.2012

Kabul tarihi / Accepted: 02.06.2012

### Özet

Fermente gıdaların doğal florasında baskın halde bulunan ve tüketiciler tarafından sıklıkla kullanılan laktik asit bakterileri gıda teknolojisi ve sağlık sektörü açısından oldukça önemli bir gruptur. Günümüzde laktik asit bakterilerinin dahil olduğu proteomik çalışmalar, suşların sistematik protein haritalarının çıkarılması ve özellikle sentezleri çeşitli çevresel şartlar veya stresler tarafından uyarılan proteinlerin belirlenmesi üzerine odaklanmaktadır. Bu yaklaşımlar birbirinin tamamlayıcısı olup bakterilerin gıda endüstrisinde, insan sağlığında ve bakteriyel patojenlere karşı mücadelede kullanımları için yeni anlayışlar sağlamaktadır. Laktik asit bakterilerinin endüstriyel önemi düşünüldüğünde, yakın gelecekte özellikle starter kültür ya da probiyotik olarak kullanılacak suşların incelenmesinde, proteomik yöntemlerin kullanımının genomik çalışmalar kadar artacağı öngörülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Laktik asit bakterileri, proteomik, stres.

## PROTEOMIC STUDIES OF LACTIC ACID BACTERIA

### Abstract

Lactic acid bacteria which are dominant in the natural flora of fermented foods and commonly used by consumers, are a very important group for the food technology and health sector. Nowadays, proteomics studies on lactic acid bacteria strains are focused on systematic mapping of strains and determination of protein synthesis induced by especially various environmental situations or stresses. These approaches are complementary to each other and provide new insights for the use of bacteria in food industry, in human health and in struggle against bacterial pathogens. Considering the industrial importance of lactic acid bacteria, the use of proteomics methods is expected to increase as well as genomic studies in the near future, especially in the study of strains which will be used as a starter culture or probiotic.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, proteomic, stres.

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ osmanaga@science.ankara.edu.tr,

☎ (+90) 532 433 8662

☎ (+90) 312 223 2395

## GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB) genel olarak karbonhidrat fermentasyonu neticesinde son ürün olarak laktik asit oluşturan, çubuk ya da kok şeklinde, Gram pozitif, katalaz negatif mikroorganizmalardan oluşan bir gruptur (1). Tüketiciler tarafından kullanılan fermente gıdaların doğal florasında baskın halde bulunan bu bakteriler gıda endüstrisi açısından oldukça önemlidirler (2). Bununla beraber ekzopolisakkarit üretmeleri, probiyotik özellik sergilemeleri, bazılarının ise antimikrobiyal bir madde olan bakteriyosin üretmeleri bu bakteri grubuna olan ilgiyi son yıllarda arttırmış ve bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar derinlik kazanmıştır (3). Sanayide kullanımlarının yaygınlaşması ile birlikte kullanılacak bakteri suşlarının seçimi ve bu bakterilerin önemli özelliklerinin belirlenmesi ise oldukça önemli olmuştur. Günümüzde tarım ve gıda endüstrisinde kullanılan starter kültürlerin gıda ürünlerinde uzun süre varlıklarını muhafaza etmesi ve bu çevresel koşullar altında karşılaştıkları stres ortamlarında yaşama adapte olmaları beklenmektedir. Bu derlemede, LAB suşlarının farklı endüstriyel kullanım alanlarında, fabrikasyon işlemlerinde veya starter kültür muhafazasında karşılaşılabilecekleri çeşitli stres koşullarında gerçekleştirilen proteomik yaklaşımlar ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

## PROTEOM

Proteom "bir genomun toplam protein komplemanı" olarak tanımlanmaktadır. Proteomik ise tüm hücre biyolojisinin anlaşılabilmesi amacıyla farklı dinamik koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarında genom tarafından kodlanan ve sentezlenen tüm proteinlerin kantitatif analiz teknolojisi, yani proteomun tanımlanması işlemidir (4). Genom proteoma kıyasla değişmezken proteom oldukça yüksek bir dinamizme sahiptir. Bu dinamizm hücrenin çevresel koşullarında çeşitli stres durumlarından etkilenmesine bağlı olurken hücrenin sağlıklı olup olmaması veya fizyolojik durumundan da kaynaklanabilmektedir (5).

