

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ STRES KOŞULLARININ**  
***Escherichia coli* O157:H7'de GLUTATYON İÇERİĞİ**  
**ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nihal KANAT**

**Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR**

**Eylül 2013**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ STRES KOŞULLARININ  
*Escherichia coli* O157:H7'de GLUTATYON İÇERİĞİ  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nihal KANAT**

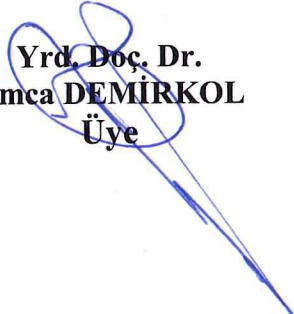
**Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ**

**Bu tez 02 / 09 /2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.**

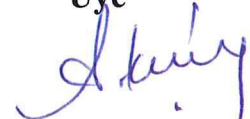
**Doç. Dr.  
Serap COŞANSU AKDEMİR  
Jüri Başkanı**



**Yrd. Doç. Dr.  
Omca DEMİRKOL  
Üye**



**Yrd. Doç. Dr.  
Aysel KÜÇÜK TUNCA  
Üye**



## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, yoğun ve yorucu çalışma temposuna rağmen desteğini ve ilgisini daima hissettiğim, bilgilerini ve tecrübelerini eksik etmeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR'e, yine tecrübesi, bilgisi ve ilgisiyle her zaman destek olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Omca DEMİRKOL'a, laboratuvar çalışmalarımnda destek veren Arş. Gör. Güliz YALDIRAK ve Arş. Gör. Özlem GÜMÜŐAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2012-50-01-036). Bu nedenle çalışmamın gerçekleştirilmesinde maddi desteklerinden dolayı SAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Ayrıca yüksek lisansım ve hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili annem Nermin Taşdemir ve ablam Zühal Taşdemir'e teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	x
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	3
2.2. Bakteriyel Stres.....	4
2.3. Glutasyonun Yapısı, Sentezlenmesi ve Fonksiyonları.....	5
2.4. Sistein.....	9
2.5. Oksidatif Stres.....	11
2.6. Isı Şoku.....	12
2.7. Ozmotik Stres.....	13
2.8. Düşük pH .....	14
2.9. Klor Bileşikleri.....	15
2.10. Hidrojen Peroksit.....	16
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17

3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Kullanılan malzeme ve cihazlar.....	17
3.2.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 suşunun aside adapte edilmesi..	18
3.2.3. pH, sodyum klorür, sıcaklık, sodyum hipoklorit ve hidrojen peroksit streslerinin uygulanması.....	20
3.2.4. HPLC analizi.....	22
3.2.4.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması .....	22
3.2.4.2. Numunelerin hazırlanması, ekstraksiyonu ve türevlendirilmesi.....	24
3.2.4.3. HPLC’de GSH, GSSG ve CYS analizi.....	25
BÖLÜM 4.	
SONUÇLAR .....	26
4.1. <i>E.coli</i> O157:H7’ nin Aside Adaptasyonu.....	28
4.2. pH Stresi.....	29
4.3. NaCl Stresi.....	31
4.4. Sıcaklık Stresi.....	32
4.5. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Stresi.....	33
4.6. Sodyum Hipoklorit Stresi.....	34
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	51

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ATP	: Adenozin trifosfat
Aw	: Su aktivitesi
BHI	: Brain Heart Infusion
CYS	: Sistein
DAEC	: Difuz-adhering <i>E. coli</i>
DETAPAC	: Di etilen tri amin penta asetik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTT	: Dithiothreitol
EaggEC	: Entero-agregativ <i>E. coli</i>
Eh	: Redoks potansiyeli
EHEC	: Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC	: Enteroinvasiv <i>E. coli</i>
EPEC	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
FAD	: Flavin adenine dinükleotid
GS•	: Tiyil radikal
GSH	: Glutasyon, indirgenmiş glutasyon
gshA mutant	: GSH sentezleyemeyen mutant
GSSG	: Glutasyon disülfid, okside glutasyon
GSSH	: Glutasyon persülfid, okside glutasyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek basınç sıvı kromatografisi
HSPs	: Isı şoku proteinleri
Kdp	: <i>E. coli</i> 'de K <sup>+</sup> tutulum sistemi
KefB	: K <sup>+</sup> aktarım kanalı

KefC	: K <sup>+</sup> aktarım kanalı
MID	: Minimal enfeksiyon dozu
MRD	: Maximum Recovery Diluent
Mrna	: Mesajcı ribonükleik asit
MUG	: 4-methylumbelliferoneglucuronid
NaCl	: Sodyum klorür
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NPM	: N-(1-pyrenyl)-maleimide
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	: Süperoksit anyon
OH•	: Hidroksil radikal
OxyR	: Transkripsiyon faktörü
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SBB	: Serin borat tampon
SMAC	: Sorbitol McConkey
SOD	: Süperoksit dismutaz
SodA	: Mn-SOD, Mangan içeren dismutaz
SoxS	: Süperoksit stres genlerini aktive eden bir protein
SoxRS	: Transkripsiyon faktörü
Stx 1	: Shiga benzeri toksin 1
Stx 2	: Shiga benzeri toksin 2
TrisHCl	: Tris hidroklorik asit
TSB	: Tryptic Soy Broth
TSBG	: %1 glikoz ilaveli Tryptic Soy Broth
VT- 1, VT-2	: Verotoksin 1 ve 2

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	GSH molekülü.....	7
Şekil 2.2.	GSH'un sentezi.....	8
Şekil 2.3.	CYS molekülü.....	10
Şekil 3.1.	Aktifleştirilen <i>Esheria coli</i> O157:H7'nin TSB ve TSBG'ye aşılması.....	19
Şekil 3.2.	TSB ve TSBG kültürlerinden BHI Broth'a aşılama.....	19
Şekil 3.3.	pH, sodyum klorür ve sıcaklık stresleri için TSB'ye aşılama....	21
Şekil 3.4.	Sodyum hipoklorit ve hidrojen peroksit stresleri için TSB'ye aşılama.....	22
Şekil 3.5.	Serbest disülfidril grupları içeren tiyol bileşikleri ile NPM çözeltilisinin reaksiyonu.....	24
Şekil 4.1.	GSH standart eğrisi.....	26
Şekil 4.2.	CYS standart eğrisi.....	27
Şekil 4.3.	GSH ve CYS standart karışımının HPLC'den alınan kromatogramı.....	27
Şekil 4.4.	Kontrol örneği kromatogramı.....	28
Şekil 4.5.	pH stresinin GSH, GSSG ve CYS üzerine etkisi.....	30
Şekil 4.6.	NaCl stresinin GSH, GSSG ve CYS üzerine etkisi.....	32
Şekil 4.7.	Sıcaklık stresinin GSH, GSSG ve CYS üzerine etkisi.....	33
Şekil 4.8.	Sodyum hipoklorit stresinin GSH, GSSG ve CYS üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.9.	Farklı stres koşullarında GSH/GSSG oranları.....	36



## TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1.	GSH ve CYS standart çözeltilerinin hazırlanışı.....	23
Tablo 4.1.	Asit adaptasyonu denemesinde elde edilen sonuçlar.....	29
Tablo 4.2.	pH stresi uygulamasında elde edilen sonuçlar.....	30
Tablo 4.3.	NaCl stresi uygulamasında elde edilen sonuçlar.....	31
Tablo 4.4.	Sıcaklık stresi uygulamasında elde edilen sonuçlar.....	32
Tablo 4.5.	Hidrojen peroksit stresi uygulamasında elde edilen sonuçlar..	34
Tablo 4.6.	Sodyum hipoklorit stresi uygulamasında elde edilen sonuçlar	35

## ÖZET

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli* O157:H7, stres, glutasyon, sıcaklık, pH, tuz, hidrojen peroksit, sodyum hipoklorit

Asit adaptasyonu, düşük pH (3,0), yüksek gelişme sıcaklığı (45°C), NaCl (%5, %10), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%1, %2,5) ve sodyum hipoklorit (%0,05, %0,5) streslerinin *E. coli* O157:H7’de hücre içi glutasyon (GSH) ve sistein (CYS) miktarı üzerine etkisi invitro koşullarda araştırılmıştır. Hücre içi GSH ve CYS miktarları HPLC ile analiz edilmiştir.

Aside adapte edilen grupta canlı hücre sayısı kontrol grubuna yakın bulunurken hücre içi GSH ve CYS miktarı kontrole göre azalmıştır. GSH/GSSG oranı ise 4,37’den 0,91’e düşmüştür. pH 3,0 ortamına aşılana hücrelerde GSH belirlenemezken, CYS miktarının kontrol grubuna göre yaklaşık 15 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yüzde beş NaCl içeren ortamda geliştirilen hücrelerde GSH ve CYS miktarları sırasıyla 20,83 ve 2,64 nmol/10<sup>7</sup> kob olarak belirlenmiştir. Diğer yandan %10 NaCl içeren ortamda geliştirilen hücrelerde GSH belirlenemezken CYS miktarı %5 NaCl ortamındaki hücrelerden yaklaşık 2 kat daha fazla bulunmuştur. GSH/GSSG oranı %5 NaCl bulunan ortamdaki hücrelerde kontrolden daha düşük olup 0,15 olarak hesaplanmış, ancak %10 NaCl bulunan ortamdaki hücrelerde GSH belirlenemediğinden bu oranı hesaplamak mümkün olmamıştır. Yüksek sıcaklıkta (45°C) 6 saat inkübe edilen hücrelerde GSH miktarı (1,72 nmol/10<sup>7</sup> kob) 37°C’de geliştirilen hücrelerdekinden (0,27 nmol/10<sup>7</sup> kob) daha yüksek bulunmuştur. Buna karşın kontrol grubunda 2,11 olan GSH/GSSG oranı 45°C’de inkübe edilen hücrelerde 0,14’e düşmüştür. Hidrojen peroksit (%1, % 2,5) ile 60 dakikalık muamele sonucunda canlı hücre sayısı tespit edilebilir düzeyin altına düşmüştür. Bu nedenle GSH ve CYS tespit edilememiştir. Sodyum hipoklorit (%0,05, %0,5) ile 60 dakika muamele edilen hücrelerde GSH, CYS ve GSH/GSSG oranı kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. GSH/GSSG oranının sodyum hipoklorit stresinde diğer streslere göre oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmada uygulanan sıcaklık, NaCl ve sodyum hipoklorit stresleri hücre içi GSH ve CYS miktarlarının artışına neden olurken, pH stresi (3,0) CYS miktarında artışa neden olmuştur. Sıcaklık ve NaCl streslerinde GSH/GSSG oranı azalırken sodyum hipoklorit stresi ile bu oran yükselmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen verilere göre glutasyonun farklı stres koşullarında *E. coli* O157:H7 hücrelerinin korunmasında rol oynadığı ancak sözkonusu savunma mekanizmasının strese göre farklılık gösterebileceği düşünülmektedir.

# THE EFFECT OF VARIOUS STRESS CONDITIONS on GLUTATHIONE CONTENT in *Escherichia coli* O157:H7

## SUMMARY

Key Words: *Escherichia coli* O157:H7, stress, glutathione, temperature, pH, salt, hydrogen peroxide, sodium hypochlorite

The effect of acid adaptation, low pH (3.0), high growth temperature (45°C), NaCl (5%, 10%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%, 2.5%) and sodium hypochlorite (0.05%, 0.5%) stresses on intracellular glutathione (GSH) and cysteine (CYS) contents in *E. coli* O157:H7 were investigated in vitro conditions. Intracellular GSH and CYS contents were analyzed by HPLC.

While the number of viable cells in acid adapted group was close to the control group, the contents of intracellular GSH and CYS decreased as compared to the control. GSH/GSSG ratio decreased from 4.37 to 0.91. While GSH in the cells inoculated into pH 3.0 medium was not detected, the content of CYS detected to be approximately 15 fold higher as compared to the control. The GSH and CYS contents of the cells grown in medium containing 5% NaCl were 20.83 and 2.64 nmol/10<sup>7</sup> cfu, respectively. On the other hand, while GSH was not detected in growing cells in the medium containing 10% NaCl, content of CYS was approximately 2 fold higher than the cells grown in the medium containing 5% NaCl. GSH/GSSG ratio of cells in medium containing 5% NaCl is lower than control cells was calculated as 0.15, but it was not be able to calculate this ratio because of GSH could not be detected in the cells grown in 10% NaCl added medium. The content of GSH (1.72 nmol/10<sup>7</sup> cfu) in cells incubated for 6 hours at 45°C was higher than the cells grown at 37°C (0.27 nmol/10<sup>7</sup> cfu). After all, 2.11 of GSH/GSSG ratio in control group decreased to 0.14 in incubated cells at 45°C. After treatment with hydrogen peroxide (1%, 2.5%) for 60 minutes, the viable cell count decreased to below the detectable level. Therefore, GSH and CYS can not be detected in hydrogen peroxide treated groups. GSH, CYS and GSH/GSSG ratio in cells treated with sodium hypochlorite (0.05%, 0.5%) for 60 minutes were higher the control group. The ratio of GSH/GSSG was higher in sodium hypochlorite stress than the other stresses.

While the temperature, NaCl and sodium hypochlorite stress conditions applied in this study lead to increase in contents of intracellular GSH and CYS, pH stress (pH 3.0) induced to increase in amount of CYS. The GSH/GSSG ratio decreases in temperature and NaCl stresses, but it increased with sodium hypochlorite stress. Finally, according to data obtained in this study, it was concluded that glutathione plays role for protection of *E. coli* O157:H7 cells from different stresses, but the protection mechanism may differ according to the stress

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Glutasyon (GSH), üç aminoasitten oluşan bir tripeptid olup ( $\gamma$ -L-glutamil-L-sisteinilglisin), pek çok organizmada en fazla bulunan protein olmayan bir tiyoldür. Hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde bol miktarda bulunur. Prokaryotik hücrelerde ise başta *E. coli* olmak üzere Gram-negatif bakterilerde tespit edilmiştir (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005). GSH'un ozmotik şok, asitlik, toksinler, klor bileşikleri ve peroksidlerin neden olduğu oksidatif stres gibi olumsuz çevre koşullarına karşı korunmada önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca, hücre içi potasyum seviyesinin düzenlenmesi gibi olaylarda da etkili olduğu ifade edilmektedir (Masip ve ark., 2006).

*E. coli* O157:H7 en önemli gıda kaynaklı patojen bakterilerden biridir. EHEC (Enterohemorajik *E. coli*) grubunda yer alan *E. coli* O157:H7'nin neden olduğu hastalıklar hemorajik kolit (kanamalı diyare), hemolitik üremi sendromu (böbrek yetmezliği) ve trombotik trombositopenik purpuradır (trombosit eksikliğine bağlı kanama). Özellikle sığırlar olmak üzere çiftlik hayvanlarında yaygın olarak bulunan bu gıda kaynaklı patojen kesim sırasında ete ve sağım sırasında süte bulaşabilmektedir. Buna bağlı olarak da süt ve süt ürünleri ile et ve et ürünlerinden izolasyon oranı oldukça yüksektir (Coşansu ve Ayhan, 2000).

Bakteriler doğal ortamlarında veya gıdalara uygulanan çeşitli prosesler sırasında öldürücü olmayan streslere maruz kalabilirler. Strese maruz kalan hücreler ya ölür yada çeşitli korunma mekanizmaları sayesinde canlı kalır. Patojen bir bakterinin stres karşısında sergilediği korunma mekanizmasının başarılı olması bir anlamda gıdaya uygulanan muhafaza yöntemlerinin patojenleri inhibe etme açısından başarısız olması anlamına gelebilir. Bu nedenle, gıda kaynaklı patojenlerin çevresel streslere karşı direnç göstermeleri gıda güvenliği açısından önemli bir konu olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada *E. coli* O157:H7 in vitro koşullarda sıcaklık, pH, sodyum klorür (NaCl), sodyum hipoklorit ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) stresine maruz bırakılmış ve bu stresler sonucunda hücre içi GSH ve sistein (CYS) içeriğinde meydana gelen değişimlerin HPLC ile belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca strese maruz bırakılan kültürdeki canlı hücre sayısı genel ve selektif besiyerlerine ekim yapılarak belirlenmiştir.

## BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. *Escherichia coli* O157:H7

*E. coli* hayvan ve insan bağırsak sistemlerinin doğal florasında bulunan bir bakteridir. Ancak insanlarda çeşitli hastalıklara sebep olan patojen serotipleri de bulunmaktadır. Bu patojen serotipler virülans özellikleri, patojenite mekanizmaları, klinik sendromlar ile O ve H antijenlerine göre sınıflandırıldığında; enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroinvasiv *E. coli* (EIEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), difuz-adhering *E. coli* (DAEC) ve entero-agregatif *E. coli* (EaggEC) olmak üzere altı grupta toplanmaktadır (Halkman ve ark., 2001). EHEC grubu içinde yer alan *E. coli* O157:H7, ilk kez 1982 yılında gıda kaynaklı patojen olarak tanımlanmıştır (Padhye ve Doyle, 1992).

*E. coli* O157:H7 Gram-negatif, kısa çubuk şeklinde, fakültatif anaerob, hareketli, 37°C'de pH 7,2'de optimum üreyen, %6,5 NaCl içeren ortamda gelişebilen, donma sıcaklığına dirençli, ışınlamaya ve ısısız uygulamalara dirençsiz bir bakteridir (Coia, 1998; Coşansu ve Ayhan, 2000; Halkman ve ark., 2001).

EHEC grubunda yer alan *E. coli* O157:H7'nin birçok biyokimyasal özellikleri *E. coli*'ye benzerlik gösterir. Ancak sorbitol negatif olması ve  $\beta$ -glukoranidaz enziminin eksikliği nedeniyle MUG (4-methylumbelliferoneglucuronid) içeren besiyerinde florasan vermemesi ile farklılık gösterir. Ayrıca 44-45°C'de laktozdan gaz oluşturarak gelişemez (Johnson ve ark., 1995; Coşansu ve Ayhan, 2000).

