

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Lactobacillus delbrueckii* BAKTERİYOFAJI LL-H'NİN KONAKÇI
SPEKTRUMU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Özge GÖKÇE**

Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği

Programı: Gıda Mühendisliği

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Oğuz GÜRSOY
İkinci Danışman: Prof. Dr. Tapani ALATOSSAVA**

AĞUSTOS 2010

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Özge GÖKÇE tarafından Yrd. Doç. Dr. Oğuz GÜRİSOY ve Prof. Dr. Tapani ALATOSSAVA yönetiminde hazırlanan “*Lactobacillus delbrueckii* Bakteriyofajı LL-H’nin Konakçı Spektrumu” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON
Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Harun KESENKAŞ
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Oğuz GÜRİSOY
Jüri Üyesi (Danışman)


Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
22.10.2019 tarih ve 24/114 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Halil KARAHAN
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İnza

: 

Öğrenci Adı Soyadı : Özge GÖKÇE

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince beni yönlendiren ve deneyimlerinden yararlandığım, bu projede yer almamı sağlayan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuz GÜRSOY ve bütün tecrübesi ve bilgi birikimiyle laboratuvar çalışmalarımı düzenleyen proje ikinci danışmanı Helsinki Üniversitesi, Gıda ve Çevre Bilimleri Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Tapani ALATOSSAVA'ya ve Süt Ürünleri Araştırma Grubunda bulunan, özellikle analizlerin yapımı aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana yol gösteren Sayın Dr. Patricia Munsch-ALATOSSAVA ve Sayın Lourdes MATO-RODRIGUEZ'e (MSc) çok teşekkür ederim.

Çalışmayı destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (PAÜ BAP Proje No: 2010FBE005) teşekkür ederim. Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü ve Helsinki Üniversitesi, Tarım ve Ormancılık Fakültesi, Gıda ve Çevre Bilimleri Bölümü, Süt Teknolojisi Araştırma Grubu (Helsinki, Finlandiya) işbirliği ile gerçekleştirilmiştir. İlgili bölümlerde bulunan ve çalışmamıza katkısı olan hocalarıma ve manevi desteklerini hissettiğim Helsinki Üniversitesi'nden çalışma arkadaşlarım Felix ROST, Bhawani CHAMLAGAIN, Shi QIAO, Erica PONTONIO, Xueshen ZU ve Burak ÖZEL'e teşekkür ederim. Ayrıca gülyüzlülüğü ve cana yakınlığıyla laboratuvar çalışmalarımı daha neşeli kılan Sayın Kaisa RAUTAPALO'ya çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın tüm çalışmalarında bana her zaman maddi ve manevi açıdan destek olan, varlıklarıyla beni cesaretlendiren, çok sevdiğim aileme çok teşekkür ederim.

Ağustos 2010

Özge GÖKÇE

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Bilimsel Etik Sayfası	ii
Önsöz.....	iii
İçindekiler	iv
Tablo Listesi	vi
Şekil Listesi	vii
Özet	ix
Summary.....	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Bakteriyofajların Yapısı ve Özellikleri.....	7
1.2. Bakteriyofajların Yaşam Şekilleri.....	13
1.2.1. Litik yaşam döngüsü.....	15
1.2.2. Lizojenik yaşam döngüsü.....	18
1.3. Faj Gelişme (replikasyon) Parametreleri.....	20
1.4. Fajlara Karşı Direnç Mekanizmaları.....	21
1.4.1. Adsorbsiyonun bloke edilmesi.....	22
1.4.2. Restriksiyon (sınırlama, kısıtlama) / modifikasyon sistemleri (R / M)	22
1.4.3. Sonuçsuz bırakılan enfeksiyon (abortif enfeksiyonlar).....	23
1.4.4. Lizojenik bağışıklık.....	23
1.5. Bakteriyofajların Süt Teknolojisinde Yarattığı Sorunlar.....	23
1.5.1. Fajların peynir teknolojisinde yarattığı sorunlar.....	24
1.5.2. Fajların yoğurt teknolojisinde yarattığı sorunlar.....	25
1.5.3. Fajların tereyağ teknolojisinde yarattığı sorunlar.....	26
1.6. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> LL-H Bakteriyofajı	26
2. MATERYAL VE METOT	30
2.1. Materyal.....	30
2.1.1. Bakteriyofaj.....	30
2.1.2. Bakteri Kültürleri.....	30
2.2. Metot.....	31
2.2.1. Bakteriyofaj LL-H'nin aktivasyonu.....	31
2.2.2. Bakteri kültürlerinin aktivasyonu.....	32
2.2.3. Adsorbsiyon testi.....	32
2.2.4. LL-H fajının adsorbsiyonu üzerine hücrenin gelişme evresinin etkisi.....	35
2.2.5. Bakır ilavesinin faj adsorbsiyonuna etkisinin belirlenmesi.....	35
2.2.6. Alkali koşulların (pH=8.5) faj adsorbsiyonuna etkisinin belirlenmesi.....	35
2.2.7. Faj plak etkinliğinin belirlenmesi.....	38
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	39