Proteomik iki boyutlu jel elektroforezini (2-DE) temel alacak şekilde geliştirilmiş bir bilim dalıdır (6). Proteomik çalışmalarının birinci temel amacı hücrelerden izole edilen proteinlerin tanımlanması, diğeri ise tanımlanmış proteinlerin ifade seviyelerinin belirlenmesidir. Bu iki hedefe ulaşmada kütle spektrofotometresi (MS) vazgeçilmez bir araçtır

(7). Bu tip çalışmalarda öncelikli olarak toplam protein izole edilmekte ve protein miktarının belirlenmesinin ardından proteinler izoelektrik noktalarına ve molekül ağırlıklarına göre ayrılmaktadırlar. Bu şekilde gerçekleştirilen ayırma yöntemine iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) adı verilmektedir. Bu işlemi takiben, jeller proteinlerin görünür hale gelmesi için gümüş-boyama, organik veya florasan boyaların kullanımıyla boyanmaktadır. İstatistiksel analiz neticesinde doğal suş ile strese maruz bırakılan suşun proteom profilleri karşılaştırılmakta ve fazla/az regüle olan ya da sadece bir numunede var olan farklı proteinler tespit edilebilmektedir. Tanımlama amacıyla tespit edilen proteinler denatüre edilerek enzimatik yolla peptitlerine ayrılmakta ve son olarak MS'de tayin edilmektedir. Proteinlerin iyonize olabilen triptik peptitleri ise MALDI-TOF (Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi) peptit kütle parmakizi analizi neticesinde tanımlanabilmektedir. MS/MS spektrumu, kısmi dizi etiketi elde edebilmek amacıyla yazılım programında değerlendirilmektedir (8-12). Bütün bu çalışmalar sonucunda bir mikroorganizmanın bütününe özel bir dokusunun veya herhangi bir hücresel kısmının proteinlerindeki değişiklikler izlenebilmektedir.

## LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE PROTEOMİK ÇALIŞMALARIN TEMEL AMACI

Mikroorganizmalar söz konusu olduğunda proteomiksi kullanan iki temel yaklaşım tasarlanabilir (13,14). Bu yaklaşımlardan birincisi, bahsi geçen koşulda bakterinin sistematik protein haritasının saptanmasıdır. *Bifidobacterium longum* NCC2705 suşunun referans proteom haritası Yuan ve arkadaşları tarafından tamamlanmış ve bilim adamlarının kullanımına sunulmuştur (15). Probiyotik çalışmalar kapsamında insan kaynaklı 3 farklı *Bifidobacterium longum* suşu proteom seviyesinde karşılaştırılmış ve karbonhidrat metabolizmasında, hücre duvarı ve hücre membranı sentezinde görevli proteinlerin farklılıkları suş bazında ortaya konulmuştur (16). İkinci temel yaklaşım ise diferansiyel yaklaşım olarak tanımlanmakta ve farklı çevresel koşullara maruz bırakılan suşa ait protein paternlerinin doğal suş ile karşılaştırılmasını gerekli kılmaktadır. Bu yaklaşım günümüzde en çok tercih edilen yaklaşımdır (17, 18). Bakteriler karşılaştıkları çeşitli çevresel durumlara karşı (sıcaklık, tuz, pH, ozmotik

basınç vs.) yaşamlarını ve metabolik aktivitelerini devam ettirebilmek adına farklı mekanizmalar geliştirmektedirler. Son yıllarda bakterilerin geliştirmiş oldukları bu çevresel stres cevaplarının proteomik çalışmalar dahilinde araştırılması hız kazanmıştır. Bu tarz mekanizmaları anlamak, özellikle gıda muhafazasında mikrobiyal adaptasyon sağlayan ve çeşitli koşullara karşı direnç sağlayabilen tanımlanmış stabil starter kültürlerine ihtiyaç duyan gıda endüstrisi için oldukça önemlidir. Özellikle *Enterococcus*, *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinslerine ait türler üzerinde ileri seviyelerde proteomik çalışmalar gerçekleştirilmektedir (19-23). Bu çalışmalarda dikkat edilen en önemli nokta seçilen stres faktörüdür. Stres faktörünün seçilme nedeni bakterinin kullanılacağı gıdaların üretim aşamaları veya gıdanın saklama koşulları gibi etkenlere bağlıdır. Çalışılan bakterilerin seçilme nedenlerinin başında ise, bakterinin starter kültür olarak kullanılma kapasitesi veya probiyotik özellikler sergilemesi gelmektedir. Yapılan bir çalışmada gerçekleştirilen 2-DE ve MS analizleri *Lb. plantarum* suşunun tutunmada görevli olan proteinlerinin tanımlanmasına olanak sağlamış ve probiyotik seçimi için biyomarker görevi görebilecek proteinler tespit edilmiştir (24). Probiyotik özellikler sergileyen *Lb. reuteri* ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise ağızdan alınan suşun intestinal sisteme geçiş esnasında karşılaştığı asit stresine karşı verdiği cevap proteom seviyesinde çalışılmış ve 60 adet asite cevap proteini tanımlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler probiyotik kriterler dahilinde suşun, asite dayanıklı olduğunu ve mide asitinde canlılığını devam ettirebildiğini göstermiştir (25). Literatür taramaları neticesinde LAB suşlarında çalışılan bazı stres faktörleri ve bu ortamlarda indüklenen /baskılanan proteinler çizelge 1'de özetlenmiştir (26).

### LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE PROTEOMİK YAKLAŞIMLARLA STRES TEPKİMLERİNİN ANALİZİ

Çeşitli LAB suşları endüstriyel işlemler esnasında karşılaştıkları farklı uygulamalarda veya probiyotik olarak gastrointestinal sistemden geçiş esnasında çeşitli streslere maruz kalmaktadırlar. Bu alanda gerçekleştirilen proteomik yaklaşımlar ise günümüzde paha biçilmez bir öneme sahiptir. Dolayısıyla endüstriyel ilgi alanına ve/veya fabrikasyon işlemleri

ve starter kültür muhafazası esnasında karşılaşılan problemlere bağlı olarak tercih edilen farklı yaklaşımlar bulunmaktadır.

**Sıcaklık stresine yanıtın analizi:** Sıcaklık stresine (heat shock-HS) verilen yanıt tüm prokaryot ve ökaryotlarda evrenseldir. Sıcaklık şokuna verilen yanıtın en bilindik şekli hasar görmüş proteinin yeniden katlanmasına veya elimine olmasına sebep olacak şekilde etki gösteren şaperonlardan ve proteazlardan oluşmuş olan setin indüksiyonudur (26). Algelis ve arkadaşları 2004 yılında, *Lb. plantarum*'da sıcaklık şokuna verilen yanıtı araştırmışlar ve DnaK, GroEL, ribozomal proteinler L1, L11, L31 ve S6, DNA-bağlanma proteini II, HlbA ve CspC proteinlerinin bu strese cevap olarak indüklendiğini tespit etmişlerdir (27). *Lc. lactis* suşunda sıcaklık şokuna verilen yanıtı detaylı veriler *dnaK*, *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* ve *ctsR* mutantlarına ait çalışmalardan elde edilmiştir (28). *dnaK* mutant suşu üzerinde gerçekleştirilen bir çalışma, 30 °C'de çeşitli hsp'lerin mutant suşta daha fazla sentezlendiğini göstermiştir. Probiyotik *Lb. gasseri* suşunda ise 49 °C'de 35 dakika sıcaklığa maruz kalma neticesinde, peynir oluşumu aşamasında proteolize katkı sağlayan endopeptitaz PepO aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bu çalışma endüstriyel uygulamalarda kullanılacak suşlara ait önemli özelliklerin proteomik çalışmalarla belirlenebileceğine dair bir örnek teşkil etmektedir (29). Benzer bir çalışmada ise peynir yapımında starter kültür olarak kullanılan *Lb. helveticus* PR4 suşunun proses aşamalarında karşılaştığı farklı sıcaklık derecelerine karşı cevabı proteomik yaklaşımlarla belirlenmiş ve çeşitli proteinazlar ve peptitazlara ilaveten asidifikasyonda rol alan bazı proteinlerin fazla sentezlendiği tespit edilmiştir. Buna göre 55 °C'den 40 °C'ye soğutma işlemini takiben çeşitli stres proteinlerinin (DnaK ve GroEL gibi), glikolitik yolda görev alan enzimlerin (enolaz ve gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenaz gibi), regülatör proteinlerinin ve faktörlerinin (DNA-bağlanma protein II ve ATP bağımlı proteaz gibi) sentezinde artış meydana gelmiştir (30).

**Soğuk stresine yanıtın analizi:** Laktik asit bakterisi fermentasyonu ileri derecede soğuk koşullarda yaşama kapasitesine sahip donmuş starter kültürlerin ilavesi ile başlatıldığı için düşük sıcaklığa adaptasyon pratik bakış açısından oldukça önemlidir. Ayrıca, bazı LAB suşları düşük sıcaklıkta