*E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarında minimal enfeksiyon dozu (MID), 10-100 kob/g gibi çok düşük değerlerdedir. Epidemiyolojik olarak açıklığa kavuşturulan bazı gıda enfeksiyonlarından sorumlu tutulan gıdalarda saptanan etken sayısı 10-200 kob/g olarak bildirilmiştir (Erol, 2007).

*E. coli* O157:H7, shiga benzeri toksin 1 (stx 1) ve shiga benzeri toksin 2 (stx 2) şeklinde adlandırılan iki toksin üretir. Bu toksinler HeLa ve Vero doku kültürü hücrelerine toksik etki yapmaları nedeniyle verotoksin 1 ve 2 (VT-1 ve VT-2) olarak da isimlendirilmiştir. *E. coli* O157:H7 verotoksin üreten en önemli suş olup, bilinen en tehlikeli gıda kaynaklı patojenlerdendir (Coia, 1998).

*E. coli* O157:H7 insanlarda hemorajik kolit (kanamalı kalın bağırsak iltihabı), hemolitik üremik sendrom (kan hastalıklarına bağlı böbreklerde fonksiyon bozuklukları) ve trombositopenik purpura (trombosit eksikliğine bağlı kanama) gibi hastalıklara neden olmaktadır (Doyle, 1991). *E. coli* O157:H7'nin asıl kaynağı sığır ve koyunların bağırsak sistemleridir (Desmarchelier ve Grau, 1997; Coia, 1998). Bu nedenle *E. coli* O157:H7 nedenli salgınlar genellikle dışkı ile kontamine olmuş hayvansal gıdalar ile meyve ve sebzelerden kaynaklanmaktadır (McClure, 2000).

Pastörize edilmemiş süt içimi ve dışkı ile kontamine olmuş sularda yüzmek veya bu suları içmek de enfeksiyona sebep olabilmektedir. Japonya'da 1996 yılının yaz aylarında meydana gelen salgının "daikon sprouts" denilen turp filizi, salatalara ve yemeklere garnitür olarak katılan hatta doğrudan kendisi salata olarak tüketilen bir gıdadan kaynaklandığı sanılmaktadır. Ayrıca bu bakteriye her ikisi de Japonya'ya özgü olan ve elle hazırlanan lokum benzeri bir tatlı ile "O-benta" denilen ve pilav, çiğ balık, turşu, salata, piliç veya domuz eti ile yapılan bir yemekte de rastlanmıştır. ABD'de 1982-1994 yılları arasında görülen *E. coli* O157:H7 salgınlarının kaynağı olarak sırasıyla kıyma, hastalık etmeni taşıyan insan, sebzeler ve ayaküstü restoranlarda tüketilen salatalar, içme ve havuz suları, biftekler, çiğ süt ve elma suyu gösterilmiş, ancak %27,9'unun kaynağı belirlenememiştir. ABD'de görülen diğer bazı salgınların ise kuru salam tüketimi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Çakır, 2000).

## 2.2. Bakteriyel Stres

Bakteriler doğada farklı çevresel streslere maruz kalmaktadırlar. Karşılaştıkları stresler nedeniyle bakteriler yaşamlarını yitirebildikleri gibi adaptasyon mekanizmalarını aktif hale getirerek yaşamlarını devam ettirebilirler. Aktif hale

gelen adaptasyon mekanizmaları ile uzun süre stresli ortamlara dayanabilirler veya bu stresin devam etmesi sonucu yaralanabilir ve ölebilirler. Bakteriler doğada bulunan ışık, oksijen, soğuk, deterjan ve dezenfektanlar gibi streslerin dışında, gıdalarda bulunan asitlik, düşük pH, düşük su aktivitesi ( $A_w$ ), NaCl, ısı, Eh (redoks potansiyeli), bakteriyosinler, rekabetçi flora gibi streslere de maruz kalabilirler. Öldürücü olmayan strese maruz bırakılan mikroorganizmalarda, uygulanan strese karşı direnç artmaktadır. Bu durum genellikle “strese adaptasyon” olarak adlandırılmaktadır. Çeşitli streslere adapte olan patojenler gıdalar içerisinde yaşayabilir. Hatta bu bakteriler mide gibi asidik ortamlara karşı da dirençli hale gelebilirler (Dikici, 2009).

Bakteri hücresi bir stres etmeni ile karşılaştığında, genetik kodunda bir direnç mekanizması var ise ilgili proteinleri üreterek korunmaya çalışır. Stres altında bakterinin DNA'sında transkripsiyon sonucu mRNA oluşmakta ve mRNA da ilgili stresi düzenleyici şok proteini sentezlemektedir. Şok protein, bakterinin fizyolojisini etkileyerek ilgili stres ile mücadele etmesini sağlamaktadır. Sentezlenen protein bir ya da birden fazla stres etmenine karşı etkili olabilmektedir. Her bakterinin karşılaştığı strese karşı aktive ettiği direnç mekanizması aynı ya da farklı olabilmektedir. Ayrıca aynı bakterinin farklı gelişim aşamalarındaki (lag faz, logaritmik faz, durağan faz) aynı strese karşı oluşturduğu direnç mekanizması da değişebilmektedir (Arsene ve ark., 2000; Neidhardt ve VanBogelen, 2000; Cronan, 2002; Yousef ve Courtney, 2003).

Bakterilerde hassas oldukları stres faktörü karşısında membran geçirgenliğinde değişimler, hücre protein yapısında değişimler, ribozomal hasarlar ve nükleik asitlerin olumsuz etkilenmesi gibi hücresel fonksiyonları olumsuz yönde etkileyen değişiklikler meydana gelmektedir (Yousef ve Courtney, 2003).

### **2.3. Glutatyonun Yapısı, Sentezlenmesi ve Fonksiyonları**

Biyolojik sistemlerde yaygın olarak bulunan tiyoller, stresten korunma ile ilgili bileşiklerin en önemli grubunu oluştururlar. GSH, CYS, N-asetil sistein, penisilamin



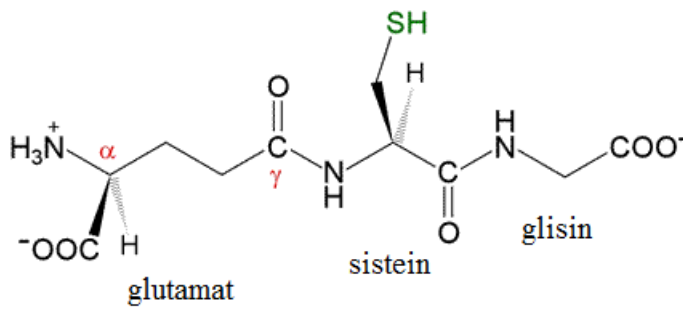
gibi tiyol bileşiklerinin birçoğu antioksidan özelliklere sahiptir. Bu nedenle hücreyi oksidatif hasara karşı koruyabilirler (Kullman ve ark., 2000).

GSH, hemen hemen tüm ökaryotlarda mevcuttur. Ancak prokaryotlarda üretimi sınırlıdır (Masip ve ark., 2006). Prokaryotik hücrelerde başta *E. coli* olmak üzere özellikle Gram-negatif bakterilerde bulunur. Bazı *Streptococcus* ve *Enterococcus* türleri haricinde çoğu Gram-pozitif bakteride bulunmaz. Bununla birlikte bazı Gram-pozitif bakteriler GSH'ü sentezleyebilir ya da besiyerinde bulunan GSH'ü kullanabilir. GSH üretmeyen bazı fakültatif anaerobik ve aerobik bakterilerin aynı fonksiyonları yerine getiren başka düşük molekül ağırlıklı tiyolleri ürettikleri belirlenmiştir (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005). Örneğin yakın zamanda *Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus* ve *Deinococcus radiodurans* tarafından üretilen basillitiyolün GSH ile aynı işlevi yerine getirdiği belirlenmiştir (Newton ve ark., 2009).

Bakteri hücrelerinde esas olarak tiyol-disülfit dengesi tarafından korunan redoks durumu [ $E_0' = (-)240\text{mV}$ ] nedeniyle GSH, serbest radikal aracılı hücre zararlarına ve oksidantlara karşı korumada yer alan tüm hücre sistemlerinin başlıca bileşenidir (Meister, 1983; She ve ark., 1997; Aslund ve ark., 1997). GSH oksidatif hasara karşı hücreleri korumak için hücre içi redoks homestazını dengede tutmaya yardımcı olur (Jones, 2002).

GSH, antioksidatif ve bağışıklık güçlendirici olmasının yanı sıra biyolojik sistemlerde hücrel detoksifikasyon faaliyetleri için farklı rollere de sahiptir (Wu ve ark., 2004). GSH, hipoklorik asit ve monokloroamin gibi klor bileşikleri ile  $\text{H}_2\text{O}_2$  ya da alkil hidroperoksit gibi peroksitlerin neden olduğu oksidatif stres ile ozmotik şok, asidite gibi çevresel streslere karşı korumada kritik rol oynamaktadır. GSH aynı zamanda hücre içi potasyum seviyelerinin düzenlenmesinde ve sitoplazmada anormal protein disülfitlerin oluşumunun engellenmesinde görev almaktadır (Masip ve ark., 2006). Ayrıca bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev almasının yanısıra aminoasitlerin taşınması, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynamaktadır (Ziegler, 1985).

GSH'un bakterilerdeki konsantrasyonu 0,1-10 mM aralığında değişmektedir (Masip ve ark., 2006). Glutamat, CYS ve glisin olmak üzere üç aminoasitten oluşan GSH (Şekil 2.1), bir tiyol grup, bir amin ve iki karboksilden dolayı sulu solüsyonlar ve polar çözücülerde yüksek çözünürlüğe sahiptir (Masip ve ark., 2006).  $\gamma$ -glutamil bağının varlığı hücre içi peptidazlar tarafından tripeptidin bozulmasını engeller ve CYS'in sülfidril grubu bir elektron verici gibi davranabilir; böylece GSH'a indirgeyici özellikler verir ve serbest radikalleri uzaklaştırabilir (Demirkol ve Ercal, 2012).



Şekil 2.1. GSH molekülü (Anonymous, 2013a).

GSH sisteminin primer enzimleri;  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz, glutatyon sentetaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidazdır. GSH iki adımda sentezlenir:

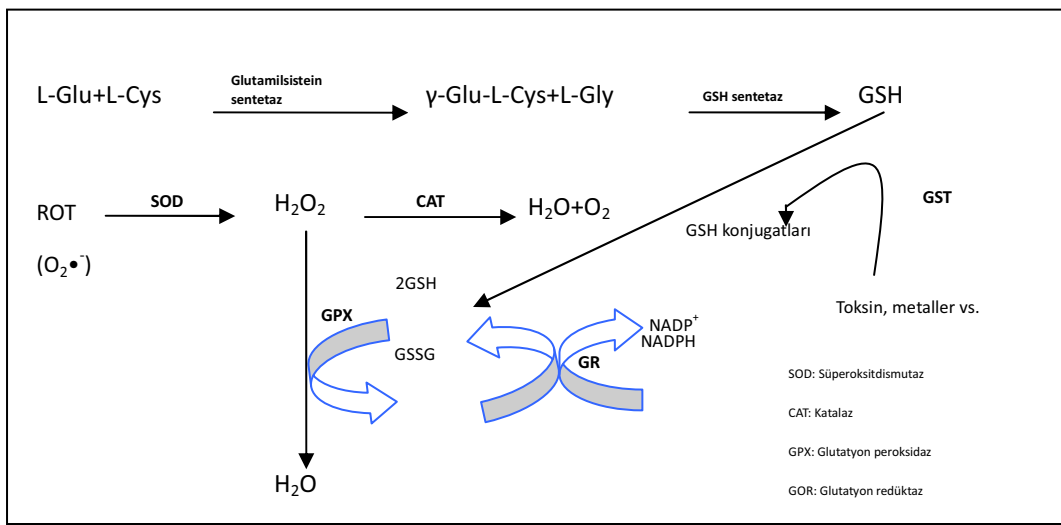
- (1)  $L\text{-Glu} + L\text{-Cys} + \text{ATP} \leftrightarrow \gamma\text{-Glu-Cys} + \text{ADP} + \text{P}_i$
- (2)  $\gamma\text{-Glu-Cys} + \text{Gly} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{GSH} + \text{ADP} + \text{P}_i$

Yukarıda gösterilen 1. reaksiyonu  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz enzimi katalize eder. Bu enzim glutamik asit ve CYS'den  $\gamma$ -glutamilsistein oluşturur. İkinci aşamada ise glutatyon sentetaz enzimi  $\gamma$ -glutamilsisteine glisin ekler ve böylece GSH oluşur (Masip ve ark., 2006).

GSH içerdiği gamma ( $\gamma$ ) bağı nedeniyle zor parçalanabilen bir moleküldür. GSH'u parçalayabilen tek enzim  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz enzimidir. Öncelikle  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz, GSH'u  $\gamma$ -glutamil ve L-sisteinil-glisin şeklinde ayırır. Daha sonra L-

sisteinil-glisin ise dipeptidaz enzimi vasıtasıyla hücre tarafından absorbe edilen CYS ve glisine parçalanır (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005).

GSH dokularda birbiriyle dengede olan, indirgenmiş (redükte) GSH ve okside glutatyon (GSSG) olarak iki formda bulunur (Arrick ve Nathan, 1984). GSH'un oksidasyonu ile tiyil radikali ( $GS\bullet$ ) oluşur.  $GS\bullet$  diğer bir  $GS\bullet$  ile birleşerek GSSG'ü oluşturur. GSSG da daha sonra NADPH'i hidrojen donörü olarak kullanmak suretiyle tekrar GSH'a indirgenir (Şekil 2.2) (Demirkol ve Ercal, 2012).



Şekil 2.2. GSH'un sentezi (Demirkol ve Ercal, 2012).

*E. coli* hücrelerinde GSH'un %99,5'inin indirgenmiş durumda bulunduğu belirlenmiştir. GSSG konsantrasyonunun toplam hücre içi GSH konsantrasyonunun %0,17-0,33'ünü oluşturduğu, GSH/GSSG oranının ise 300-600 aralığında olduğu tespit edilmiştir (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005). Masip ve ark. (2006) tarafından ise *E.coli*'de GSH/GSSG oranının 200 civarında olduğu bildirilmiştir. Oksidan aracılı doku hasarları sonucunda GSSG miktarı artmaktadır. GSSG, serbest sülfidril gruplarıyla kolayca reaksiyona girdiği için canlı hücre için oldukça toksiktir (Meister ve Anderson, 1983).

GSH formlarının konsantrasyonu ve etkinliği onun sentez, ayrışma, taşıma, oksidasyon ve indirgenmesi arasındaki dinamik dengeye bağlıdır. Bu nedenle hakim olan reaksiyona göre GSH formu değişmekte olup bu durum hücrel olaylara ve

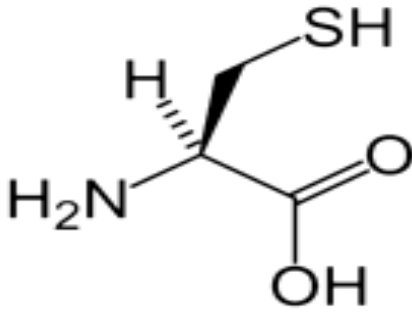
çevresel koşullara göre değişmektedir. Buna göre GSH konsantrasyonu ve GSH formları arasındaki oran stres altında değişkenlik gösterebilmektedir (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005).

*E. coli*'de GSH'un hücre içi seviyesinde logaritmikten durağan faza geçiş, amonyum tüketimi, anaerobik koşullar, asetat ve rifampisine maruz kalma gibi durumlarda önemli değişiklikler meydana geldiği belirlenmiştir. *E. coli* dahil bazı bakterilerin düşük düzeylerde de olsa hücre dışına GSH salgıladıkları tespit edilmiştir. Bu konuda çok az bilgi bulunmakla birlikte, hücre dışı GSH'un hücreyi toksik maddelerden korumada rol oynayabileceği düşünülmektedir. Stres faktörleri hücre dışı GSH seviyesinde önemli değişikliklere neden olabilmektedir (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005). Özellikle hiperozmotik şokun *E. coli*'de hücre dışı GSH seviyesinin geçici olarak azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Smirnova ve ark., 2001a).

Murata ve Kimura (1982) tarafından yapılan bir çalışmada GSH sentezleyemeyen *E. coli* B mutantları izole edilmiştir. Bu mutantlar çok düşük bir  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz aktivitesine sahiptir. Ana suş ile mutantlar arasında minimal ortamda gelişme açısından kayda değer farklılıklar gözlenmezken GSH sentezleyemeyen mutantlar toksik bileşiklere karşı ana suştan daha duyarlı bulunmuştur. Ayrıca GSH sentezleyemeyen mutantlar için lizozoma karşı yüksek bir duyarlılık tespit edilmiştir. Bu nedenle hücre duvarı bütünlüğünün korunmasında GSH'un önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir.

#### **2.4. Sistein**

CYS pekçok proteinin yapısında ve katalitik aktivitesinde önemli fonksiyonları yerine getiren, yapısında kükürt içeren esansiyel olmayan bir aminoasittir (Şekil 2.3). Çoğu organizmada CYS içeren moleküller olan GSH ve tioredoksin, oksidatif strese karşı koruma ve hücre içi indirgeyici bir ortam sağlanması açısından majör bir rol oynamaktadır. CYS kalıntıları arasında disülfid bağlarının oluşumu OxyR gibi bakteriyel transkripsiyonel regülatörlerin aktivasyonunda kritik adımdır (Lithgow ve ark., 2004).



Şekil 2.3. CYS molekülü (Anonymous, 2013b).

Metabolik dengesizliğin bir sonucu olarak hücre içi CYS konsantrasyonu arttığı zaman bu aminoasit, hücrel makromoleküllere özellikle de DNA'ya zarar veren toksik hidroksil radikal ( $\text{OH}\cdot$ ) oluşturmak için  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığında Fenton reaksiyonu tarafından katalizlenmesinden dolayı üç değerlikli demirin indirgenmesine dahil olabilmektedir. Bu nedenle normal koşullar altında bakteriler ve diğer hücreler çok düşük bir hücre içi CYS havuzu ( $<200 \mu\text{M}$ ) muhafaza etmektedirler ve GSH gibi CYS'in toksik olmayan bir rezerv formuna ihtiyaç duymaktadırlar (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005).