3.1. LL-H Fajının Konakçı Spektrumu.....	39
3.1.1. <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> suşları ile elde edilen adsorbsiyon eğrileri.....	39
3.1.2. <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> suşları ile elde edilen adsorbsiyon eğrileri.....	42
3.1.3. <i>Lb. helveticus</i> suşları ile adsorbsiyon eğrileri.....	44
3.2. <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 15808 Suşunun Faj Adsorbsiyonu Üzerine Hücrenin Gelişme Evresinin Etkisi.....	47
3.3. <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 15808 Suşunun Faj Adsorbsiyonu Üzerine Bakır İlavesinin Etkisi.....	48
3.4. Alkali Koşulların (pH=8.5) Faj Adsorbsiyonuna Etkisi.....	49
3.5. Faj Plak Etkinliği.....	51
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	58

TABLO LİSTESİ

Tablolar

	Sayfa
1.1 : Faj temel özellikleri ve sınıflandırılması-Ackermann Sınıflaması.....	5
1.2 : Süt endüstrisinde karşılaşılan bazı fajların taksonomik durumları.....	11
2.1 : Araştırmada kullanılan bakteri suşları ve kaynakları.....	31

ŞEKİL LİSTESİ

Şekiller

	Sayfa
1.1 : Faj tarihinin dönüm noktaları	2
1.2 : Bradley'in faj sınıflandırması.....	4
1.3 : Tipik bir kuyruklu bakteriyofajın 2 ve 3 boyutlu yapısı.....	8
1.4 : Bakteriyofajların morfolojik yapıları.....	10
1.5 : Gıda zincirinde faj uygulamalarına örnekler	11
1.6 : Faj yaşam döngüsü.....	14
1.7 : Bir bakteriyi enfekte etmek üzere ona bağlanmakta olan bakteriyofajların şematik gösterimi.....	16
1.8 : LL-H bakteriyofajının elektron mikroskopundaki görünümü.....	27
2.1 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 15808 suşunun 600 nm'deki optik yoğunluğunun zamana bağlı değişimi.....	33
2.2 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 15808 suşunun 10mM CaCl ₂ içeren MRS broth'daki çoğalma eğrisi.....	33
2.3 : TRİS muameleli kültürde adsorbsiyon kinetiği analizi.....	37
3.1 : Logaritmik fazdaki <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 15808 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi.....	39
3.2 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> LKT suşuna ait adsorbsiyon eğrisi.....	40
3.3 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> LL 23 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi	40
3.4 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> CNRZ 327 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi...	41
3.5 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> CRL 934 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi.....	41
3.6 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> LL78 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi.....	42
3.7 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> YC380 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi...	42
3.8 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LB S jarvi suşuna ait adsorbsiyon eğrisi.....	43
3.9 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> MK 9 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi....	43
3.10 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LB 120 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi	44
3.11 : <i>Lb. helveticus</i> 1129 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi.....	44
3.12 : <i>Lb. helveticus</i> 1175 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi.....	45
3.13 : <i>Lb. helveticus</i> 1518 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi	45
3.14 : <i>Lb. helveticus</i> AKI 4 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi.....	46
3.15 : <i>Lb. helveticus</i> ATCC 15009 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi	46
3.16 : Logaritmik fazdaki (■, n=4) ve durağan fazdaki (▲, n=2) <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 15808 suşuna ait adsorbsiyon eğrileri	47
3.17 : <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 15808 suşu logaritmik faz (a) ve durağan faz (b) için LL-H bakteriyofajı kullanılarak 0.dakikada elde edilen plaklar	48