fermentasyon aşamasında ve fermente gıdaların tüketim öncesi depolanması esnasında soğuk strese maruz kalmaktadırlar (31). Soğuk stresi, sitoplazmik zarın olağan kristalin yapısını etkileyerek zarı jel faz durumuna getirmekte, DNA'nın süpersarmal yapısını değiştirmekte ve soğuk şok yanıtında görev yapan proteinleri kodlayan en azından birkaç mRNA'nın stabilitesini değiştirmektedir (32). Soğuk şoku proteinlerinin sayısı ise suşlara göre değişkenlik göstermektedir. Wouters ve arkadaşları, *Lc. lactis* suşunda soğuk ile indüklenen proteinler (cold induced proteins-CIP) arasında translasyon, şeker metabolizması, kromozom yapılanması ve sinyal transdüksiyon işlemlerinde görev alan proteinlerin olduğunu belirtmişlerdir (33). *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 suşunda gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise soğuk stres 4 °C, 10 °C ve 20 °C'de uygulanmış ve 2-DE neticesinde soğuk şok proteinleri olarak bilinen CspA-B-C-D-E proteinleri tanımlanmıştır. mRNA seviyesinde incelendiğinde ise CspC transkriptlerinin en az seviyede ifade edildiği bildirilmiştir. CspF ve CspG olarak adlandırılan diğer iki protein ise sadece 2-DE analizi aracılığıyla gözlemlenebilmiştir (34). Dondurma-çözme, dondurarak kurutma ve soğuk koşullarda bekletme gibi farklı işlemlerde ise glutatyon içeren hücrelerin içermeyenlere göre oldukça dirençli olduğu tespit edilmiştir (35).

**Asit stresine yanıtın analizi:** Laktik asit bakterilerinin en temel özelliği şekeri fermente ederek laktik asit oluşturmalarıdır. Bu özellik, LAB suşlarının gıda fermentasyonu için sanayide kullanımlarının esasıdır. Asit tepkime yanıtları özellikle bu bakterilerin endüstriyel uygulamalarda kullanımının, mide asitine dayanıklılığının, dış çürümesinin başlamasının ve ilerlemesinin anlaşılması amacıyla incelenmiştir (31). Nötrofilik bakteriler için, daha düşük dış pH ile sonuçlanan iç pH'nın azalmasının hücresel metabolizma üzerinde çok sayıda etkisi bulunmaktadır. Örneğin, bakteriler için bir enerji kaynağı oluşturan proton harekete geçirici gücün (PMF) dağılmasına asitleşme yol açmaktadır (36). *Lb. reuteri* suşu ile gerçekleştirilen çalışmalar düşük pH yanıtında önemli olan proteinlerin aynı zamanda safra tuzu yanıtında da gerekli olduğunu ortaya koymuştur (37). Mikroorganizmalar mide-bağırsak sistemi boyunca geçişleri esnasında düşük pH ve safra tuzu ile karşılaşacakları için mikroorganizmaların bu iki strese karşı koordineli bir şekilde yanıt geliştirmeleri şarttır bir durum

değildir. Bununla beraber, farklı bir çalışmada ise fermentasyon neticesinde oluşan asite karşı toleransın soğuğa karşı tolerans ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (38). Probiyotik özelliklere sahip *Lb. casei* Zhang suşunun asite karşı verdiği yanıt incelendiğinde, 33 proteinin asit stresine bağlı olarak farklı indükledikleri belirlenmiştir (39). Elde edilen sonuçlar özetlendiğinde, asit adaptasyonunun glikolitik yol üzerinde önemli etkisi bulunduğu ve karbon akışını yeniden yönlendirebilmesinin mümkün olduğu belirlenmiştir.

**Tuz stresine yanıtın analizi:** Mikroorganizmalar genel olarak prolin, glisin betain veya glutamat gibi ozmo koruyucu maddeler biriktirmek suretiyle tuz stresine karşılık vermektedirler. Hiperozmotik şoku takiben potasyum öncelikle hücrede birikmekte ardından ozmo koruyucular ile yer değiştirmektedir. Ozmo koruyucu biriktirme sistemlerine dahil olan potasyum taşıma sistemlerine dahil proteinler tuz stresinde indüklenmektedirler. *Ent. faecalis* türünde gerçekleştirilen tuz stresi çalışmaları neticesinde 13 proteinin indüklediği belirtilmiştir (40). Elde edilen bazı veriler ise ozmo koruyucuların fizyolojik rolünü doğrulamakta ve tuz stresinin safra tuzu, SDS, etanol veya hidrojen peroksit ile yok edici işlemlere karşı tolerans oluşturduğunu da göstermektedir (41). Bununla beraber, *Lc. lactis* suşunun ozmotik strese yanıtında glutatyonun koruyucu role sahip olduğu proteom çalışmaları neticesinde belirlenmiştir. Özellikle starter kültürlerin stabilitesinde önemli sonuçlar elde edilen çalışmada glutatyon genel koruyucu olarak tanımlanmıştır (42).