GSH'un  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz enzimi tarafından yıkımı sonucu açığa çıkan CYS hücre içine aktarılmaktadır (Lu, 1999). Hücre içi CYS'in büyük kısmı GSH'a yeniden katılır, buna karşı hücre gereksinimine bağlı olarak diğer kısmı protein sentezine katılmaktadır (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005).

CYS ve metyonin gibi kükürt içeren aminoasitler, GSH sentezi için temel bileşenlerdir. Çünkü  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz için CYS'in kullanılabilirliği sınırlıdır. Bu nedenle, bu sülfür aminoasitlerin yeterli miktarda temin edilmesi normal hepatik GSH seviyesinin korunması için çok önemlidir (Beatty ve Reed, 1981).

Loewen (1979) tarafından yapılan bir çalışmada minimal ortamda gelişen *E. coli* hücrelerinin logaritmik fazda bazal seviyede GSH içerdiği, hücreler durağan faza ulaştığında ise GSH miktarının yaklaşık altı kat ( $5 \text{ pmol/ml}$ ) arttığı tespit edilmiştir. Logaritmik fazdaki hücrelere sadece CYS ilavesi aynı cevabın ortaya çıkmasına

neden olduğundan, GSH sentezinde kullanılabilir CYS miktarının hücre içi GSH miktarındaki artış üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir.

## 2.5. Oksidatif Stres

Yeterli besinle birlikte optimal gelişme sıcaklığı, pH, oksijen seviyeleri ve çözülmüş madde konsantrasyonları sağlandığı zaman mikroorganizmalar maksimum seviyede çoğalırlar. Bu parametrelerdeki herhangi değişiklik maksimum çoğalma seviyesini etkiler ve böyle bir durumda mikroorganizma için çevresel bir stresten bahsedilebilir (Moat ve ark., 2002).

Oksidatif stres, süperoksit anyon ( $O_2^{\cdot-}$ ),  $OH^{\cdot}$  ve  $H_2O_2$  gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) organizmaya etkisinden kaynaklanır. Yüksek reaktiviteleri nedeniyle ROT, bütün biyolojik makromoleküllere zarar verebilir ve hücre için gizli bir tehdittir (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005).

Elektron transfer zinciri tarafından enerji üretimi, triplet oksijenin katalitik spin çiftine bağlıdır. Bu süreçte hücrenin DNA, protein ve lipit bileşenleri için toksik olan oksijen türleri enzimatik veya kendiliğinden oluşan kimyasal reaksiyonlar sonucu meydana gelirler. Aşağıda gösterilen 1. reaksiyonda moleküler oksijen ile oksidatif enzimlerin reaksiyonu sonucu  $O_2^{\cdot-}$  oluşmaktadır.  $O_2^{\cdot-}$  genellikle DNA ve proteinler ile tepkimeye girmez. Ancak  $OH^{\cdot}$  ve  $H_2O_2$  gibi daha yüksek reaktiviteye sahip oksijen türevleri üretmek için enzimatik veya kendiliğinden gelişen kimyasal reaksiyonlar ile etkileşebilir (2). İndirgenmiş FAD'ın ya da indirgenmiş flavoprotein otooksidasyonu  $H_2O_2$  meydana getirir (3). NADPH oksidaz enzimi  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$  oluşturabilir (4).  $O_2^{\cdot-}$  çeşitli hücrel bileşiklerden  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$ , yi serbest bırakır ve sonuçta Fenton reaksiyonu aracılığıyla  $OH^{\cdot}$ lerinin oluşumuna neden olabilir (5). Nitrik oksit ile  $O_2^{\cdot-}$ 'in reaksiyonundan peroksinitrit anyonu oluşur (6). Peroksinitrit çeşitli proteinler ile yüksek derecede reaktiftir. Proteinlerin metyonin, CYS, tirozin ve triptofan kalıntıları hassastır. Peroksinitrit ayrıca biyolojik bileşikler ile son derece reaktif olan diğer toksik türevlerin oluşumuna da neden olur. Çoğu aerobik organizmalar  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$ 'in toksisitesinden süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzimleri ile korunur (7). Peroksidazlar ayrıca GSH ve askorbik

asit gibi organik indirgeyiciler tarafından  $H_2O_2$ 'in indirgenmesini de katalize edebilir (8) (Moat ve ark., 2002).

- (1)  $O_2 + e^- + \text{oksidatif enzimler} \longrightarrow O_2^{\cdot-}$
- (2)  $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow OH^- + OH\cdot + O_2$
- (3)  $FADH_2 + O_2 \longrightarrow FAD + H_2O_2$
- (4)  $NADPH + H^+ + 2O_2 \longrightarrow NADP^+ + O_2^{\cdot-} + H_2O_2$
- (5)  $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$
- (6)  $O_2^{\cdot-} + NO\cdot \longrightarrow ONOO^-$
- (7)  $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$  (SOD)
- (7)  $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$  (katalaz)
- (8)  $H_2O_2 + 2RH \longrightarrow 2H_2O + 2R_{ox}$

*E. coli*'nin aerobik koşullarda gelişmesi sırasında ROT hücreler tarafından sürekli üretilir. Bu ROT'nin üretilmesi ya da ortadan kaldırılması arasında bir dengesizlik olduğu zaman oksidatif stres meydana gelir.  $OH\cdot$  radikalinin birikimi DNA ve protein hasarı, lipid peroksidasyonu ve disülfüt bağı oluşumuna neden olabilir. Oksidatif strese yanıt olarak; bakteriler, çeşitli indüklenebilir genetik sistemlerini kullanarak oluşan hasarı onarmak için harekete geçer (Bearson ve ark., 2009).  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$ 'ler nedeniyle oluşan strese yanıt olarak, antioksidan aktivitelerin ifadesine neden olan OxyR ve SoxRS transkripsiyon faktörleri tarafından oksidatif strese karşı adaptif yanıt düzenlenir (Masip ve ark., 2006). *E. coli*'de SoxRS ve oxyR regülonları  $O_2^{\cdot-}$ , nitrik oksit ve peroksidi uzaklaştırmak için gerekli enzimlerin üretimini düzenler (Coşansu ve Ayhan, 2009).

## 2.6. Isı Şoku

Mikroorganizmalar optimum gelişme için ihtiyaç duydukları sıcaklıklara göre termofil, mezofil, psikrofil veya psikrotrof olarak adlandırılırlar. Patojen bakterilerin pek çoğu mezofilik karakterde olup 20-40°C aralığında gelişirler. Sıcaklık 30°C'den 42°C'ye yükseldiğinde *E. coli* ve diğer pek çok bakteri ısı şoku proteinleri (HSPs) olarak adlandırılan proteinleri daha fazla sentezlemektedir. Bu HSPs'lerin çoğu daha yüksek sıcaklıklarda hücrenin gelişebilmesi ya da hayatta kalması için gereklidir. *E.*

*coli*'de ısı şoku ile indüklenen yaklaşık 50 farklı protein tanımlanmıştır (Moat ve ark., 2002).

Yapılan çalışmalarda, gelişmekte olan *E. coli*'de sıcaklığın 30°C'den 42°C'ye hızla çıkarılmasının glutatyon redüktaz aktivitesinin engellenmesine, hücre içi GSH konsantrasyonunun azalmasına ve besiyerindeki konsantrasyonun artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık optimum sıcaklıkta gelişenlere kıyasla yüksek sıcaklıklara adapte olmuş hücrelerde hem hücre içi hem de hücre dışı GSH seviyelerinin önemli düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir (Suzuki ve ark., 1987; Smirnova ve ark., 2001b).

## 2.7. Ozmotik Stres

Bakteriler gıdalarda yüksek konsantrasyonda şeker, tuz veya kurutulmuş ürünlerde olduğu gibi ozmotik streslere maruz kalmaktadır. Mikrobiyel gelişmede çözünenlerin konsantrasyonu (tuzlar, iyonlar, metabolitler vb.) kritik bir rol oynamaktadır. Pek çok bakteride hipertonic veya hiperozmotik koşullar sitoplazmadan su kaybı sonucu hücrenin büzülmesine (plazmoliz) neden olmaktadır (Moat ve ark., 2002).

Evrim süresince, bakteriler ozmotik basıncın yüksek olduğu ortamlarda gelişmeyi ve enzimatik aktiviteleri engellemeyen, hücre içi ozmolit birikiminin ana fonksiyonu olan turgor basıncı düzenleyici sistemler geliştirmişlerdir. Bu nedenle, süperozmotik strese yanıtın başlangıç aşamasında *E. coli* hücreleri, K<sup>+</sup> iyonlarının büyük miktarda birikimi yoluyla turgor gerilimini eski haline getirirler (Smirnova ve ark., 2001a).

Hücre içi K<sup>+</sup> konsantrasyonunun yüksek olması bazı enzimlerin fonksiyonlarını engelleyebilmektedir. Bu nedenle ozmotik strese hücresel yanıtın daha sonraki aşamalarında trehaloz, prolin ve betain ile K<sup>+</sup>'un yer değiştirmesi söz konusudur (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005).

GSH, K<sup>+</sup>'un kanalların dışına aktarımının düzenlenmesinde yer almasına rağmen GSH'un ozmotik adaptasyon üzerine etkisinin, K<sup>+</sup> tutulmasındaki değişiklik nedeniyle olmadığı gösterilmiştir (McLaggan ve ark., 1990). Bu noktada GSH'un



ozmotik şok boyunca tam rolü henüz kesin olarak anlaşılamamış olmakla birlikte antioksidan fonksiyonu ile ilişkili olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır. Özellikle *E. coli*'deki ozmotik şoka SoxS ve SodA'nın indüksiyonunda artış gibi oksidatif stresin karakteristik reaksiyonları eşlik etmektedir (Smirnova ve ark., 2000). Bu nedenle, GSH'un ozmotik şoktan kaynaklanan bir oksidatif stres yanıtının parçası olduğu ve buna bağlı olarak da ozmotik basıncın yüksek olduğu ortamlarda bakterinin canlılığını sürdürmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Smirnova ve ark., 2001a).

## 2.8. Düşük pH

Bazı bakteriler oldukça düşük pH değerlerinde optimum gelişirken bazıları da alkali pH değerlerinde en iyi gelişim göstermektedir. Ancak bakterilerin çoğu, özellikle de patojenler nötre yakın pH değerinde gelişmeyi tercih etmektedir ve nötrofilik olarak adlandırılmaktadır. Asidik pH'da mikroorganizmaların asidik metabolitleri nötrallere ya da nötral metabolitleri alkali ürünlere çevirebilen enzimleri ürettikleri bilinmektedir. Bu enzimlere örnek olarak *E. coli* tarafından üretilen glutamat dekarboksilaz, lisin dekarboksilaz ve arjinin dekarboksilaz verilebilir. Bu enzimlerin üretimi asidik pH değerlerinde maksimum seviyeye ulaşmaktadır (Moat ve ark., 2002).

GSH'un asidik koşullara maruz bırakılan hücreyi korumada rolü olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır. *E. coli*'de  $K^+$  aktarım kanalları KefB ve KefC, GSH tarafından engellenmektedir. GSH'un yokluğunda ise  $K^+$  hücre dışına sızmaktadır.  $K^+$ 'un dışa akışı sitoplazma pH'sındaki düşüş ile bağlantılı bulunmuştur (Ferguson ve Booth, 1998). Sitoplazmik pH homeostazının  $Na^+$  ve  $K^+$ 'un taşınmasına bağımlı olduğu ileri sürülmektedir (Booth, 1985; 1999). Bu nedenle düşük pH'dan korunma üzerine GSH'un etkisinin onun  $K^+$  düzenlenmesine katılımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Masip ve ark., 2006).

Bu hipotezle uyumlu olarak *E. coli*'de düşük pH koşulları altında Kdp'nin ( $K^+$  tutulum sistemi) ekspresyonunda artış (Asha ve Gowrishankar, 1993; Malli ve Epstein, 1998) ve GSH sentezleyemeyen suşda (*gshA* mutant) düşük  $K^+$

konsantrasyonlu besiyerinde sitoplazmik pH'da azalma gözlenmiştir (Ferguson ve Booth, 1998). Bu nedenle, gshA mutantın düşük pH'ya hassasiyetinin hücre içi K<sup>+</sup> miktarını optimum seviyede tutamamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Masip ve ark., 2006).

## 2.9. Klor Bileşikleri

Klor bileşikleri gıda endüstrisinde dezenfektan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Gomez-Lopez ve ark., 2005; Inatsu ve ark., 2005). Asitlendirilmiş NaCl ya da klor dioksit protein ve nükleik asit sentezini engelleyerek ve peroksidasyon yoluyla sitoplazma membranının bütünlüğünü bozarak bakterileri inaktive etmektedir (Scatina ve ark., 1985).

GSH, hipoklorik asit ve monokloroaminden daha az zararlı maddeler üretmek için bunların klor bileşenleri ile direk reaksiyona girerek *E. coli*'yi korumaktadır (Masip ve ark., 2006). Bu reaksiyonların kendiliğinden gerçekleştiği ve herhangi bir enzimin katalize etmediği belirlenmiştir (Chesney ve ark., 1996). Ayrıca hipoklorik asitin oksidatif strese H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e benzer bir yanıt ortaya koyduğu gösterilmiştir (Dukan ve Touati, 1996; Dukan ve ark., 1999).

Hipoklorit sitoplazma membranına etki etmez, ancak DNA, protein ve lipitlere saldıran seçici olmayan okside edici ajan olarak davranır (Luppens ve ark., 2003). Lipitler ile direkt etkileşimine ek olarak hipoklorit aynı zamanda GSH'ü da oksitler. Kloritin aksine hipoklorit yoluyla GSH'nun oksidasyonu daha yavaştır ve sülfonamidlerin oluşumu ile sonuçlanan GSSH evresinin ötesine geçer (Fu ve ark., 2002). Ayrıca hipoklorit nükleik asitlerin bozulmasına, lipitlerde doğrudan hasara ve toksik kloraminlerin oluşumuna neden olur (Hawkins ve Davies, 2002; Hawkins ve ark., 2002).

Chesney ve ark. (1996) tarafından GSH (-) *E. coli* suşu (JTG10) ve başka bir izogenik GSH (+) *E. coli* suşu (AB1157) üzerinde çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucuna göre GSH (-) hücreler, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve klor bileşenleri tarafından öldürülmeye karşı yaklaşık iki kat daha hassas bulunmuştur.

## 2.10. Hidrojen Peroksit

Daha önceleri sadece antiseptik olarak kullanılan  $H_2O_2$  antimikrobiyel ajan olarak oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptir.  $H_2O_2$  bakteri, küf, maya, virüs ve sporlar üzerinde etkilidir ve bu etki aralığı oldukça geniştir (Sander ve Wilson, 1999).

Anaerobikler katalaz üretememelerinden dolayı peroksit uygulamalarına karşı daha duyarlıdır. Gram-negatif bakterilere karşı etkileri ise Gram-pozitif bakterilerden daha fazladır. Peroksitler ve perasetik asitler seyreltildiği zaman  $CO_2$ ,  $O_2$  ve suya dissosiyeye olurlar ve böylece etkilerini kaybedebilirler (Gronholm ve ark., 1999; Block, 2001).

$H_2O_2$ 'nin antimikrobiyal etkisi özellikle  $O_2^- \cdot$ , singlet oksijen ve  $OH \cdot$ 'leri gibi güçlü oksidanları meydana getirmesinden kaynaklanmaktadır. Bu ROT ise hücrelerde enzim, membran bileşenleri ve DNA'da geri dönüşümsüz olarak hasarlara sebep olmaktadır (Juven ve Pierson, 1996).

Yapılan bir çalışmada GSH (-) *E. coli* hücrelerinin, logaritmik çoğalma aşamasında  $H_2O_2$  ve kümen hidroperokside karşı hassasiyetlerinde artış olmadığı tespit edilmiştir (Greenberg ve Demple, 1986). Bununla birlikte, gelişemeyen gshA mutantların doğal suş hücreleri ile kıyaslandığında  $H_2O_2$ 'e karşı daha hassas oldukları görülmüştür (Chesney ve ark., 1996).

CYS yada sistinin *E. coli* hücreleri üzerine  $H_2O_2$ 'in toksik etkisini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca sistin varlığında  $H_2O_2$ 'nin yüksek toksitesisi, membran fonksiyonlarında bozukluklar ve DNA onarımı ve oksidanların nötralizasyonundan sorumlu olanlarda dahil olmak üzere genlerin ekspresyonunun engellenmesi ile sonuçlandığı belirtilmiştir (Smirnova ve ark., 2005).

## **BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **3.1. Materyal**

*Esheria coli* O157:H7 saf kültürü Sakarya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Stok kültür %15 gliserol içeren Tryptic Soy Broth (TSB; Merck, Darmstadt, Germany) besiyerinde -20°C’de muhafaza edilmiştir.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Kullanılan malzeme ve cihazlar**

*Esheria coli* O157:H7’nin çoğaltılması için TSB (Merck), Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth; Merck); sayımı için Brain Heart Infusion Agar (BHI, Merck) ve Sorbitol McConkey Agar (SMAC, Merck) besiyerleri kullanılmıştır. Seyreltme için Maximum Recovery Diluent [MRD; 1 g et peptonu (Merck), 8,5 NaCl (Merck), 1 l destile su] kullanılmıştır.

Streslerin uygulanmasında hazırlanan besiyerinin bileşimine katılan HCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve sodyum hipoklorit Merck’den sağlanmıştır.

HPLC analizinde kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında gerekli olan TrisHCl, Borate, Serine, DETAPAC, NaOH, glasiel asetik asit, o-Fosforik asit, NPM, GSH, CYS Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)’den, asetonitril Merck’den ve DTT Biomatik Corporation (Delaware, USA)’dan temin edilmiştir.