3.18 : Logaritmik fazdaki (■, n=4) ve 1mM CuSO4 ilaveli (▲, n=2) <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 15808 suşuna ait adsorbsiyon eğrileri...	49
3.19 : Alkali ortamda 24 saat bekletilen (▲) ve bekletilmeyen (■, 10 mM Ca'lu) <i>Lb. lactis</i> CRL 934 suşuna ait adsorbsiyon eğrileri.....	50
3.20 : Alkali ortamda 24 saat bekletilen (▲), bekletilmeyen (■, 10 mM Ca'lu) ve alkali ortamda 2 saat bekletilen (◆) <i>Lb. lactis</i> CRL 934 suşu ile 1, 3, 10. dakikalar için adsorbsiyon eğrileri.....	50
3.21 : Alkali ortamda 24 saat bekletilen (▲) ve bekletilmeyen (■, 10 mM Ca'lu) <i>Lb. helveticus</i> ATCC 15009 suşuna ait adsorbsiyon eğrileri...	51

ÖZET

***Lactobacillus delbrueckii* BAKTERİYOFAJI LL-H'NİN KONAKÇI SPEKTRUMU**

Bu çalışmada, 7 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, 6 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve 5 *Lactobacillus helveticus* suşu kullanılarak *Lactobacillus delbrueckii* bakteriyofajı LL-H'nin konakçı spektrumu incelenmiştir. Her bir suş için çift tabakalı plak titresi (double-layer plaque assay) yöntemi kullanılarak en az 2 tekrar ile adsorbsiyon kinetiği incelenmiştir. Adsorbsiyon kinetiğini incelemek için 0, 3, 10, 30 ve 50. dakikalar dikkate alınarak adsorbsiyon eğrileri oluşturulmuştur. *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 539, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LT4 ve HAMB1449 suşları, lizojenik karakter gösterdiği için adsorbsiyon eğrisi oluşturulamamıştır. *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşu için 1mM CuSO₄ ilaveli koşullarda çalışılarak bakır elementinin adsorbsiyon kinetiği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ayrıca orta hızlı adsorbsiyon gözlenen *Lb. lactis* CRL 934 ve mevcut *Lb. helveticus* suşları içinde adsorbsiyon gözlenmeyen tek suş olan *Lb. helveticus* ATCC 15009 bakterilerinin sırasıyla adsorbsiyon hızını arttırmak ve adsorbsiyonu mümkün kılabilmek hedefiyle, alkali koşullarda (pH 8.5) çalışılmıştır. Genel itibariyle, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ve *Lb. helveticus* suşlarının *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarına kıyasla LL-H fajına daha duyarlı oldukları gözlenmiştir. Çalışma ortamına bakır ilavesi *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşunun gelişme hızını yavaşlatıcı bir etki gösterirken adsorbsiyon kinetiğinde herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. Bakteri hücre duvarındaki D-alanil miktarını azaltarak faj adsorbsiyonunun arttırılması için yapılan denemelerde alkali muamelesinin fajın *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 934'e adsorbsiyonunu arttırdığı fakat *Lb. helveticus* ATCC 15009'a adsorbsiyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Logaritmik fazdaki veya durağan fazdaki bakteri kültürü kullanımı adsorbsiyon kinetiğini etkilememesine rağmen durağan fazdaki kültür faj plakları büyüklüğünde belirgin bir artışa yol açmıştır.