**Safra tuzu stresine yanıtın analizi:** Safra tuzuna direnç bakterilerin mide-bağırsak sisteminden geçişleri esnasında yaşamları için oldukça önemli bir özelliktir. Çeşitli LAB suşlarında gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde, hücrelerden safra salınımına aracılık eden zar proteinlerinin safra direnci ile ilgili olduğu gösterilmiştir (31). Fırsatçı patojenlerden olan ve sıklıkla hastane enfeksiyonlarına neden olan *Ent. faecalis* V583 suşunun safra tuzu stresine verdiği cevap intrasellüler proteom çalışmalarında incelenmiştir. Tespit edilen 500 proteinden 53 tanesi safra tuzu varlığında sentezlenmiş, MS ile tanımlanmış ve yağ asiti ve fosfolipit biyosentezinde görevli proteinlerin daha fazla regüle oldukları tespit edilmiştir (43). *Lb. plantarum* suşlarının safra tuzuna verdikleri cevabın incelendiği farklı bir çalışmada ise safra tuzu tarafından oluşturulan oksidatif

## Laktik Asit Bakterilerinde Proteomik Çalışmalar

Çizelge 1. Proteomik analizlerle tanımlanan stres proteinleri (26).  
Table 1. Stress proteins identified by proteomic analysis (26).

Stres Stress	Mikroorganizma Microorganism	İndüklenen protein sayısı Number of induced protein	Tanımlanan proteinler Identified proteins	Represyona uğrayan protein sayısı Number of repressed protein
Asit Acid	<i>Lc. Lactis</i>	33 (9 Hsp,4 UV,1 ox)	Dnak, GroEL, GroES	17
	<i>Lb. sanfransiscensis</i>	15	GrpE, YhrA	
	<i>Lb. acidophilus</i>	9*		
	<i>Lb. bulgaricus</i>	>30	DnaK, GroEL, GroES	
	<i>Lb. thermophilus</i>	10		
	<i>St. mutans</i>	64 (25 spesifik) (25 Specific)		49
	<i>St. oralis</i>	28		11
	<i>Ent. faecalis</i>	32 (9 Hsp,6 Gsp)	DnaK, GroEL, Gsp65	
Alkaliin Alkaline	<i>Ent. faecalis</i>	37 (16 Bi,10 Hsp)	DnaK, GroEL	~ 600
Soğuk Cold	<i>Lc. lactis</i> IL1403	12 (>12 kDa)	CspA, B, C, D, Hpr,	~ 600
	<i>Lc. lactis</i> MG1363	22	CcpA, L9	
	<i>St. thermophilus</i> CNRZ302	24		
	<i>St. thermophilus</i> PB18	2	Csp	
	<i>Ent. faecalis</i>	11		
Sıcak Heat	<i>Lc. lactis</i> LM0230	13	DnaK, GroEL	
	<i>Lc. lactis</i> IL1403	16	DnaK, GroEL, GroES	
	<i>Lc. lactis</i> MG1363	17	DnaK,	
	<i>St. mutans</i>	40 (6 spesifik*) (6 Specific*)	GroEL,GroES,HrA	8
	<i>Ent. faecalis</i>	34 (5 Gsp)	DnaK, GroEL, Gsp65	
Oksidatif ortam Oxidative	<i>St. mutans</i>	69 (15 spesifik) (15 Specific)		49
	<i>Ent. faecalis</i>	23 (3 Gap)	Gsp65, DnaK, GroEL	
NaCl	<i>Lc. lactis</i>	12 (12 Hsp)	DnaK, GroEL, GroES	Fazla
	<i>St. mutans</i> <i>Ent. faecalis</i>	52 (10 spesifik) (10 Specific) 13		
NaClO	<i>Ent. faecalis</i>	7	DnaK, GroE	Fazla
Kadmiyum Klorür Cadmium chloride	<i>Ent. faecalis</i>	7		
Safra tuzları Bile Salts	<i>Ent. faecalis</i>	45	DnaK, GroEL	
SDS	<i>Ent. faecalis</i>	34		
Açlık (glukoz) Starvation (glucose)	<i>Lc. lactis</i>	21		45
	<i>Lc. lactis</i>	14		
	<i>Ent. faecalis</i>	42 (16 ol)	Karbamat kinaz,Gls24	
Açlık (oligotropik çevre) Starvation (oligotrophic environment)	<i>Ent. faecalis</i>	51 (16 glz)	Gls24	
	<i>St. mutans</i>	58 (11 spesifik) (11 Specific)	20	
Durgun faz Stationary phase	<i>St. thermophilus</i>	10	27	
	<i>Lb. acidophilus</i>	16 (9 Ac)		

\*: Durgun gelişim fazında asitlik ile indüklenen ya da represyona uğrayan protein, \*: verilen stres koşulunda spesifik olarak indüklenen protein sayısı, Ac: asitlik ile indüklenen protein, Bi: safra tuzu ile indüklenen protein, Gls: Glukoz açlık proteini, Gsp: Genel stres proteini, Hsp: sıcaklık şokuyla indüklenen protein, ol: oligotropik ortam ile indüklenen protein, Ox: oksidatif stres ile indüklenen protein, UV: ultraviyole ışına ile indüklenen protein.