Kullanılan başlıca ekipmanlar; Daihan Scientific Wise Clave otoklav, Hanna Instruments pH 221 microprocessor pH metre, Elektro-Mag M 6040 BP etüv, Hettich

Universal 320R soğutmalı santrifüj cihazı, Bandelin Sonorex su banyosu, IKA MS3 Basic vortex, Eppendorf Research plus mikropipet, Wiggen Hauser homogenizer, AND GR-200 hassas terazi, ChromofilXtra Pet 45/25 0,45 µm filtre, Shimatzu Model HPLC cihazıdır (LC 20-AT model pompa, RF-10-AXL model floresansdedektör ( $\lambda_{ex}=330$  nm ve  $\lambda_{em}=376$ nm), SIL-20A Otosampler, HPLC Column ODS1 C<sub>18</sub> 5µm çapında kolon, CTO-10 AS vanp kolon fırını).

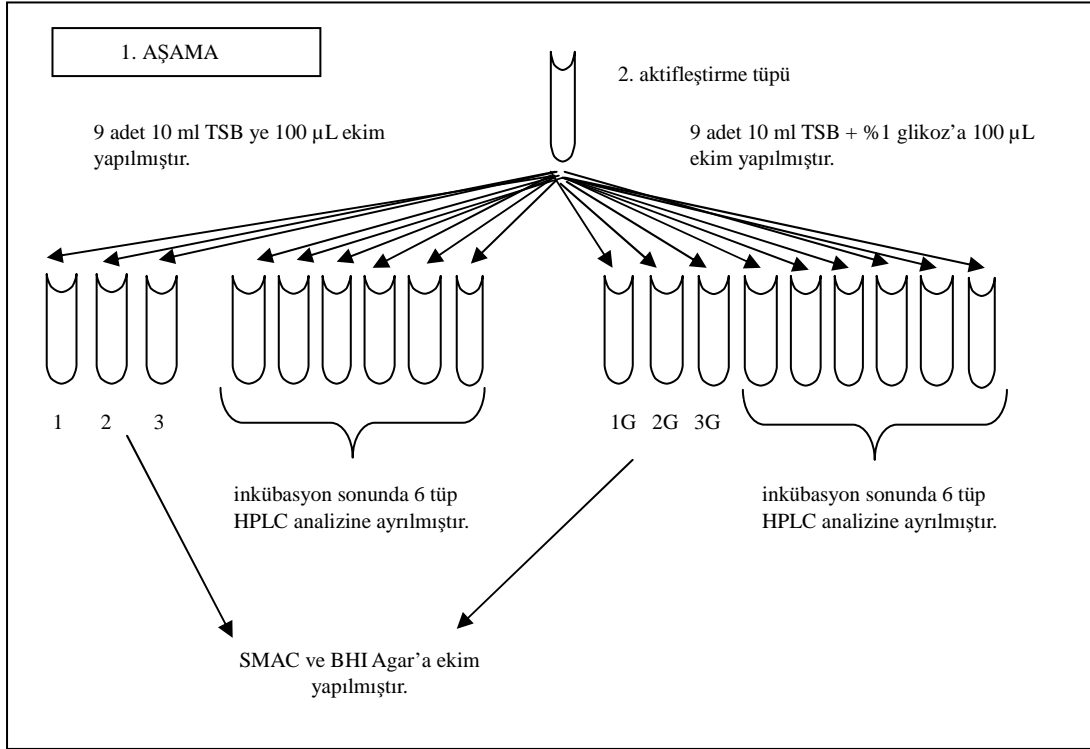
### **3.2.2. *Escherichia coli* O157:H7 suşunun aside adapte edilmesi**

Aktifleştirmek için stok kültürden TSB besiyerine %1 oranında aşılınmış ve 37°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Aynı işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.

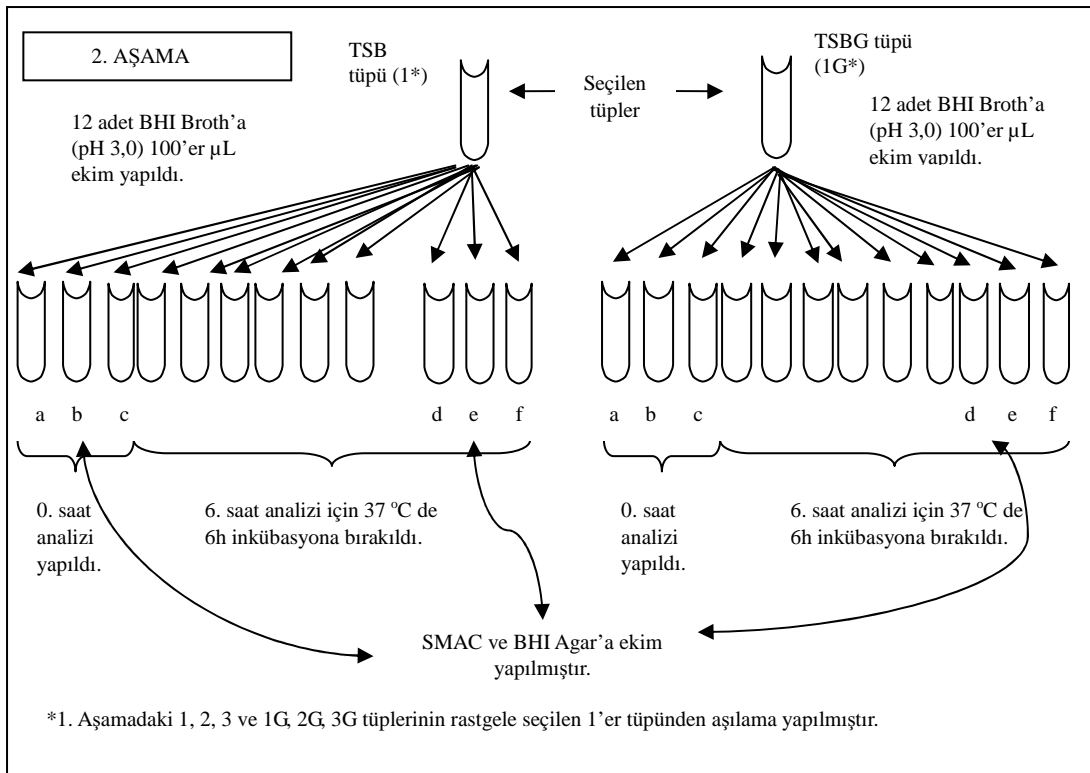
Asit adaptasyonu denemesi için %1 glikoz ilave edilmiş 10 ml TSB besiyerine (TSBG) aktif kültürden %1 oranında aşılama yapılmış ve 37°C’de 18 saat inkübe edilmiştir (Dlamini ve Buys, 2009). Kontrol olarak TSB besiyerine aşılama yapılmış ve aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her iki gruptan 6’şar tüp HPLC (yüksek basınç sıvı kromatografisi) analizi için ayrılmıştır (Şekil 3.1). İnkübasyon sonunda TSBG ve TSB kültürlerinden rastgele seçilen 1’er tüpten pH’sı 1 N HCl ile 3,0’a ayarlanmış 10’ar ml BHI Broth bulunan tüplere 100 µl (%1) aşılınmış ve 37°C’de 6 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.2).

İnkübasyonun başında (0. saat) ve sonunda (6. saat) BHI Agar ve SMAC Agar besiyerlerine ekim yapıp 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Seyreltme için MRD kullanılmıştır. Ayrıca pH ölçümü yapılmış ve her bir gruptan 2’şer tüp (20 mL) HPLC analizi için ayrılmıştır.

Ayrıca 1. aşamadaki 1, 2, 3 ve 1G, 2G, 3G tüplerinden MRD’ye dilüsyondan sonra BHI Agar ve SMAC Agar besiyerlerine ekim yapıp 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Aktifleştirilen *Esherichia coli* O157:H7'nin TSB ve TSBG'ye aşılması.



Şekil 3.2. TSB ve TSBG kültürlerinden BHI Broth'a (pH 3,0) aşılama.

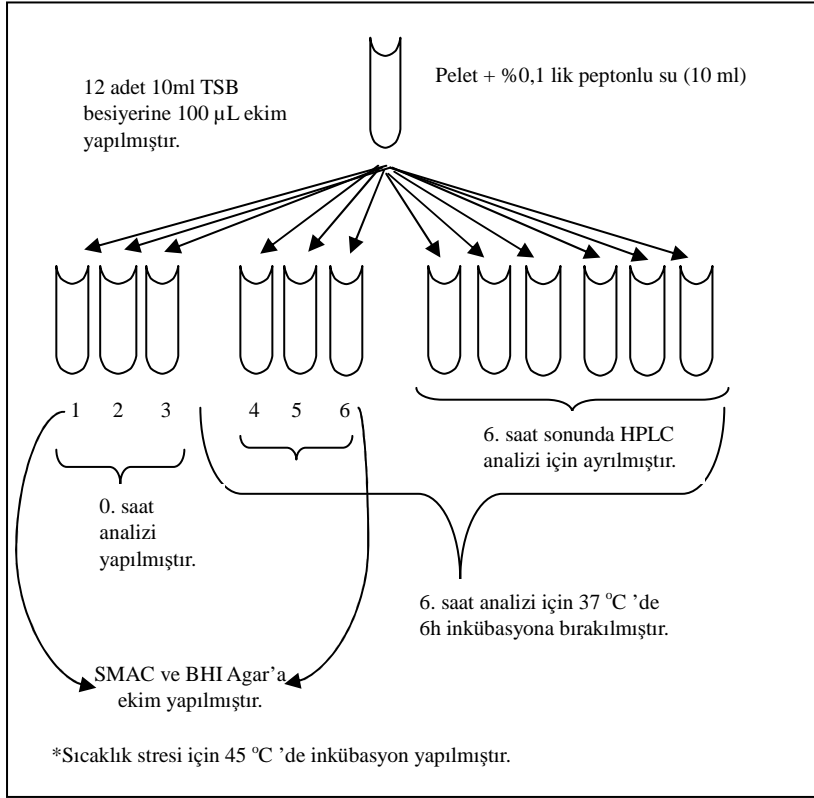
### 3.2.3. pH, sodyum klorür, sıcaklık, sodyum hipoklorit ve hidrojen peroksit streslerinin uygulanması

İnokulumun hazırlanması için 10 ml TSB besiyerine aşılansarak iki kez aktiveştirilmiş *E. coli* O157:H7 kültürü 6000 devir/dakika'da 4°C'de 10 dakika süreyle santüföjlenmiştir. Santüföjlemeden sonra süpernatant ayrılmış, geriye kalan pelet 2 kere %0,1'lik steril peptonlu su ile yıkanmıştır. Son olarak elde edilen pelet %0,1'lik steril peptonlu su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

pH stresi için 1 N HCl ile pH değeri 3,0'a ayarlanmış TSB kullanılmıştır. Yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan inokulumdan 10 ml TSB bulunan tüplere 100 µl (%1) aşılansmış ve 37°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. Sıfırncı ve 6. saatlerde pH ölçümü yapılmış ve MRD kullanılarak yapılan seyreltilerden BHI Agar ve SMAC Agara ekim yapılmıştır. Altıncı saat örneklerinden HPLC analizi için ayrılmıştır (Şekil 3.3).

NaCl stresi için hazırlanan inokulumdan %5 ve %10 NaCl ilave edilmiş 10 ml TSB tüplerine 100 µl (%1) aşılansmış ve 37°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0. ve 6. saatlerinde pH ölçümü yapılmış ve MRD kullanılarak yapılan seyreltilerden BHI Agar ve SMAC Agara ekim yapılmıştır. Altıncı saat örneklerinden HPLC analizi için ayrılmıştır (Şekil 3.3).

Sıcaklık stresi için hazırlanan inokulumdan 10 ml TSB bulunan tüplere 100 µl (%1) aşılansmış ve 45°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. Sıfırncı ve 6. saatlerde pH ölçümü yapılmış ve MRD kullanılarak yapılan seyreltilerden BHI Agar ve SMAC Agara ekim yapılmıştır. Altıncı saat örneklerinden HPLC analizi için ayrılmıştır (Şekil 3.3).

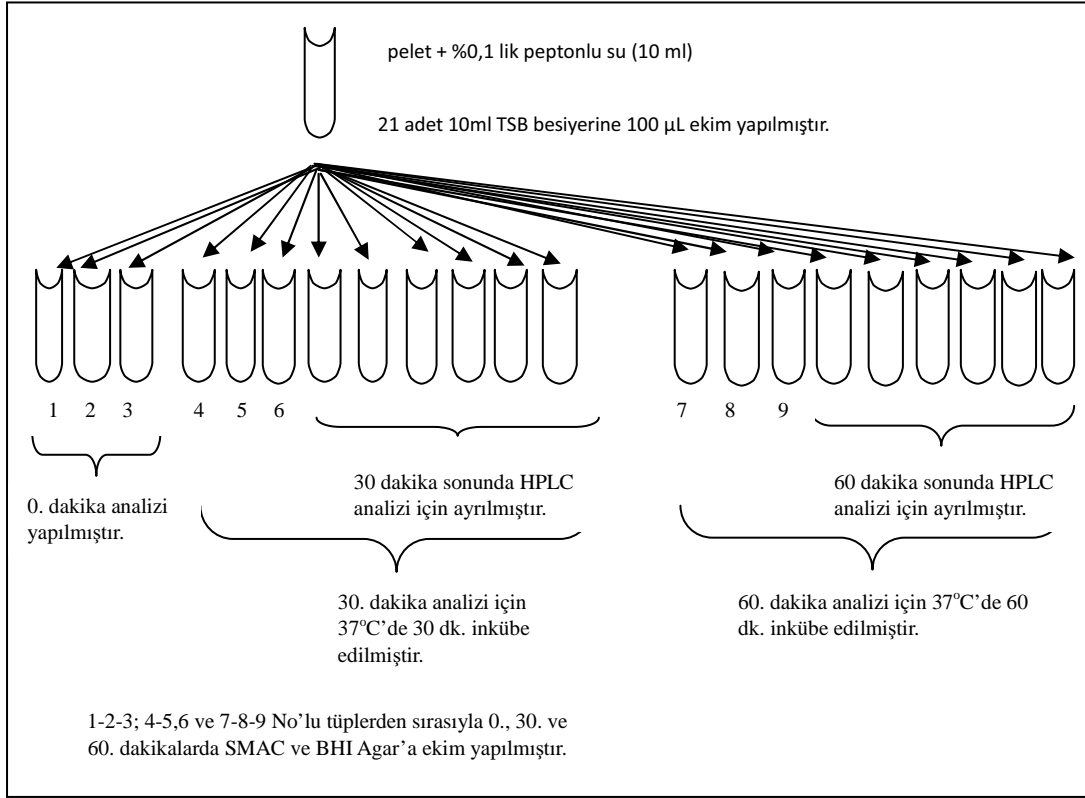


Şekil 3.3. pH, sodyum klorür ve sıcaklık stresleri için TSB'ye aşılama.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresi için hazırlanan inokulumdan %1 ve %2,5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren 10'ar ml TSB besiyerine 100 µl (%1) aşılanmış ve 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Sıfırncı, 30. ve 60. dakikalarda pH ölçümü yapılmış ve MRD kullanılarak yapılan seyreltilerden BHI Agar ve SMAC Agar'a ekim yapılmıştır. Otuzuncu ve 60. dakika örneklerinden HPLC analizi için ayrılmıştır (Şekil 3.4).

Sodyum hipoklorit stresi için hazırlanan inokulumdan %0,05 ve %0,5 sodyum hipoklorit içeren 10'ar ml TSB besiyerine 100 µl (%1) aşılanmış ve 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Sıfırncı, 30. ve 60. dakikalarda pH ölçümü yapılmış ve MRD kullanılarak yapılan seyreltilerden BHI Agar ve SMAC Agara ekim yapılmıştır. Otuzuncu ve 60. dakika örneklerinden HPLC analizi için ayrılmıştır (Şekil 3.4). Tüm stresler için kontrol grubu olarak TSB besiyerine (pH 7,3±0,2) aşılama yapıp aynı işlemler uygulanmıştır.





Şekil 3.4. Sodyum hipoklorit ve hidrojen peroksit stresleri için TSB'ye aşılama.

### 3.2.4. HPLC analizi

#### 3.2.4.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

*Serin borat tampon (SBB) çözeltisi:* 1 litre SBB hazırlamak için; 15,74 g TrisHCl, 0,618 g Borate, 0,525 g Serine, 0,393 g DETAPAC (Di Etilen tri Amin Penta Asetik Asit) 1 litre suyla karıştırılarak NaOH ile pH 7,0'a ayarlanmıştır. Bu çözelti numunenin hazırlanmasından HPLC analizine kadar geçen sürede oksidasyonu önlemek amacıyla kullanılmıştır.

*Mobil faz:* 1 litre mobil faz hazırlamak için; 700 ml Asetonitril, 300 ml ultra saf su, 1ml glasiel asetik asit, 1 ml o-Fosforik asit karıştırılmıştır.

*N-(l-pyrenyl)-maleimide (NPM) çözeltisi:* 250 ml NPM çözeltisi hazırlamak için; 0,075g NPM 250 ml asetonitrilde çözülerek hazırlanan bu çözelti, tiyol bileşiklerini

floresans ışına yapan bileşiklere dönüştürerek floresans dedektörde okunmalarını sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

*HCl çözeltisi:* 50 ml ultra saf suda 10 ml 12 M HCl çözülerek hazırlanan 2N HCl çözeltisi türevlendirme sonrası oksidatif reaksiyonun durdurulması amacıyla kullanılmıştır.

*Dithiothreitol (DTT) çözeltisi:* 1 mM DTT çözeltisi için; 1,54 mg DTT 10 ml deiyonize suda çözündürülmüştür. Hazırlanan bu çözelti oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan GSH/GSSG oranının hesaplanabilmesi için GSSG'un disülfid bağlarının kırılarak toplam GSH üzerinden tespit edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

#### *GSH ve CYS (miks) standart çözeltisi*

Miks standart stok solüsyonu;

1 mM miks= 0,003 g GSH + 0,0012 g CYS + 10 ml SBB

100  $\mu$ M miks= 1 ml 1 mM miks + 9 ml SBB

10  $\mu$ M miks= 1 ml 100  $\mu$ M miks + 9 ml SBB hazırlanmıştır. Hazırlanan bu miks standart stok solüsyonlarından 25 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1250 nM, 5000 nM'lık standart GSH ve CYS çözeltileri Tablo 3.1'deki gibi hazırlanmıştır.