SUMMARY

THE HOST RANGE of *Lactobacillus delbrueckii* BACTERIOPHAGE LL-H

The host range of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophage LL-H was investigated using 7 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, 6 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and 5 *Lactobacillus helveticus* strains. For each strain, at least twice adsorption kinetics was studied by double-layer plaque assay method. To determine adsorption kinetics, adsorption curves were formed at 0, 3, 10, 30 and 50th minutes. It was not possible to construct adsorption curves for *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 539, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LT4 and HAMB1449 strains because of the lysogenic properties of these strains. Adsorption kinetics of *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 in the presence of 1mM CuSO₄ was also studied to determine the effect of copper on the adsorption kinetics of this strain. Moderate adsorption rate was observed for *Lb. lactis* CRL 934 while no adsorption was found for *Lb. helveticus* ATCC 15009. To increase the adsorption rate of the former strain and to improve adsorption property of the latter strain, adsorption kinetics was studied under alkali conditions (pH 8.5). In general, strains of *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* and *Lb. helveticus* were more sensitive to LL-H phage than *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. The presence of copper reduced the growth rate of *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808, causing insignificant effect on adsorption kinetics. Experiments on the improvement of phage adsorption by reducing D-alanyl content of cell wall indicated that alkali treatment increased adsorption of the phage to *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 934. However, this treatment was ineffective on the adsorption to *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 934. Although the use of bacterial culture on logarithmic or stationary phases did not affect the adsorption kinetics, bacterial culture on stationary phases increased the sizes of phage plaques significantly.

1. GİRİŞ

Bakteriyofaj, Yunanca bir kelime olup “bakteri yiyen” anlamına gelmektedir (Ergüllü 1982, Kınık vd 2000, Kılıç 2008). Bakteriyofaj ya da kısaca faj, bakterilere adsorbe olarak onları öldüren spesifik viral patojenik ajanlardır (Kınık vd 2000, Mc Grath vd 2007, Kılıç 2008). Fajlar, canlı bakteri hücresi içinde çoğalmaktadırlar ve bakteri hücresinden ayrıldıkları zaman metabolizma faaliyetlerini sürdürememektedirler (Kılıç 2008). Fajlar bitkiler, hayvanlar ve insanlar gibi ökaryotik canlıları enfekte etmemektedirler (Ergüllü 1982, Kınık vd 2000, Kılıç 2008).

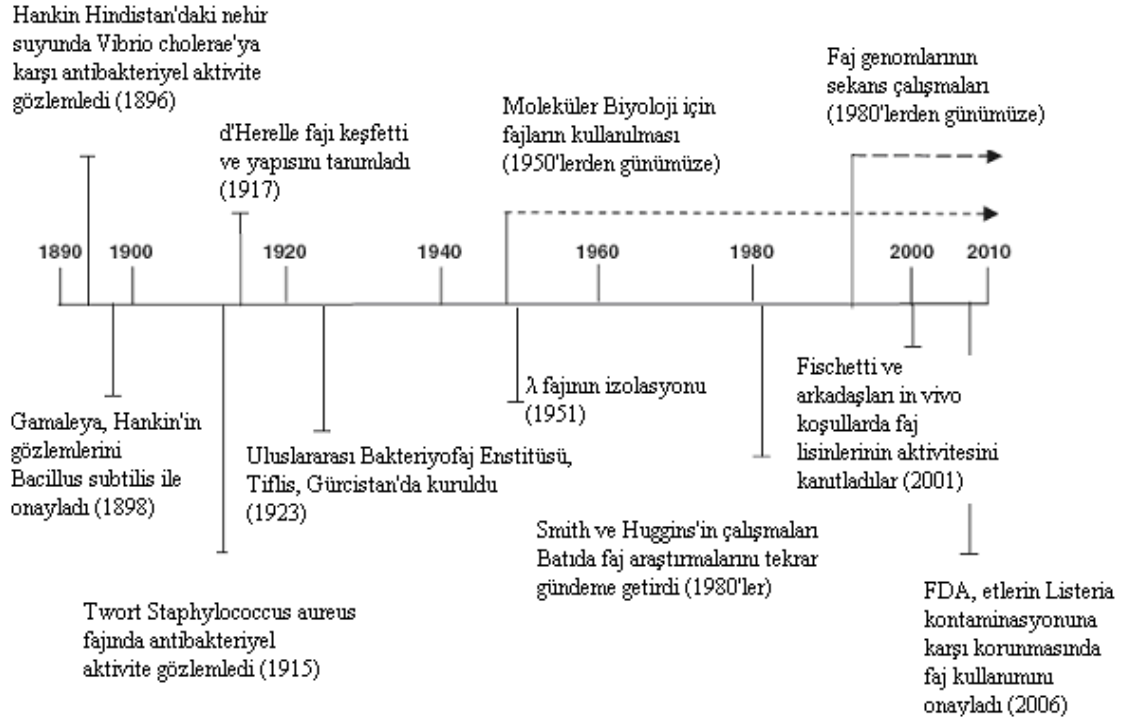
Fajların tahmini 10^{31} birey ile (Mc Grath vd 2007) yeryüzünde en çok bulunan biyolojik varlık olduğu iddia edilmektedir (Stone 2002, Mc Grath vd 2007, Labrie vd 2010). Fajlar doğada; okyanuslar, çöller, Antartik göller, termal sular, insan bağırsak sistemi, süt işletmeleri (Mc Grath vd 2007) toprak, gübre, hava ve kirli sular (Ergüllü 1982) gibi çok geniş bir alanda bulunabilmektedir.