\*: Protein induced or repressed by acidity in stationary phase, \*: number of proteins specifically induced by given stress condition, Ac: protein induced by acidity, Bi: protein induced by bile salt, Gls: glucose starvation protein, Gsp: general stress protein, Hsp: protein induced by heat shock, ol: protein induced by oligotrophic environment, Ox: protein induced by an oxidative stress, UV: protein induced by UV treatment.

hasara karşı korunmada glutasyon redüktazın önemli olduğu belirtilmiştir (44).

**Oksidatif strese yanıtın analizi:** Çeşitli reaktif oksijen türleri (ROS) lipitler, proteinler veya DNA ile reaksiyona girerek ölümcül hasarlara neden olabilirler (45). Bakterilerdeki oksidatif stres, ROS konsantrasyonu kritik seviyeyi aştığında savunma mekanizmalarını aktive edebilen spesifik transkripsiyonel regülatörler aracılığı ile algılanmaktadır (46). *St. thermophilus* suşunda gerçekleştirilen bir çalışmada, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin genel stres proteinleri ile birlikte oksidatif stresin zararlı etkilerinin tamir edilmesinde spesifik olarak görev yapan NADH oksidaz, Mn süperoksit dismutaz, SufB ve SufC gibi Fe-S proteinler, glutasyon redüktaz ve Dpr peroksit direnç proteini gibi proteinlerin indüksiyonunu arttırdığı bununla beraber enerji metabolizmasında görevli proteinlerin regülasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir (47).

**Açlık stresine yanıtın analizi:** Bakteriler kendi doğal ortamlarında çoğu kez büyümeyi kısıtlayıcı koşullara maruz kalmaktadırlar. Bu gibi olumsuz koşullara karşı yanıtları alternatif sigma faktörlerinin kontrolü altında bir takım genlerin aktivasyonuna yol açmaktadır (48). Hücreler durağan aşamaya girdiğinde karbon kaynağından mahrum kalınması, pH ve oksijen mevcudiyeti gibi çok sayıda faktör bakterilerin gelişmelerini etkilemektedir (31). Glukoz açlığı *Ent. faecalis* suşunda çalışılmış ve karbamat kinaz protein sentezinin bu stres koşulunda arttığı tespit edilmiştir. Bu protein, arginin deaminaz yolu tarafından arginin degradasyonunu içeren arc operonu ile ilişkilidir. Bu metabolik yol, ATP üretimine neden olmakta ve katabolit represyonla regüle edilmektedir (49). Bu yolun glukoz açlık koşulları altında enerji temin etmek için alternatif bir yol olduğu varsayılmaktadır.

## SONUÇ

Laktik asit bakterinde çeşitli stres faktörlerine duyarlı ve dirençli tür taraması özellikle gıdalarda kullanımları dâhilinde karşılaşılabilecekleri işlemleri geçmeleri açısından oldukça önemli olmaktadır. Gıda endüstrisinde ise özellikle gıda muhafazası esnasında mikrobiyel adaptasyon ve çeşitli koşullara karşı direnç sağlayabilen tanımlanmış stabil starter kültürlerine ihtiyaç duyulmaktadır (50). Bu bağlamda son yıllarda çeşitli LAB suşlarının uygulamaya yönelik stres koşullarına verdikleri

cevaplar proteomik seviyesinde anlaşılmaya ve geliştirilmeye çalışılmaktadır. Proteomik teknolojisi hücrenin moleküler mekanizmasını anlamak için kullanılan teknolojilere tamamlayıcı olabilme kapasitesine sahip üstün bir tekniktir (51). Moleküler hücresel biyolojisi, DNA ve RNA'daki bilgilerin transkripsiyon seviyesindeki bilgiler ile tamamlanmasını gerekli kılmaktadır ki bu da proteomikin sunduğu önemli bir imkandır. Sonuç olarak, özellikle insan aktivitelerinin çeşitli yönlerinde, gıda endüstrisinde ve sağlık alanında önemli bir grup olan laktik asit bakterilerini içeren proteomik çalışmalar hala başlangıç aşamasındadır ve yakın gelecekte büyük gelişmelerin olması beklenmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Khalid K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. *Int J Biosciences*, 1(3): 1-13.
2. Zhu Y, Zhang Y, Li Y. 2009. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83: 597-610.
3. O'Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C. 2012. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol*, 152: 189-205.
4. Wright PC, Noirel J, Ow SY, Fazeli A. 2012. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogen*, 77: 738-765.
5. Smith JC, Figeys D. Proteomics technology in systems biology. 2006. *Mol Biosyst*, 2: 364-370.
6. Smith R. 2009. Two-Dimensional Electrophoresis: An Overview. In: Two-Dimensional Electrophoresis Protocols, Sheehan D, Tyther R (editors), Humana Press, New York, pp. 3-9.
7. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. 2007. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*, 389: 1017-1031.
8. Hillenkamp F, Peter-Katalinic J. 2007. MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation. In: Methods and Applications, Hillenkamp F, Peter-Katalinic J (editors), Wiley-Vch, Weinheim, pp. 345.