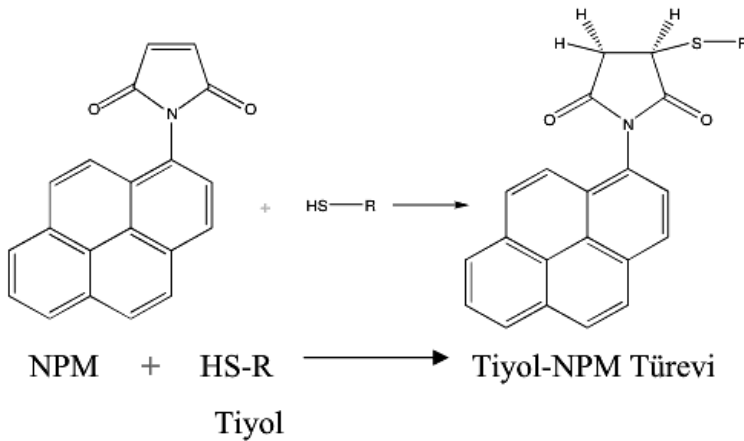
Tablo 3.1. GSH ve CYS standart çözeltilerinin hazırlanışı.

Konsantrasyon	Stok standart sol.	SBB ( $\mu$ l)	HPLC ( $\mu$ l)	NPM ( $\mu$ l)	Toplam (ml)
0 nM	0	20	230	750	1
25 nM	2,5 (10 $\mu$ M'den)	17,5	230	750	1
125 nM	12,5 (10 $\mu$ M'den)	7,5	230	750	1
250 nM	2,5(100 $\mu$ M'den)	17,5	230	750	1
500 nM	5(100 $\mu$ M'den)	15	230	750	1
1250 nM	12,5(100 $\mu$ M'den)	7,5	230	750	1
5000 nM	5 $\mu$ l	12,5	230	750	1

### 3.2.4.2. Numunelerin hazırlanması, ekstraksiyonu ve türevlendirilmesi

Analize ayrılan 6 tüp ikiyeşerli olarak birleştirilip herbiri 20 ml tüpler elde edildikten sonra 9000 devir/dakika'da, 4°C'de 10 dakika santüfjlenmiştir.

*GSH ve CYS türevlendirme:* Kültür peletine 1 ml SBB eklenmiş ve doku homojenizatörü ile buz üzerinde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenattan 100 µl alınıp üzerine 150 µl saf su ve 750 µl NPM eklenip oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Serbest sülfidril grupları içeren tiyol gruplarının NPM ile girdiği reaksiyon Şekil 3.5'de gösterilmiştir. Üzerine 10 µl 2N HCl eklenip 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiş ve analize kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir (Winters ve ark., 1995).



Şekil 3.5. Serbest sülfidril grupları içeren tiyol bileşikleriyle NPM çözeltisinin reaksiyonu (Winters ve ark., 1995).

*GSSG türevlendirme:* Kültür homojenatından 130 µl alınıp üzerine 120 µl DTT ilave edilmiş ve GSSG oluşumu için tüpler 37°C'deki su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra türevlendirme amacıyla tüplere 750 µl NPM çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için tüplerin ağızları parafilmle kapatılıp 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Türevlendirme işlemi sonrası reaksiyonu durdurmak amacıyla deney tüplerine 2 N 10 µl HCl ilave edilmiştir. Tüpler vortekste iyice karıştırılmış, daha sonra tüplerden 1'er ml alınarak 0,45 µm gözenek çaplı filtreden geçirildikten sonra 4°C'de muhafaza edilmiştir (Winters ve ark., 1995).

### 3.2.4.3. HPLC'de GSH, GSSG ve CYS analizi

HPLC analizi için aşağıda belirtilen kromatografi koşulları uygulanmıştır.

Floresans dedektörün eksitasyon dalga boyu ( $\lambda_{ex}$ ): 330 nm

Floresans dedektörün emisyon dalga boyu ( $\lambda_{em}$ ): 375 nm

Mobil faz akış hızı: 1 ml/dakika

Kolon sıcaklığı: 25°C

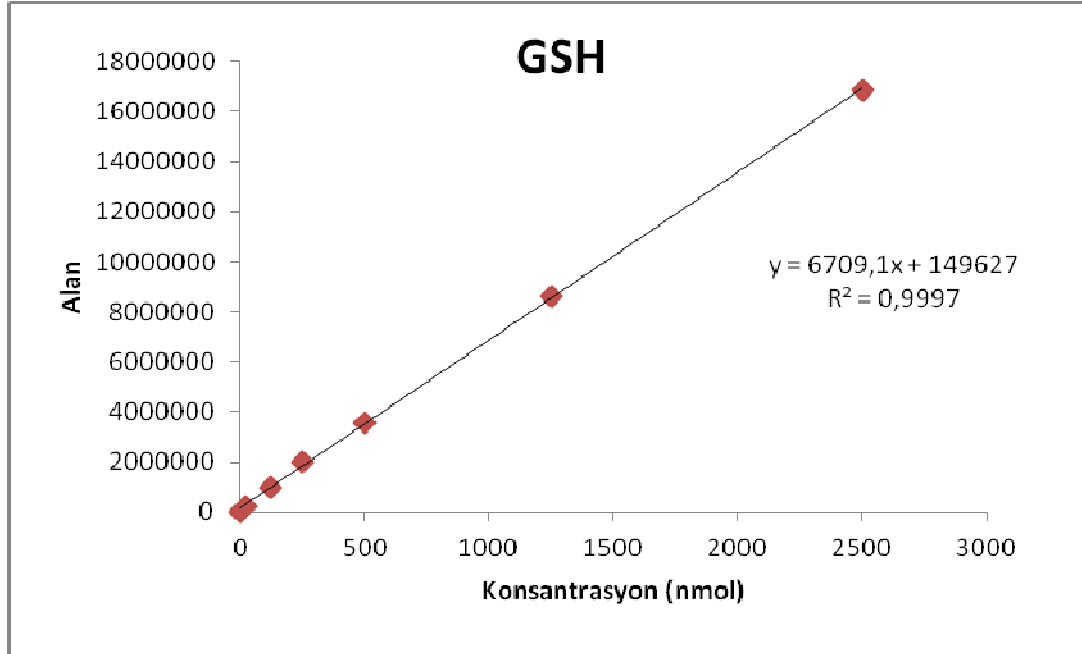
Enjeksiyon hacmi: 5  $\mu$ l

İşlem süresi: 15 dakika

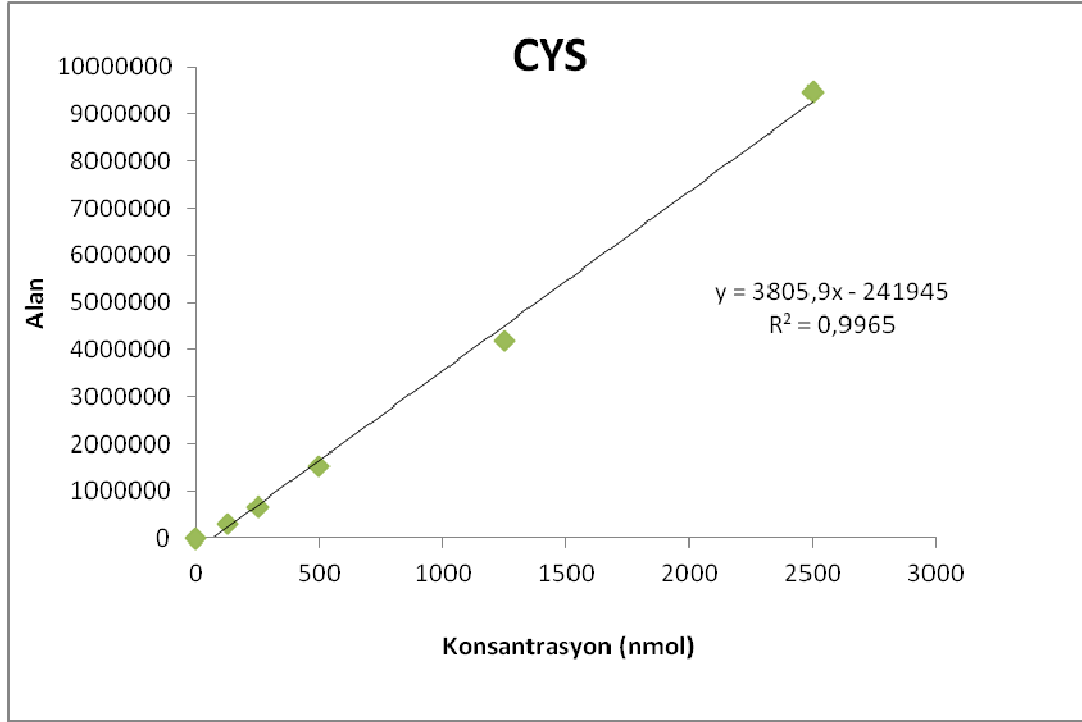
## BÖLÜM 4. SONUÇLAR

Bu çalışmada *E. coli* O157:H7'nin çeşitli streslere karşı direnci ve bu streslerin GSH, GSSG ve CYS içeriği üzerine etkisi araştırılmıştır. pH, sıcaklık, NaCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve sodyum hipoklorit streslerine maruz kalan *E. coli* O157:H7 kültüründe canlı hücre sayısı BHI Agar ve SMAC Agara yapılan ekimler sonucunda belirlenmiştir. SMAC Agar *E. coli* izolasyonunda kısmen seçici diferansiyel bir besiyeridir, besiyerinde sefiksim-tellürit kullanımı hasarlı hücrelerin gelişimini engellemektedir. BHI Agar ise zenginleştirilmiş, selektif olmayan genel amaçlı bir besiyeridir.

Hücre içi GSH, CYS ve GSSG miktarları HPLC ile belirlenmiştir. GSH ve CYS standart eğrilerinden (Şekil 4.1 ve 4.2) elde edilen formüllerden GSH ve CYS içerikleri nmol/10<sup>7</sup> kob olarak hesaplanmıştır.

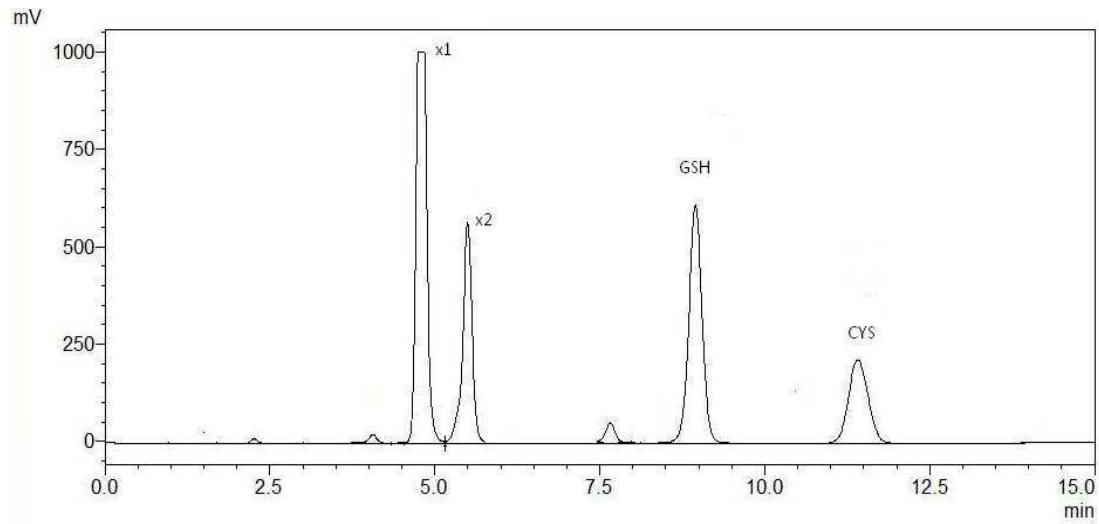


Şekil 4.1. GSH standart eğrisi.



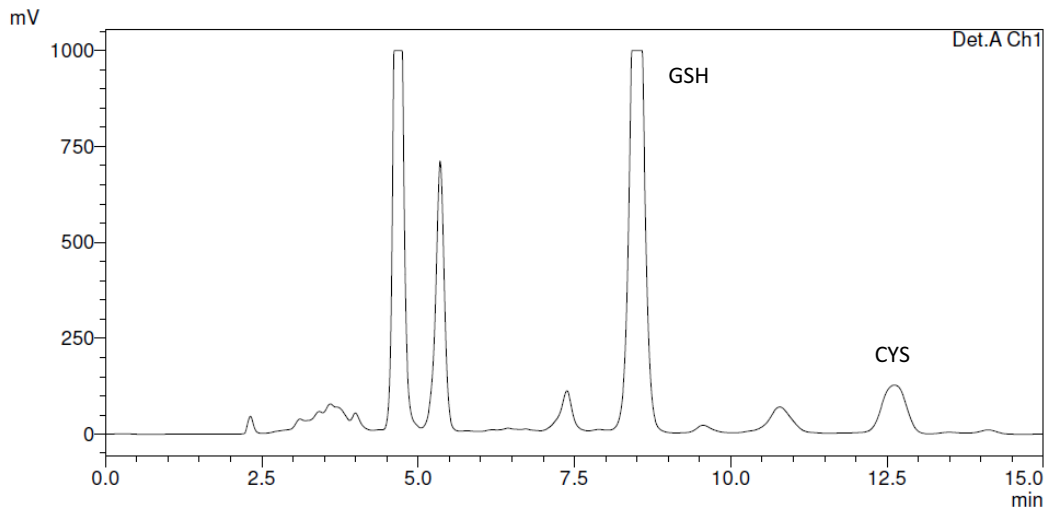
Şekil 4.2. CYS standart eğrisi.

GSH ve CYS standartlarına ait kromatogram Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. GSH ve CYS standart karışımının HPLC’den alınan kromatogramı (X1 ve X2 NPM hidroliz pikleridir).

Kontrol örneğinin HPLC’de okutulmasıyla elde edilen kromatogram Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Kontrol örneği kromatogramı

#### 4.1. *E. coli* O157:H7'nin Aside Adaptasyonu

*E. coli* O157:H7'nin aside adaptasyonunda GSH'un rolünü belirlemek amacıyla 3.2.2'de anlatıldığı şekilde uygulanan asit adaptasyon denemesinden elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

Aside adaptasyon denemesinde kontrol grubundan farklı olarak besiyerine %1 oranında daha fazla glikoz eklenmiştir. Bu fazla glikozun bakteri kültürü tarafından organik aside dönüştürülerek pH değerinde daha fazla düşüş olması ve sonuçta düşük pH'da geliştirilen hücrelerin asitliğe adapte edilmesi hedeflenmiştir. Aside adaptasyon denemesinde kültürlerin 18 saatlik inkübasyonundan sonra adaptasyon işlemi uygulanan grupta (TSBG) pH değerinin ve *E. coli* O157:H7 sayısının kontrole (TSB) kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Aside adapte edilmiş *E. coli* O157:H7 kültürü ve kontrol grubu pH değeri 3,0 olan BHI Broth besiyerine yaklaşık 6-7 kob/ml düzeyinde aşılınmış ve 37°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda pH değeri kontrol ve aside adapte edilen kültürlerde sırasıyla 2,30 ve 2,18 olarak ölçülmüştür. BHI Agar'da yapılan sayımda her iki grupta birbirine yakın sonuçlar alınmıştır. Buna karşın SMAC Agar'da kontrol grubunun sayısı 2,5 log kob/ml daha düşük bulunmuştur.

HPLC analizi sonucu TSBG grubunun 18 saatlik kültüründe kontrole göre GSH ve CYS miktarlarının azaldığı, GSSG miktarının ise arttığı belirlenmiştir. GSH/GSSG

oranı ise 0,91'e düşmüştür. pH'sı 3,0 olan besiyerine aşılardan sonra hem TSB hem de TSBG grubunda GSH, GSSG ve CYS tespit edilmemiştir.

Tablo 4.1. Asit adaptasyonu denemesinde elde edilen sonuçlar.

		<i>E. coli</i> O157:H7 sayısı (Ortalama±sd log kob/ml)		pH	GSH (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSSG (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSH/ GSSG	CYS (nmol/10 <sup>7</sup> kob)
		BHI Agar	SMAC Agar					
TSB (kontrol)	18 saatlik kültür	8,87±0,48	9,24±0,68	5,40	0,67±0,11	0,15±0,02	4,37	0,10±0,02
	0. saat	6,79±0,08	6,46±0,25	3,00	TE	TE	-	TE
	6. saat	6,00±0,11	3,31±0,09	2,30				
TSBG	18 saatlik kültür	8,60±0,08	8,64±0,41	4,70	0,15±0,02	0,17 ±0,05	0,91	0,04 ±0,01
	0. saat	6,70±0,30	6,51±0,07	3,03	TE	TE	-	TE
	6. saat	6,37±0,09	5,81±0,11	2,18				

\*TE: Tespit edilmedi.

## 4.2. pH Stresi

Düşük pH'nın (3,0) *E. coli* O157:H7 hücrelerinin GSH içeriğine etkisini tespit etmek amacıyla yapılan denemede kontrol grubunda 6 saatlik inkübasyon sonunda canlı hücre sayısı yaklaşık 2 log kob/ml artmıştır (Tablo 4.2). Diğer yandan pH değeri 3,0 olan TSB besiyerine aşılardan kültürde hücre sayısı yaklaşık 2 log kob/ml azalmıştır. SMAC Agar ve BHI Agar'da yapılan sayım sonuçları arasında 1,09 log kob/ml fark bulunmuştur.