Bakteriyofajların büyüklükleri virüslere benzemektedir. Bu nedenle ancak elektron mikroskobu ile incelenebilmektedirler (Ergüllü 1982, Kınık vd 2000, Kılıç 2008, 2010). Orta büyüklükte bir fajın hacmi, içinde çoğaldığı bakteri hücresinin hacminin 1/1000 kadarıdır ve nanometre (nm) ile ölçülmektedir (Ergüllü 1982, Kılıç 2008). Bundan dolayı doğrudan değil dolaylı olarak gösterdikleri aktiviteleri izlenerek varlıkları tespit edilebilmektedir (Kılıç 2010).

Fajların tanımlanması ve sınıflandırılması; fajların evrimsel gelişmelerinin açıklanmasına, filogenetik çalışmaların yapılabilmesine olanak sağladığı gibi, tedavi ve endüstriyel amaçlı yararlı fajlar ile fermentasyon proseslerinde ortaya çıkan zararlı fajların bir sistematik içinde değerlendirilmesine de yardımcı olmaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009a).

Bakteriyofajlar ile ilgili ilk gözlemler, 1896 yılında M. Ernest Hankin tarafından yapılmıştır (Kutter 1997, Stone 2002, Durupınar 2005, Adhya ve Merril 2006, O’Flaherty vd 2009). Hankin Hindistan’daki Ganj ve Jumma nehir sularında *Vibrio cholerae*’ye karşı faj kaynaklı antibakteriyel aktivite gözlemlemiştir (Stone 2002,

Adhya ve Merril 2006, O'Flaherty vd 2009). 1898 yılında ise Gamaleya, *Bacillus subtilis* ile yaptığı çalışmalarla Hankin'i onaylamıştır (O'Flaherty vd 2009). Şekil 1.1'de faj tarihindeki önemli gelişmeler özetlenmiştir.