9. De Bruyne K, Slabbinck B, Waegeman W, Vauterin P, De Baets B, Vandamme P. 2011. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Syst Appl Microbiol*, 34: 20-29.
10. Kolker E, Higdon R, Hogan JM. 2006. Protein identification and expression analysis using mass spectrometry. *Trend Microbiol*, 14(5): 229-235.
11. De Bruyne K, Slabbinck B, Waegeman W, Vauterin P, De Baets B, Vandamme P. 2011. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Syst Appl Microbiol*, 34: 20-29.
12. Rabilloud T, Lelong C. 2011. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: *A tutorial*. *J Proteomics*, 74: 1829-1841.
13. Norbeck AD, Callister SJ, Monroea ME, Jaitly N, Elias DA, Lipton MS, Smith RD. 2006. Proteomic approaches to bacterial differentiation. *J Microbiol Meth*, 67(3): 473-486.
14. Blackstock P, Weir MP. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trend Biotechnol*, 17: 121-129.
15. Yuan J, Zhu L, Liu X, Li T, Zhang Y, Ying T, Wang B, Wang J, Dong H, Feng E, Li Q, Wang J, Wang H, Wei K, Zhang X, Huang C, Huang P, Huang L, Zeng M, Wang H. 2006. A proteome reference map and proteomics analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Mol Cell Proteomics*, 5: 1105-1118.
16. Aires J, Anglade P, Baraige F, Zagorec M, Champomier-Verge MC, Butel MJ. 2010. Proteomic comparison of the cytosolic proteins of three *Bifidobacterium longum* human isolates and *Bifidobacterium longum* NCC2705. *BMC Microbiol*, 10: 29-36.
17. Hörmann S, Scheyhing C, Behr J, Pavlovic M, Ehrmann M, Vogel RF. 2006. Comparative proteome approach to characterize the high-pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451<sup>T</sup>. *Proteomics*, 6: 1878-1885.
18. Serrazanetti DI, Guerzoni ME, Corsetti A, Vogel R. 2009. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol*, 26: 700-711.
19. Maddalo G, Chovanec P, Stenberg-Bruzell F, Nielsen HV, Jensen-Seaman MI, Ilag LL, Kline KA, Daley DO. 2011. A reference map of the membrane proteome of *Enterococcus faecalis*. *Proteomics*, 11(19): 3935-3941.
20. Serrazanetti DI, Guerzoni ME, Corsetti A, Vogel R. 2009. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol*, 26: 700-711.
21. Wu R, Wang W, Yu D, Zhang W, Li Y, Sun Z, Wu J, Meng H, Zhang H. 2009. Proteomics analysis of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic bacterium isolated from traditional home-made koumiss in inner Mongolia of China. *Mol Cell Proteomics*, 8: 2321-2338.
22. Smith WM, Dykes GA, Soomro AH, Turner MS. 2010. Molecular mechanisms of stress resistance in *Lactococcus lactis*. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Mendez-Vilas A (editor), Formatex, UK, pp. 1106-1118.
23. Pessione A, Lamberti C, Pessione E, Pessione A, Lamberti C, Pessione E. 2010. Proteomics as a tool for studying energy metabolism in lactic acid bacteria. *Mol Bio*, 6: 1419-1430.
24. Izquierdo E, Horvatovich P, Marchioni E, Aoude-Werner D, Sanz Y, Ennahar S. 2009. 2-DE and MS analysis of key proteins in the adhesion of *Lactobacillus plantarum*, a first step toward early selection of probiotics based on bacterial biomarkers. *Electrophoresis*, 30: 949-956.
25. Lee K, Pi K. 2010. Effect of Transient Acid Stress on the Proteome of Intestinal Probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Russ Biokhim*, 75(4): 558-564.
26. Champomier-Verges MC, Maguin E, Mistou MY, Anglade P, Chich JF. 2002. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *J Chrom*, 771: 329-342.
27. Algelis MA, Di Cagno R, Huet C, Crecchio C, Fox PF, Gobbetti M. 2004. Heat Shock Response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 70(3): 1336-1346.
28. Ingmer H, Vogensen FV, Hammer K, Kilstrup M. 1999. Disruption and analysis of the clpB, clpC, and clpE genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a new Clp family in gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, 181: 2075-2081.
29. Suokko A, Poutanen M, Savijoki K, Kalkkinen N, Varmanen P. 2008. ClpL is essential for induction of thermotolerance and is potentially part of the HrcA regulon in *Lactobacillus gassseri*. *Proteomics*, 8: 1029-1041.