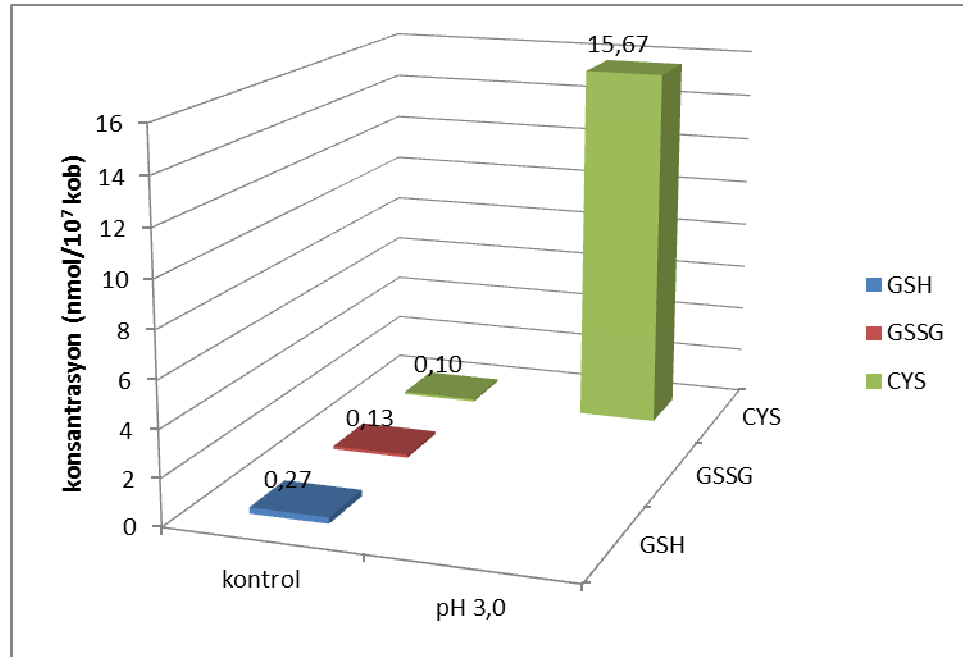


Tablo 4.2. pH stresi uygulamasında elde edilen sonuçlar.

		<i>E. coli</i> O157:H7 sayısı (Ortalama±sd log kob/ml)		pH	GSH (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSSG (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSH/ GSSG	CYS (nmol/10 <sup>7</sup> kob)
		BHI Agar	SMAC Agar					
Kontrol	0. saat	7,10±0,06	6,81±0,28	7,46	0,27±0,01	0,13±0,00	2,11	0,10±0,01
	6. saat	9,03±0,02	8,63±0,01	5,32				
pH 3,0	0. saat	7,74±0,17	7,37±0,09	3,06	TE	TE	-	15,67±3,67
	6. saat	5,71±0,15	4,62±0,13	3,06				

\*TE: Tespit edilmedi.

İnkübasyon sonunda alınan örneklerde yapılan HPLC analizinde stres uygulanan grupta GSH ve GSSG saptanamamıştır. CYS miktarının ise 15,67±3,67 nmol/10<sup>7</sup> kob olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. pH stresinin GSH, GSSG ve CYS üzerine etkisi.

### 4.3. NaCl Stresi

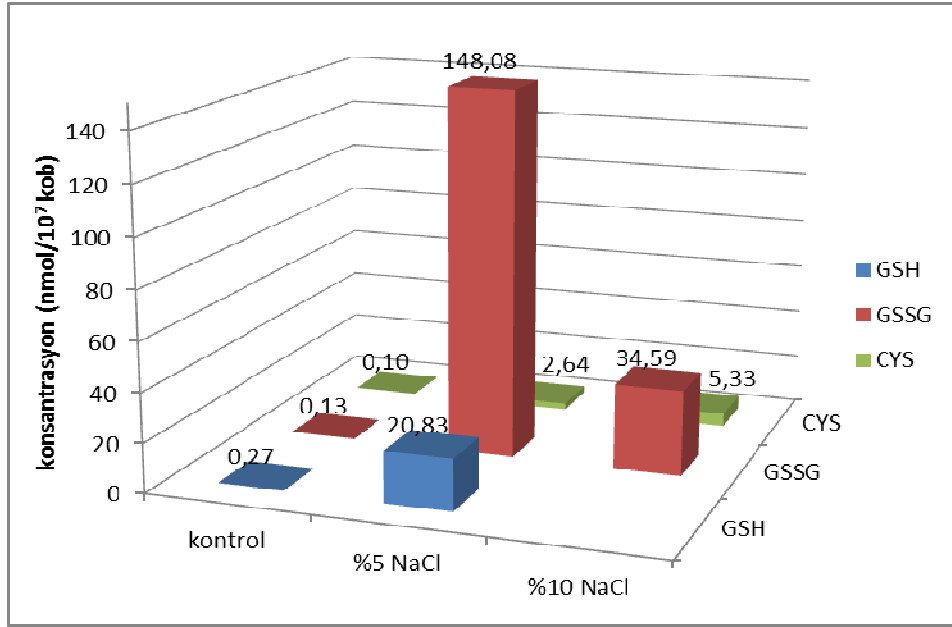
NaCl stresi sonucu GSH içeriğindeki değişimi tespit etmek amacıyla *E. coli* O157:H7'nin gelişme ortamına iki farklı konsantrasyonda (%5 ve %10) NaCl ilave edilmiştir. İnkübasyon sonunda yapılan analizde hem %5 hemde %10 NaCl uygulanan grupta *E. coli* O157:H7 sayısının kontrole göre azaldığı ve bu azalmanın %10 NaCl grubunda daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. NaCl stresi uygulamasında elde edilen sonuçlar.

		<i>E. coli</i> O157:H7 sayısı (Ortalama±sd log kob/ml)		pH	GSH (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSSG (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSH/ GSSG	CYS (nmol/10 <sup>7</sup> kob)
		BHI Agar	SMAC Agar					
Kontrol	0. saat	7,10±0,06	6,81±0,28	7,46	0,27±0,01	0,13±0,00	2,11	0,10±0,01
	6. saat	9,03±0,02	8,63±0,01	5,32				
%5 NaCl	0. saat	6,75±0,16	6,31±0,13	7,09	20,83±7,05	148±59,71	0,15	2,64±0,48
	6. saat	6,53±0,11	6,15±0,18	6,90				
%10 NaCl	0. saat	6,76±0,28	6,65±0,12	7,03	TE	34,59±1,49	-	5,33±0,83
	6. saat	6,20±0,05	5,66±0,34	7,01				

\*TE: Tespit edilmedi.

HPLC analizi sonucu %5 NaCl stresinin GSH, GSSG ve CYS miktarlarında artışa neden olduğu tespit edilmiştir. %10 NaCl stresi sonucu GSH saptanmamış, GSSG ve CYS miktarları ise kontrole kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. NaCl stresinin GSH, GGSG ve CYS üzerine etkisi.

#### 4.4. Sıcaklık Stresi

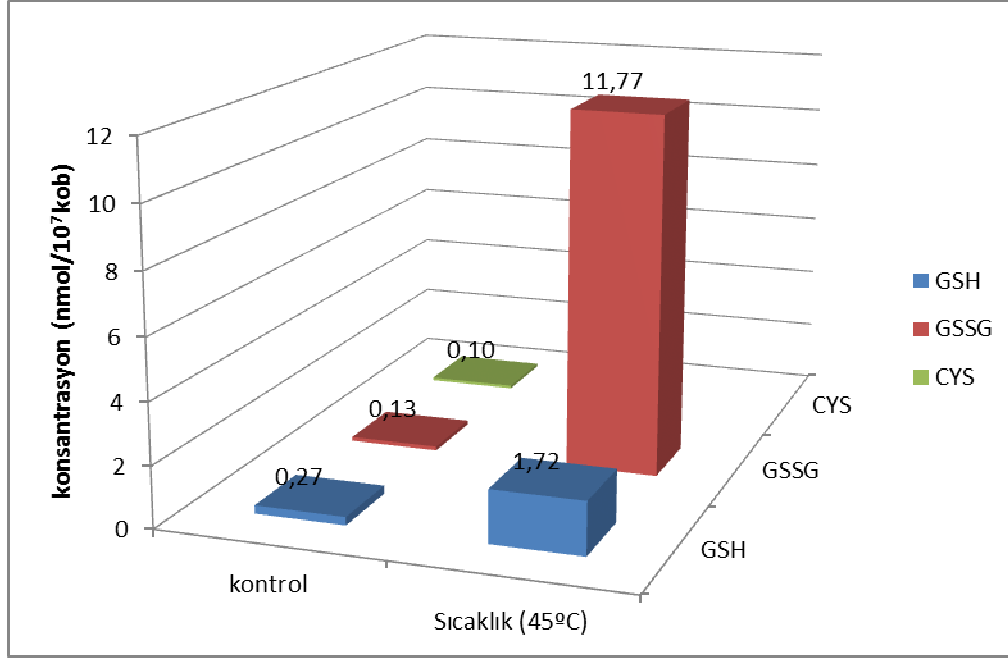
Optimal gelişme sıcaklığının üzerinde bir sıcaklığa (45°C) maruz kalan *E. coli* O157:H7 hücrelerinin GSH içeriğindeki değişimler incelenmiştir. Başlangıçta SMAC Agar'da  $6,41 \pm 0,08$  log kob/ml olarak belirlenen *E. coli* O157:H7 sayısı 45°C'de 6 saatlik inkübasyon sonunda  $7,32 \pm 0,17$  log kob/ml'ye yükselmiştir. BHI Agar ve SMAC Agar'da yapılan sayımlarda birbirine yakın değerler bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Sıcaklık stresi uygulamasında elde edilen sonuçlar.

		<i>E. coli</i> O157:H7 sayısı (Ortalama±sd log kob/ml)		pH	GSH (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSSG (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSH/ GSSG	CYS (nmol/10 <sup>7</sup> kob)
		BHI Agar	SMAC Agar					
Kontrol (37°C)	0. saat	7,10±0,06	6,81±0,28	7,46	0,27±0,01	0,13±0,00	2,11	0,10±0,01
	6. saat	9,03±0,02	8,63±0,01	5,32				
45°C	0. saat	6,54±0,13	6,41±0,08	7,42	1,72±0,96	11,77±2,07	0,14	TE
	6. saat	7,53±0,23	7,32±0,17	6,10				

\*TE: Tespit edilmedi.

Sıcaklık stresi uygulanan grupta GSH ve GSSG miktarı artarken, GSH/GSSG oranı 0,14'e düşmüştür. CYS ise tespit edilmemiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Sıcaklık stresinin GSH, GSSG ve CYS üzerine etkisi.

#### 4.5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stresi

*E. coli* O157:H7 hücrelerinin %1 ve %2,5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edilmesi sonucu GSH içeriğinde meydana gelen değişimler tespit edilerek sonuçları Tablo 4.5'de verilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muameleden sonra yapılan ekimlerde her iki konsantrasyon için de sadece BHI Agar besiyerinde 0. dakikada sayım yapılabilmiş ve *E. coli* O157:H7 sayısının kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir. SMAC Agar'da gelişme olmamıştır.

Uygulanan %1 ve %2,5'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresi sonucu inkübasyonun 30. ve 60. dakikalarında alınan örneklerde yapılan HPLC analizinde GSH, GSSG ve CYS tespit edilmemiştir.

Tablo 4.5. Hidrojen peroksit stresi uygulamasında elde edilen sonuçlar.

		<i>E. coli</i> O157:H7 sayısı (Ortalama±sd log kob/ml)		pH	GSH (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSSG (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSH/ GSSG	CYS (nmol/10 <sup>7</sup> kob)
		BHI Agar	SMAC Agar					
KONTROL	0. saat	7,10±0,06	6,81±0,28	7,46	0,27±0,01	0,13±0,00	2,11	0,10±0,01
	6. saat	9,03±0,02	8,63±0,01	5,32				
%1 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0. dk	4,43±0,31	<1,00	6,56	-	-	-	-
	30. dk	<1,00	<1,00	6,70	TE	TE	-	TE
	60. dk	<1,00	<1,00	6,72				
%2,5 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0. dk	3,60±0,08	<1,00	6,06	-	-	--	-
	30. dk	<1,00	<1,00	5,93	TE	TE	-	TE
	60. dk	<1,00	<1,00	5,93				

\*TE: Tespit edilmedi.

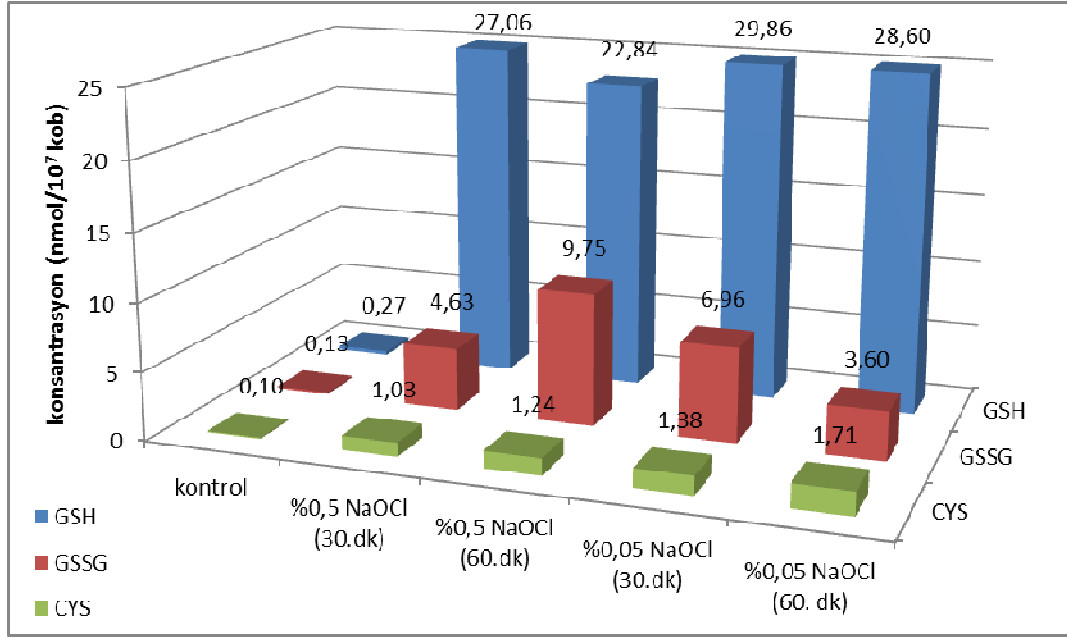
#### 4.6. Sodyum Hipoklorit Stresi

Sodyum hipoklorit stresinin *E. coli* O157:H7 hücrelerinde GSH içeriğine etkisi besiyerine ilave edilen %0,05 ve %0,5'lik sodyum hipoklorit ile belirlenmiştir. İnkübasyonun 0., 30. ve 60. dakikalarında alınan örneklerde yapılan analiz sonucu her iki grubun SMAC Agar'da tespit edilen *E. coli* O157:H7 sayılarının birbirine yakın olduğu görülmüştür. Ayrıca uygulanan her iki konsantrasyonda da 30. dakikada BHI Agar'da sayım yapılamamıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Sodyum hipoklorit uygulamasında elde edilen sonuçlar.

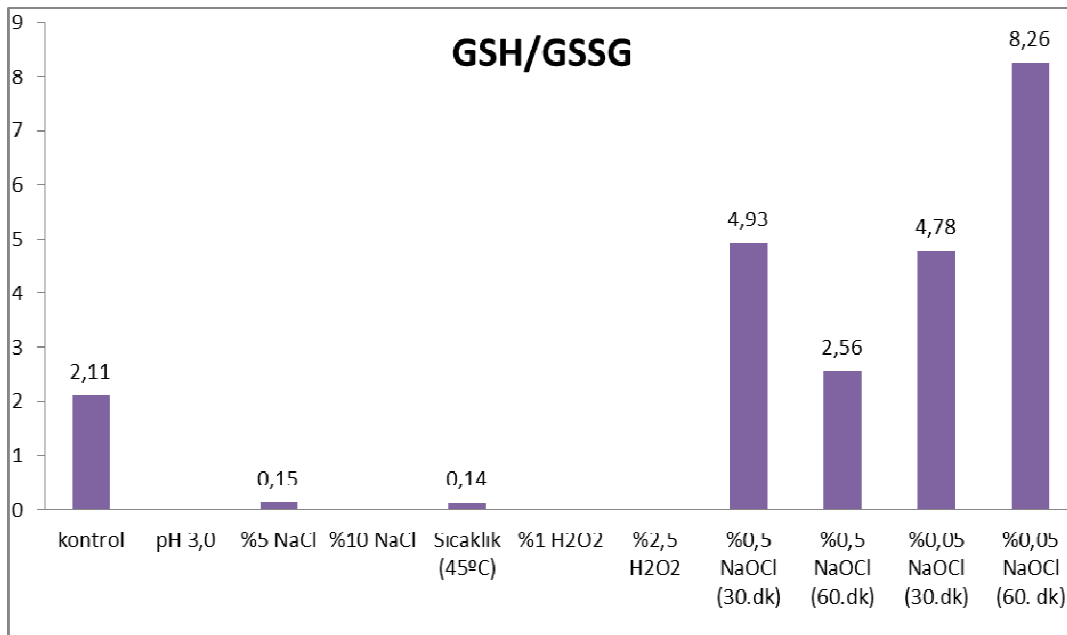
		<i>E. coli</i> O157:H7 sayısı (Ortalama±sd log kob/ml)		pH	GSH (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSSG (nmol/10 <sup>7</sup> kob)	GSH/ GSSG	CYS (nmol/10 <sup>7</sup> kob)
		BHI Agar	SMAC Agar					
KONTROL	0. saat	7,10±0,06	6,81±0,28	7,46	0,27±0,01	0,13±0,00	2,11	0,10±0,01
	6. saat	9,03±0,02	8,63±0,01	5,32				
%0,05 NaOCl	0. dk	7,47±0,40	6,97±0,02	6,32	-	-	-	-
	30. dk	>3.00	6,95±0,06	6,62	29,86±6,07	6,96±2,55	4,78	1,38±0,23
	60. dk	7,03±0,03	6,94±0,09	6,32	28,60±1,89	3,60±0,21	8,26	1,71±0,46
%0,5 NaOCl	0. dk	7,83±0,15	6,87±0,13	7,08	-	-	-	-
	30. dk	>3.00	6,96±0,01	7,08	27,06±3,66	4,63±0,00	4,93	1,03±0,02
	60. dk	7,02±0,01	6,78±0,06	7,16	22,84±2,51	9,75±3,74	2,56	1,24±0,19

İnkübasyonun ortasında ve sonunda alınan örneklerde yapılan HPLC analizinde her iki stres grubunun GSH, GSSG ve CYS miktarları ile GSH/GSSG oranlarının kontrole kıyasla arttığı saptanmıştır. En yüksek CYS ve GSH miktarı sırasıyla 1,71±0,46 nmol/10<sup>7</sup> kob ve 29,86±6,07 nmol/10<sup>7</sup> kob olarak %0,05 sodyum hipoklorit uygulanması sonucu tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Sodyum hipoklorit stresinin GSH, GSSG ve CYS üzerine etkisi.