30. Di Cagno R, De Angelis M, Limitone A, Fox PF, Gobetti M. 2006. Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 72 (7): 4503-4514.
31. Van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Anton Leeuw*, 82: 187-216.
32. Phadtare S, Yamanata K, Inouye M. 2000. Bacterial Stress Response. In: Bacterial Stress Response, Storz G, Hengge-Aronis R (editors), ASM Press, Washington DC, pp. 33.
33. Wouters J, Rombouts F M, De Vos WM, Kuipers OP, Abee T. 1999. Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Appl Environ Microbiol*, 65: 4436-4442.
34. Wouters J, Sanders JW, Kok J, De Vos WM, Kuipers OP, Abee T. 1998. Clustered organization and transcriptional analysis of five csp genes of *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiol*, 144: 2885-2893.
35. Zhang J, Du G, Zhang Y, Liao X, Wang M, Li Y, Chen J. 2010. Glutathione protects *Lactobacillus sanfranciscensis* against freeze-thawing, freeze-drying, and cold treatment. *Appl Environ Microbiol*, 76 (9): 2989-2996.
36. Slonczewski JL, Foster JW. 1996. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, Neidhardt FC (editor), ASM Press, Washington DC, pp. 1539-1545.
37. Lee K, Lee HG, Pi K, Choi YJ. 2008. The effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Proteomics*, 8(8): 1624-1630.
38. Streit F, Delettre J, Corrieu G, Beal C. 2007. Acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* induces physiological responses at membrane and cytosolic levels that improves cryotolerance. *J Appl Microbiol*, 105: 1071-1080.
39. Wu R, Zhang W, Sun T, Wu J, Yue X, Meng H, Zhang H. 2011. Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *Int J Food Microbiol*, 147: 181-187.
40. Pichereau V, Bourot S, Flahaut S, Blanco C, Auffray Y, Bernard T. 1999. The osmoprotectant glycine betaine inhibits salt-induced cross-tolerance towards lethal treatment in *Enterococcus faecalis*. *Microbiol*, 145: 427-435.
41. Flahaut S, Hartke A, Giard JC, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y. 1996. Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 138: 49-54.
42. Zhang Y, Zhang Y, Zhu Y, Mao S, Li Y. 2010. Proteomic analyses to reveal the protective role of glutathione in resistance of *Lactococcus lactis* to osmotic stress. *Appl Environ Microb*, 76(10): 3177-3186.
43. Bohle LA, Fargestad EM, Veiseth-Kent E, Steinmoen H, Nes IF, Eijsink VGH, Mathiesen G. 2010. Identification of proteins related to the stress response in *Enterococcus faecalis* V583 caused by bovine bile. *Proteome Sci*, 8: 37-49.
44. Hamon E, Horvatovich P, Izquierdo E, Bringe F, Marchioni E, Aoude-Werner D, Ennahar S. 2011. Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiol*, 11: 63-74.
45. Rochat T, Gratadoux JJ, Gruss A, Corthier G, Maguin E, Langella P, van de Guchte M. 2006. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. *Appl Environ Microbiol*, 72: 5143-5149.
46. Farr SB, Kogoma T. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Mol Biol R*, 55(4): 561-585.
47. Fernandez A, Thibessard A, Borges F, Gintz B, Decaris B, Leblond-Bourget N. 2004. Characterization of oxidative stress-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *Arch Microbiol*, 182(5): 364-372.
48. Wosten MM. 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev*, 22: 127-150.
49. Giard JC, Hartke A, Flahaut S, Boutibonnes P, Auffray Y. 1997. Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2: survival and protein analysis. *Res Microbiol*, 148: 27-35.
50. Zhu Y, Zhang Y, Li Y. 2009. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83: 597-610.
51. Cil GI. 2012. Proteomik ve gıda teknolojisinde kullanım alanları. *Gıda*, 37 (5): 303-308.