*E. coli* O157:H7 kültürüne uygulanan streslerin GSH/GSSG oranı üzerine etkisi Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Sodyum hipoklorit stresi sonucu diğer streslere göre daha yüksek GSH/GSSG oranları tespit edilmiştir. Sıcaklık ve %5 NaCl stresleri sonucunda ise kontrole göre daha düşük GSH/GSSG oranları tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Farklı stres koşullarında GSH/GSSG oranları.

## BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Biyolojik tiyoller, hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Oksidatif strese tiyoller sadece antioksidan savunma sisteminin bir temel taşı olarak değil aynı zamanda oksidanlara karşı moleküler yanıtların düzenleyicileri olarak da hizmet etmektedirler (Sen ve Packer, 2000).

Bakterilerin düşük pH, klor bileşikleri ile oksidatif ve ozmotik streslere karşı korunmasında GSH'un önemli rolü olduğu ifade edilmektedir (Masip ve ark., 2006). Bu nedenle bu çalışmada, çeşitli stres koşullarının *E. coli* O157:H7 hücrelerindeki GSH içeriği üzerine etkisi araştırılmıştır.

*E. coli* hücreleri pH 4,4 ile 9,0 değerlerinde canlılığını koruyabilmektedir. Özellikle *E. coli* O157:H7 düşük pH (pH 3,6 altında) değerlerindeki ortamlarda gelişim gösterebilmektedir (Ekici ve ark., 2008). *E. coli* O157:H7'nin aside adapte edilmesi amacıyla yapılan denemede, %1 oranında daha fazla glikoz içeren TSBG besiyerinde 18 saatlik inkübasyon sonucunda pH 4,70 olarak ölçülmüş olup kontrol grubunun pH değerinden 0,7 birim daha düşüktür. İki grubun pH değerleri arasındaki farkın besiyerlerinin glikoz içeriklerinin farklı olmasından kaynaklandığı açıktır.

Onsekiz saatlik inkübasyon sonunda alınan örneklerde yapılan HPLC analizi sonucu GSH/GSSG oranı TSB grubunda 4,37, TSBG grubunda ise 0,91 olarak tespit edilmiştir. Bir hücrel redoks anahtarı olarak çalışan GSH/GSSG oranı hücrenin oksidatif durumu hakkında fikir vermektedir. GSH/GSSG oranı ne kadar düşükse oksidatif stresin o oranda ilerlemiş olduğu sonucuna varılır (Schafer ve Buettner, 2001). Dolayısıyla TSBG grubunun 18 saatlik kültüründe oksidatif stresin arttığı görülmektedir.



HPLC analiz sonuçları sayım sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, pH değeri aside adapte edilen grupta kontrol grubuna göre daha düşük olmasına rağmen canlı hücre sayılarının birbirine yakın olduğu buna karşın GSH miktarının ve GSH/GSSG oranının azaldığı görülmektedir (Tablo 4.1). Buna göre *E. coli* O157:H7 hücrelerinin düşük pH'da GSH'u kullanarak bu strese karşı korunduğu sonucuna varılabilir.

pH'sı 3,0 olan ortama aşıl原因an kültürlerin 6 saatlik inkübasyonu sonucu SMAC Agar'da gelişen *E. coli* O157:H7 sayısının TSB grubunda 3,15 log kob/ml, TSBG grubunda ise 0,70 log kob/ml daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 6. saat örneklerinde yapılan analizde BHI Agar ve SMAC Agar besiyerlerindeki sayım sonuçları arasında TSB grubunda 2,69 log kob/ml, TSBG grubunda ise 0,56 log kob/ml fark olduğu belirlenmiştir. Sayım sonuçları arasındaki fark SMAC Agar içeriğinde bulunan inhibitör maddelerin hasar görmüş hücrelerin gelişimini engellemesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte elde edilen sonuçlar TSBG grubunda hücresel hasarın kontrole göre daha az olduğunu ve aside adaptasyon sonucunda *E. coli* O157:H7 hücrelerinin düşük pH değerlerine karşı direnç kazandığını göstermektedir. Benzer şekilde çeşitli çalışmalarda öldürücü olmayan pH düzeyine maruz kalmış *E. coli* O157:H7 hücrelerinin daha düşük pH düzeylerini tolere edebildiği bildirilmiştir (Brundzinski ve Harrison, 1998; Ryu ve ark., 1999). Dlamini ve Buys (2009) tarafından asit adapte olan ve adapte olmayan iki farklı grup *E. coli* suşu üzerinde yapılan benzer bir çalışmada pH 4,5'de aside adapte olmayan grupta *E. coli* 16 saat sonunda tespit edilemezken, asit adapte grubun *E. coli* sayısı 1 log kob/ml azalmıştır.

Altıncı saatte alınan örneklerde yapılan HPLC analizi sonucu hem TSB hem de TSBG grubunda GSH, GSSG ve CYS tespit edilmemiştir. Bu durum aynı zamanda hücre gelişiminin de engellenmesinden kaynaklanmaktadır. Elde edilen bu sonuçla uyumlu olarak literatürde fizyolojik değerlerin altındaki pH'da  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz ve glutatyon sentetaz aktivitelerinin azalması nedeniyle GSH sentezinin engellendiği bildirmiştir (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005).

Düşük pH (3,0) stresi denemesinde, 6 saatlik inkübasyon sonunda SMAC Agar'da gelişen *E. coli* O157:H7 sayısı kontrol grubunda 1,82 log kob/ml artmış, buna karşın

stres uygulanan grupta 2,75 log kob/ml azalmıştır (Tablo 4.2). Elde edilen sonuçla uyumlu olarak literatürde *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0'da 2-5 saat arasında canlı kalabileceği (Arnold ve Kasper, 1995), ayrıca asit toleransının gelişme ortamının pH'sına ve büyüme fazına bağlı olduğu belirtilmiştir (Benjamin ve Datta, 1995).

pH stresi uygulanan grupta GSH, GSSG tespit edilmemiş, buna karşın CYS miktarı kontrole göre 15,57 nmol/10<sup>7</sup> kob daha yüksek bulunmuştur. Asit adaptasyonu denemesinde belirtildiği gibi fizyolojik değerlerin altındaki bir pH'da GSH sentezi engellenmektedir. Bununla birlikte elde edilen sonuçlar ortamdaki GSH'un GSSG'a oksitlendiğini ve GSSG'un da hidroliz olarak CYS miktarının artmasına neden olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde literatürde oksitatif stres boyunca GSH seviyesi düşerken GSSG seviyesinin arttığı belirtilmektedir (Cumming ve ark., 2004). Ayrıca genel olarak GSSG kaybının sistin oluşumu ile paralellik gösterdiği ve sistinin GSSG hidrolizinin son ürünü olduğu bildirilmiştir (Woodward, 1939). Sistin ise CYS'in okside formu olup, hücre içinde CYS'e indirgenmektedir (Bannai ve ark., 1989).

Bunun dışında hücrel hasara bağlı olarak bir kısım GSH da hücre dışına sızmış olabilir. Liang ve ark. (2008) tarafından yapılan benzer bir çalışmada pH 1,2'ye 3 saat tabi tutulan *Candida utilis* hücreleri canlı kalmakla birlikte, bir miktar hücre içi GSH'un ortama sızdığı tespit edilmiştir.

NaCl stresi denemesinde, inkübasyon sonunda alınan örneklerden SMAC Agar'a yapılan ekimler sonucu tespit edilen *E. coli* O157:H7 sayısının 0. saate kıyasla kontrol grubunda 1,82 log kob/ml daha yüksek olduğu, buna karşın %5 NaCl stresi grubunda 0,16 log kob/ml ve %10 NaCl stresi grubunda 0,99 log kob/ml daha düşük olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3). Bu durum NaCl uygulaması sonucu hücre kayıplarının oluştuğunu ve bu kaybın artan NaCl miktarı ile doğru orantılı olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu sonuçla paralel olarak literatürde NaCl konsantrasyonunun artmasıyla *E. coli* O157:H7 üzerindeki inhibisyon etkinin de arttığı belirtilmektedir (Coşansu ve Ayhan, 2000). Bunun yanısıra Glass ve ark. (1992) tarafından TSB besiyerinde %8,5 ve üzerindeki NaCl konsantrasyonlarının *E. coli* O157:H7 suşunu inhibe ettiği bildirilmiştir.

GSH/GSSG oranı kontrol grubunda 2,11, %5 NaCl grubunda ise 0,15 olarak tespit edilmiştir. Bu durum %5 NaCl grubunda oksidatif stresin ilerlediğini göstermektedir. Diğer yandan %5 NaCl stresi sonucu kontrole kıyasla GSH 20,56 nmol/10<sup>7</sup> kob, GSSG 147,87 nmol/10<sup>7</sup> kob ve CYS 2,54 nmol/10<sup>7</sup> kob daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar ile paralel olarak literatürde belirtildiği gibi ozmotik stres hücre için zararlı ROT'nin seviyesinde artışa neden olabilmektedir. GSH, ROT'nin temizlenmesine dahil olmakta ve bunun sonucu olarak daha çok GSSG üretilmektedir. Ayrıca ozmotik stres hücreSEL CYS miktarında da artışa neden olmaktadır (Liang ve ark., 2009). Buna ilave olarak Smirnova ve ark. (2001a) tarafından yapılan bir çalışmada ozmotik stresin hücreSEL GSH birikimine yol açtığı bildirilmiştir.

Benzer bir çalışmada Jamnik ve ark. (2006) NaCl'e karşı stres yanıtında GSH'un rolünü belirlemek için *Saccharomyces cerevisiae*'ya %1-8 arasında değişik NaCl konsantrasyonları uygulanmıştır. Bir saat %6, %7 ve %8 NaCl uygulaması sonucu ROT üretimi artmıştır. Bu durum ise GSH miktarının artmasına neden olmuştur. NaCl muamelesinden 2 saat sonra hücre içi oksidan miktarı bir miktar daha artarken GSH içeriği hemen hemen aynı kalmıştır.

Zhang ve ark. (2010) *Lactococcus lactis*'in ozmotik strese karşı korunmasında GSH'un rolü üzerine yaptıkları çalışmada, GSH içeren *L. lactis* SK11'in 5 M NaCl'e maruz bırakıldığında GSH içermeyen kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde canlılığını devam ettirdiğini tespit etmişlerdir.

Yüzde on NaCl stresi uygulanan grupta GSH tespit edilmemesi ve *E. coli* O157:H7 sayısındaki azalma, hücreSEL hasarın arttığını düşündürmektedir. Benzer şekilde literatürde %5'den %10'a artan NaCl konsantrasyonun daha fazla hücre yaralanmasına neden olduğu bildirilmiştir (Hajmer ve ark., 2006).

Ayrıca %10 NaCl stresi sonucu %5 NaCl stresine kıyasla GSSG'un 113,41 nmol/10<sup>7</sup> kob azalması ve CYS'in 2,69 nmol/10<sup>7</sup> kob artması pH stresinde de açıklandığı şekilde GSSG'un hidrolizi sonucu CYS'in artması durumunu desteklemektedir.

Sıcaklık stresi denemesinde, GSH/GSSG oranı kontrolde 2,11, stres grubunda ise 0,14 tespit edilmiştir (Tablo 4.4). GSH/GSSG oranı hücrel redoks durumunun güvenilir bir göstergesidir. GSH/GSSG oranında azalma düşük oksidan kapasitesi ile oksidatif strese karşı artan hassasiyeti göstermektedir (Jones ve ark., 2006). İnkübasyon sonucu SMAC Agar'da gelişen *E. coli* O157:H7 sayısı kontrol grubunda 1,82 log kob/ml, stres grubunda ise 0,91 log kob/ml daha yüksek bulunmuştur. Bu durum sıcaklık stresi uygulanan grupta oksidatif strese bağlı hücrel kayıpların oluşması ile birlikte *E. coli* O157:H7'nin sıcaklık stresine karşı adapte olduğunu göstermektedir.

Sıcaklık stresi uygulanan grupta kontrole kıyasla GSH 1,45 nmol/10<sup>7</sup> kob, GSSG 11,64 nmol/10<sup>7</sup> kob daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçla uyumlu olarak literatürde *Saccharomyces cerevisiae*'nin GSH içeriğinin ısı şoku (41°C) karşısında arttığı bildirilmiştir (Sugiyama ve ark., 2000). Stres grubunda CYS tespit edilmemiştir. Stres grubunda CYS tespit edilmemiş olması ve artan GSH miktarı ortamdaki CYS'in artan stresle birlikte GSH yapımına katıldığını düşündürmektedir. Literatürde belirtildiği şekilde antioksidan özelliğe sahip CYS, GSH sentezinde başlangıç maddesi olarak görev yapmaktadır. CYS'in sülfidril veya tiyol grubu, GSH sentezinde proton donörü olarak rol oynamasının yanısıra GSH'un biyolojik aktivitesinden de sorumludur (Shoveller ve ark., 2005).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresi uygulaması sonucu, 0. dakikada BHI Agar'da gelişen *E. coli* O157:H7 sayısı kontrol grubuna kıyasla %1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda 2,67 log kob/ml, %2,5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda 3,5 log kob/ml daha düşük bulunmuştur. İnkübasyonun 30. ve 60. dakikalarında ise *E. coli* O157:H7 hücreleri gelişmemiştir (Tablo 4.5). Bunun sonucu olarak da HPLC analizinde GSH, GSSG ve CYS tespit edilmemiştir.

Literatürde *E. coli* hücrelerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e karşı adaptif yanıtlara sahip olduğu ve hücrelerin düşük konsantrasyonda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile adapte edildiğinde bu oksidanın öldürücü dozlarına karşı daha dirençli hale geldiği bildirilmiştir (Harel ve Storz, 2000). Ayrıca Smirnova ve Oktyabrsky (2005) tarafından yapılan bir çalışmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in sadece öldürücü dozlarının *E. coli*'de hücre içi GSSG düzeyinde önemli bir artışa ve GSH/GSSG oranında bir düşüşe neden olduğu belirtilmiştir.

Sodyum hipoklorit stresi denemesinde, %0,5 ve %0,05 sodyum hipoklorit stresi uygulanan her iki grubun inkübasyon başında, ortasında ve sonunda alınan örneklerinden yapılan ekimler sonucunda SMAC Agar'da tespit edilen *E. coli* O157:H7 sayılarının birbirine yakın olduğu görülmüştür (Tablo 4.6). Bu durum hücrelerin kısa sürede gelişme imkanı bulamamasından kaynaklanmaktadır. Her iki stres grubu için 30. dakikada BHI Agar'da ekim hatasından dolayı sayım yapılamamıştır.

GSH/GSSG oranı kontrolde 2,11, %0,05 sodyum hipoklorit grubunda (60. dk.) 8,26, %0,5 sodyum hipoklorit grubunda (60. dk.) ise 2,56 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca GSH miktarı kontrole kıyasla %0,05 sodyum hipoklorit grubunda (60. dk.) 28,33 nmol/10<sup>7</sup> kob, %0,5 sodyum hipoklorit grubunda (60. dk.) 22,57 nmol/10<sup>7</sup> kob daha yüksek bulunmuştur. Sodyum hipoklorit varlığına rağmen SMAC Agar'da tespit edilen *E. coli* O157:H7 hücre sayılarının birbirine yakın olması ve kontrole kıyasla GSH miktarı ile GSH/GSSG oranındaki artış *E. coli* O157:H7'nin sodyum hipoklorit stresine adapte olduğunu ve bu strese karşı hücrelerin korunmasında GSH'un rolü olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde literatürde GSH'un *E. coli* hücrelerini hipoklorik asit gibi klor bileşiklerine karşı koruduğu, GSH'un %70'i oksitlenmiş olsa bile inkübasyonda organizmaların %95'inin canlılığını devam ettirebildiği bildirilmiştir (Chesney ve ark.,1996).

Kelly ve Love (2006) tarafından yapılan benzer bir çalışmada *Nitrosomonas europaea* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin 20 dakika boyunca değişik konsantrasyonlardaki sodyum hipoklorit şokuna maruz kalması sonucu GSH'un oksitlenme durumu incelenmiştir. Sonuçlar solüsyondaki serbest klor miktarındaki artış kadar GSSG miktarının arttığını göstermektedir. Benzer sonuçlar Chesney ve ark. (1996) tarafından da elde edilmiştir. Uygulanan sodyum hipoklorit stresi sonucu literatür ile paralel bir sonuç elde edilmiştir. GSSG miktarı kontrolde 0,13±0,00 nmol/10<sup>7</sup> kob, %0,05 sodyum hipoklorit stresi uygulanan grupta (60. dk) 3,60±0,21 nmol/10<sup>7</sup> kob ve %0,5 sodyum hipoklorit stresi uygulanan grupta (60. dk) 9,75±3,74 nmol/10<sup>7</sup> kob tespit edilmiştir.

Ayrıca pH ve NaCl streslerinde bahsedildiği gibi GSSG miktarındaki azalma CYS miktarındaki artış ile ilişkili bulunmuştur. İnkübasyon sonunda yapılan HPLC analizi sonucunda %0,05 sodyum hipoklorit stresi uygulanan grupta 30. dakikaya kıyasla GSSG miktarı  $3,36 \text{ nmol}/10^7$  kob daha düşük tespit edilirken, CYS miktarı  $0,33 \text{ nmol}/10^7$  kob daha yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak değişik stres koşullarının *E. coli* O157:H7 hücrelerinin GSH içeriği üzerine etkisinin birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. Sıcaklık, %5 NaCl ve sodyum hipoklorit (%0,05, %0,5 ) stresleri GSH miktarında; sodyum hipoklorit (%0,05, %0,5), NaCl (%5, %10) ve pH (3,0) stresleri ise CYS miktarında artışa neden olmuştur. Elde edilen sonuçlar çeşitli stres koşulları altında *E. coli* O157:H7 hücrelerinin korunmasında yada direnç kazanmasında GSH'un rolü olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca çalışmada uygulanan  $\text{H}_2\text{O}_2$  (%1, %2,5) konsantrasyonları ile pH 3,0 ve %10 NaCl koşulları *E. coli* O157:H7'nin gelişmesini tamamen engellediğinden GSH'un etkisi tespit edilememiştir. Bu stresler açısından daha ılımlı koşullar sözkonusu streslere karşı korumada GSH'un rolü hakkında fikir verebilir.

Gıdaların işlenmesi veya üretimi esnasında *E. coli* O157:H7'nin asit ile tuz, yüksek sıcaklık, kimyasal koruyucular gibi olumsuz koşullara karşı direnç kazanması yada bu streslere adapte olması gıdalarda daha uzun süre canlı kalabileceği anlamına gelmekte olup bu durum tüketici sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Bu nedenle sözkonusu direnç mekanizmalarının tam olarak açıklığa kavuşturulması gıda güvenliği açısından önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

ANONYMOUS, Glutathione, <http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/biochem/G-index.cfm?definition=glutathione>, Erişim tarihi: 01.05.2013, 2013a.

ANONYMOUS, Sistein, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Sistein>, Erişim tarihi: 01.08.2013, 2013b.

ARNOLD, K.W. and KASPER, C.W., Starvation and stationary phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7, *Applied and Environmental Microbiology*, 61:2037–2039, 1995.

ARRICK, B.A. and NATHAN, C.F., Glutathion metabolism as a determinant of the therapeutic efficacy, *Cancer Research*, 44:4224-32, 1984.

ARSENE, F., TOMOYASU, T. and BUKAU, B., The heat shock response of *Escherichia coli*, *International Journal of Food Microbiology*, 55:3-9, 2000.

ASHA, H. and GOWRISHANKAR, J., Regulation of kdp operon expression in *Escherichia coli*: evidence against turgor as signal for transcriptional control, *Journal of Bacteriology*, 175(14):4528–4537, 1993.

ASLUND, F., BERNDT, K.D. and HOLMGREN A., Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria, *Journal of Biological Chemistry*, 272(49):30780–30786, 1997.

BANNAI, S., SATO, H., ISHII, T. and SUGITA, Y., Induction of cystine transport activity in human fibroblasts by oxygen, *Journal of Biological Chemistry*, 264: 18480-18484, 1989.

BEARSON, B.L., LEE, I.S. and CASEY, T.A., *Escherichia coli* O157:H7 glutamate- and arginine-dependent acid-resistance systems protect against oxidative stress during extreme acid challenge, *Microbiology*, 155(3):805–812, 2009.

BEATTY, P.W. and REED, D.J., Influence of cysteine upon the glutathione status of isolated rat hepatocytes, *Biochemistry and Pharmacology*, 30:1227–1230, 1981.

BENJAMIN, M.M. and DATTA, A.R., Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1669–1672, 1995.

BLOCK, S.S., Disinfection, sterilization and preservation, Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 135-146, 185-191, 2001.

BOOTH, I.R., Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria, *Microbiology Review*, 49:359–378, 1985.

BOOTH, I.R., The Regulation of intracellular pH in bacteria, *Novartis Found Symposium*, 221:19–28, discussions 28–37, 1999.

BRUNDZINSKI, L. and HARRISON, M.A., Influence of incubation conditions on survival and acid tolerance response of *E. coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates exposed to acetic acid, *Journal of Food Protection*, 61(5):542-546, 1998.

CHESNEY, J.A., EATON, J.W. and MAHONEY, J.R., Bacterial Glutathione: a sacrificial defense against chlorine compounds, *Journal of Bacteriology*, 178(7):2131–2135, 1996.

COIA, J.E., Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 20(1):1-9, 1998.

COŞANSU, S. ve AYHAN, K., *Campylobacter* Türlerinin Olumsuz Koşullarda Canlı Kalmalarını Sağlayan Fizyolojik Özellikleri ve Stres Tolerans Mekanizmaları, *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(4):23-29, 2009.

COŞANSU, S. ve AYHAN, K., Enterohemorajik *Escherichia coli* O157:H7 ve Fermente Et Ürünlerindeki Önemi, *Gıda*, 25(1):33-38, 2000.

CRONAN, J.E., Phospholipid modifications in bacteria, *Current Opinion in Microbiology*, 5(2):202-205, 2002.

CUMMING, R.C., ANDON, N.L., HAYNES, P.A., PARK, M., FISCHER, W.H. and SCHUBERT, D., Protein synthesis, post-translation modification, and degradation: Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress, *Journal of Biological Chemistry*, 279:21749-21758, 2004.

ÇAKIR, İ., *Escherichia coli* O157:H7, içinde: *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara, Sim Matbaacılık Ltd. Şti., 403-411, 2000.

DEMİRKOL, O. ve ERCAL, N., Glutathione, *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*, Editors: L.M.L. Nollet, F. Toldra, CRC Press, Taylor & Francis, 978-1-4398-1588-5, 2012.

DESMARCHELIER, P.M. and GRAU, E.H., *Escherichia coli*, p 231-236, In: A.D. Hocking, G., Arnold, I., Jenson, K., Newton, Shuterlan, P. (cd), *Food borne microorganisms of public health significance*. Australian Institute of Food Science and Technology Incorporated, Sydney, Australia, 1997.



DİKİCİ, A., Çevresel stres faktörlerine karşı bakteriyel adaptasyonlar ve mekanizmaları, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4(3):59-68, 2009.

DLAMINI, B.C. and BUYS, E.M., Survival and growth of acid adapted *Escherichia coli* strains in broth at different pH levels, *Journal of Food Safety*, 29(3):484-497, 2009.

DOYLE, M.P., *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 12(4):289-301, 1991.

DUKAN, S. and TOUATI, D., Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress, *Journal of Bacteriology*, 178(21):6145–6150, 1996.

DUKAN, S., BELKIN, S. and TOUATI, D., Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 367(2):311–316, 1999.

EKİCİ, L., TELLİ, R. ve YETİM, H., Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyon bakterileri-I, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2:29-42, 2008.

EROL, İ., *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*, Ankara, Pozitif Matbaacılık Limited Şirket, 2007.

FERGUSON, G.P. and BOOTH, I.R., Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methylglyoxal and maintenance of intracellular K<sup>+</sup>, *Journal of Bacteriology*, 180(16):4314–4318, 1998.

FU, X., MUELLER, D.M. and HEINECKE, J.W., Generation of intramolecular and intermolecular sulfenamides, sulfinamides, and sulfonamides by hypochlorous acid: a potential pathway for oxidative cross-linking of low-density lipoprotein by myeloperoxidase, *Biochemistry*, 41(4):1293–1301, 2002.

GLASS, K.A., LOEFFELHOLZ, J.M., FORD, J.P. and DOYLE, M.P., Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8):2513-2516, 1992.

GOMEZ-LOPEZ, V.M., DEVLIEGHERE, F. and DEBEVERE, J., Decontamination of minimally processed vegetables by chlorine dioxide gas, *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 70(2):143–146, 2005.

GREENBERG, J.T. and DEMPLE, B., Glutathione in *Escherichia coli* is dispensable for resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gamma radiation, *Journal of Bacteriology*, 168(2):1026–1029, 1986.

GRONHOLM, L., WIRTANEM, G., AHLGREN, K., NORDSTROM, K. and SJOBERG, A., Screening of antimicrobial activities of disinfectants and cleaning agents against foodborne spoilage microbes, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 208:289-298, 1999.

HAJMER, M., CEYLAN, E., MARSDEN, J.L. and FUNG, D.Y.C., Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy, *Food Microbiology*, 23:446-452, 2006.

HALKMAN, A.K., NOVEIR, M.R. ve DOĞAN, H.B., *Escherichia coli* O157:H7 Serotipi, Sim Matbaacılık Limited Şirket, Ankara, 43s, 2001.

HAREL, O.C. and STORZ, G., Roles of the glutathione and thioredoxin dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress, *Annual Review of Microbiology*, 54:439-461, 2000.

HAWKINS, C.L. and DAVIES, M.J., Hypochlorite-induced damage to DNA, RNA, and polynucleotides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals, *Chemical Research in Toxicology*, 15(1):83-92, 2002.

HAWKINS, C.L., REES, M.D. and DAVIES, M.J., Superoxide radicals can act synergistically with hypochlorite to induce damage to proteins, *FEBS Letters*, 510(1-2):41-44, 2002.

INATSU, Y., BARI, M.L., KAWASAKI, S., ISSHIKI, K. and KAWAMOTO, S., Efficacy of acidified sodium chlorite treatments in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on Chinese cabbage, *Journal of Food Protection*, 68(2):251-255, 2005.

JAMNIK, P., MEDVED, P. and RASPOR, P., Increased glutathione content in yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to NaCl, *Annals of Microbiology*, 56(2):175-178, 2006.

JOHNSON, J.L., ROSE, B.E., SHARAR, A.K., RANSOM, G.M., LATTUADA, C.P. and MCNAMARA, A.M., Methods used for detection and recovery of *E. coli* O157:H7 associated with a food-borne disease outbreak, *Journal of Food Protection*, 58(6):597-603, 1995.

JONES, D.P., Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging, *Rejuvenation Research*, 9:169-181, 2006.

JONES, D.P., Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance, *Methods in Enzymology*, 348:93-112, 2002.

JUVEN, B.J. and PIERSON, M.D., Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation, *Journal of Food Protection*, 59(11):1233-1241, 1996.

KELLY, R.T. and LOVE, N.G., The role of glutathione mediated oxidative stress response mechanisms in nitrifying bacteria, *Water Environment Foundation*, 6574-6592, 2006.

KULLMAN J.P., YU, T., CHEN, X., NEAL, R., ERCAL N. and ARMSTRONG, D.W. Resolution of chiral thiol compounds derivatized with N-(1-pyrenyl)-Maleimide and Thioglo<sup>TM</sup>3, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 23(13):1941-1952, 2000.

LIANG, G., DU, G. and CHEN, Enhanced glutathione production by using low pH stress coupled with cysteine addition in the treatment of high cell density culture of *Candida utilis*, *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254, 46:507–512, 2008.

LIANG, G., DU, G. and CHEN, J., Salt-induced osmotic stress for glutathione overproduction in *Candida utilis*, *Enzyme and Microbial Technology*, 45:324–329, 2009.

LITHGOW, J.K., HAYHURST, E.J., COHEN, G., AHARONOWITZ, Y. and FOSTER, S.J., Role of a cysteine synthase in *Staphylococcus aureus*, *Journal of Bacteriology*, 186(6):1579-90, 2004.

LOEWEN, P.C., Levels of glutathione in *Escherichia coli*, *Canadian Journal of Biological Chemistry*, 57:107-111, 1979.

LU, S.C., Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies, *FASEB Journal*, 13:1169-83, 1999.

LUPPENS, S.B., BARBARAS, B., BREEUWER, P., ROMBOUITS, F.M. and ABEE, T., Selection of fluorescent probes for flow cytometric viability assessment of *Listeria monocytogenes* exposed to membrane-active and oxidizing disinfectants, *Journal of Food Protection*, 66(8):1393–1401, 2003.

MALLI, R. and EPSTEIN, W., Expression of the Kdp ATPase is consistent with regulation by turgor pressure, *Journal of Bacteriology*, 180(19):5102–5108, 1998.

MASIP, L., VEERAVALLI, K. and GEORGIU, G., Forum Review The Many Faces of Glutathione in Bacteria , *Antioxidants Redox Signal*, 8(5-6):753-62, 2006.  
McCLURE, P., The impact of *E. coli* O157 on the food industry, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16:749-755, 2000.

McLAGGAN, D., LOGAN, T.M., LYNN, D.G. and EPSTEIN, W., Involvement of gamma-glutamyl peptides in osmoadaptation of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 172(7):3631–3636, 1990.

MEISTER, A. and ANDERSON, M.E., Glutathione, *Annual Review of Biochemistry*, 52:711-760, 1983.

MEISTER, A., Selective modification of glutathione metabolism, *Science*, 220:472–477, 1983.

MOAT, G.A., FOSTER, W.J. and SPECTOR, P.M., *Microbial Physiology*, Wiley-Liss Incorporation, ISBN:0-471-39483-1, 582-611, 2002.

MURATA, K. and KIMURA A., Some properties of glutathione biosynthesis-deficient mutants of *Escherichia coli* B, *Journal of General Microbiology*, 128(5):1047-1052, 1982.

NEIDHARDT, F.C. and VANBOGELEN, R.A., Proteomic analysis of bacterial stress response, in bacterial stress responses. G. Storz and R. Hengge-Aronis, Eds. Washington, DC.: American Society for Microbiology Press, 445-452, 2000.

NEWTON, G.L., RAWAT, M.L.A., CLAIR J.J., JOTHIVASAN, V.K., BUDIARTO, T., HAMILTON C.J., CLAIBORNE, A., HELMANN, J.D. and FAHEY, R.C., Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in *Bacilli*, *Nature Chemical Biology*, 5(9):625-627, 2009.

PADHYE, N.V. and DOYLE, M.P., *Escherichia coli* O157:H7:epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food, *Journal of Food Protection*, 55(7): 555-565, 1992.

RYU, J.H., DENG, Y. and BEUCHAT, L.R., Behavior of acid adapted and unadapted *E. coli* O157:H7 when exposed to reduced pH achieved with various organic acids, *Journal of Food Protection*, 62(5):451-455, 1999.

SANDER, J.E. and WILSON, J.L., Effect of Hydrogen Peroxide disinfection during incubation of chicken eggs on microbial levels and productivity, *Avian Diseases*, 43(2):227-233, 1999.

SCATINA, J., ABDEL-RAHMAN, M.S. and GOLDMAN, E., The inhibitory effect of Alcide, an antimicrobial drug, on protein synthesis in *Escherichia coli*, *Journal of Applied Toxicology*, 5(6):388-394, 1985.

SCHAFER, F.Q. and BUETTNER, G.R., Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11):1191-1212, 2001.

SEN, C.K. and PACKER, L., Thiol homeostasis and supplements in physical exercise, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72:653S-669S, 2000.

SHE, Z.W., MAYS, D.C., SAGONE, A.L. and DAVIS, W.B., Aminobenzoic acid compounds as HOCl traps for activated neutrophils, *Free Radical Biology and Medicine*, 22(6):989-998, 1997.

SHOVELLER, A.K., STOLL, B., BALL, R.O. and BURRIN, D.G., Nutritional and functional importance of intestinal sulphur amino acid metabolism, *Journal of Nutrition*, 135:1609-1612, 2005.

SMIRNOVA, G.V. and OKTYABRSKY, O.N., Glutathione in Bacteria, *Biochemistry (Moscow)*, 70(11):1199-1211, 2005.

SMIRNOVA, G.V., KRASNYKH, T.A. and OKTYABRSKY, O.N., Role of glutathione in the response of *Escherichia coli* to osmotic stress, *Biochemistry (Mosc)*, 66(9):973–978, 2001a.

SMIRNOVA, G.V., MUZYKA, N.G. and OKTYABRSKY, O.N., Effects of cystine and hydrogen peroxide on glutathione status and expression of antioxidant genes in *Escherichia coli*, *Biochemistry (Moscow)*, 70(8):926-34, 2005.

SMIRNOVA, G.V., MUZYKA, N.G. and OKTYABRSKY, O.N., The role of antioxidant enzymes in response of *Escherichia coli* to osmotic upshift, *FEMS Microbiology Letters*, 186(2):209–213, 2000.

SMIRNOVA, G.V., ZAKIROVA, O.N. and OKTYABRSKY, O.N., The Role of Antioxidant Systems in the Response of *Escherichia coli* to Heat Shock, *Microbiology*, 70(5):512-518, 2001b.

SUGIYAMA, K., IZAWA, S. and INOUE, Y., The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 275:15535-15540, 2000.

SUZUKI, H., KUMAGAI, H. and TOCHIKURA, T., Isolation, genetic mapping, and characterization of *Escherichia coli* K-12 mutants lacking gamma-glutamyltranspeptidase, *Journal of Bacteriology*, 169(9):3926-3931, 1987.

WINTERS, R., ZUKOWSKI, J., ERCAL, N., MATTHEWS, R. H. and SPITZ, D.R., Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine, and other biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by N-(1-pyrenyl) maleimide, *Analytical Biochemistry*, 22:14-21, 1995.

WOODWARD, G.E., CXLI. Hydrolysis of glutathione by blood serum, *Biochemistry*, 1171-1174, 1939.

WU, G., FANG, Y.Z., YANG, S., LUPTON, J.R. and TURNER, N.D., Glutathione metabolism and its implications for health, *Journal of Nutrition*, 134:489–492, 2004.

YOUSEF, A.E. and COURTNEY, P.D., Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods, “Microbial Stress Adaptation and Food Safety” AE Yousef and VK Juneja (Editors), Chemical Rubber Company Press, 1–25, 2003.

ZHANG, Y., ZHANG, Y., ZHU, Y., MAO, S. and LI, Y., Proteomic analyses to reveal the protective role of glutathione in resistance of *Lactococcus lactis* to osmotic stress, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10):3177-3186, 2010.

ZIEGLER, D.M., Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation, *Annual Review of Biochemistry*, 54:305-329, 1985.

## ÖZGEÇMİŞ

Nihal Kanat, 15.07.1979'da Karamürsel'de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Karamürsel'de tamamladı. 1996 yılında Karamürsel Lisesinden mezun oldu. 2002 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünü bitirdi. 2003-2004 yılları arasında Akant Sanayi ve Tic. Ltd. Şti.nde kalite güvence sorumlusu olarak çalıştı. 2004-2010 yılları arasında Kafkas Pasta ve Şekerleme A.Ş'de mamül üretim sorumlusu olarak çalıştı. 2011 yılında Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde yüksek lisansa başladı.