Şekil 1.1 : Faj tarihinin dönüm noktaları (O'Flaherty vd 2009)

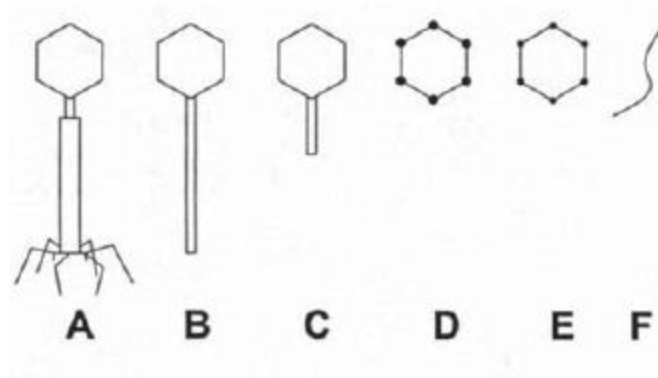
1915 yılında Frederick W. Twort mikrokokların geliştikleri katıbesiyerindeki kültürlerde meydana gelen erimeleri tespit etmiştir (Kutter 1997, Kınık vd 2000, Stone 2002, Adhya ve Merril 2006, Kılıç 2008). Bu çalışmadan 2 yıl sonra Felix d'Herelle, Pastör Enstitüsü'nde *Shigella*'larla çalıştığı sırada benzer bir olayla karşılaşmıştır. Böylelikle d'Herelle bakteriyofajları keşfetmiş ve "bakteri yiyen" anlamında isimlendirmiştir (Kutter 1997, Kınık vd 2000, Duckworth ve Gulig 2002, Stone 2002, Adhya ve Merril 2006, Kılıç 2008).

Fajlar keşfedildikleri 20. yüzyılın başından sonra insan ve hayvanlardaki çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Batı'nın fajların terapötik kullanımına olan ilgisi azalsa da Doğu Avrupa ülkelerinde çalışmalar süregelmiştir. Ancak bakteriler arasındaki antibakteriyel aktivitenin hızla artış göstermesi fajların

terapötik amaçla kullanımını tekrar tüm dünyada gündeme getirmiştir (Duckworth ve Gulig 2002).

d'Herelle ve çalışma arkadaşları fajların terapi amacıyla kullanımına yönelik olarak özellikle Hindistan, Mısır, Amerika Birleşik Devletleri ve Sovyetler Birliği'nde çalışmalar yapmışlardır (Adhya ve Merrill 2006). d'Herelle, bakteriyofajları terapötik amaçlı olarak ilk kez dizanteri tedavisinde kullanmıştır (Duckworth ve Gulig 2002, Stone 2002, Durupınar 2005). Alman Behringwerke şirketi II. Dünya Savaşı boyunca dizanteri tedavisinde kullanılması amacıyla "polyfagin" adlı faj preparatı üretmiştir (Adhya ve Merrill 2006). Ayrıca Rus askerleri II. Dünya Savaşı süresince yara ya da dizanteri tedavisi için yanlarında faj preparatları taşımışlardır. Polonya'da da fajlar terapötik amaçlı olarak kullanılmıştır. Son yapılan çalışmalar, fajların pek çok farklı bakteri enfeksiyonunun tedavisinde önemli düzeyde etkili olduğunu göstermiştir. Ancak tüm fajların terapötik etkili olmayacağına dair çeşitli nedenler vardır. *V. vulnificus* ile yapılan çalışmalar memeli konakçı ortamında bulunan bakterilere karşı bazı fajların aktiviteye sahip olmadığını göstermiştir. Ayrıca fajların terapötik amaçlı kullanımı bazı potansiyel problemlere neden olabilmektedir. Temperent fajların bakteri hücreleri arasında genetik bilgileri transfer etmesi antibakteriyel ajanlara dayanıklı genlerin bakteri popülasyonu arasında yayılmasına neden olabilmektedir. Ancak bu durum faj laboratuvar koşullarında test edilerek çözüme ulaştırılabilmektedir. Bununla birlikte temperent fajların faj terapisinde kullanımı sınırlı düzeydedir (Duckworth ve Gulig 2002).

Elektron mikroskopunda ve preparat hazırlama tekniklerinde kaydedilen gelişmeler sayesinde 1967 yılında Bradley, taşıdıkları nükleik asit tipine (Acar Soykut ve Tunail 2009a), konakçı aralığına (Forde ve Fitzgerald 1999) ve morfolojik yapılarına (Forde ve Fitzgerald 1999, Acar Soykut ve Tunail 2009a) göre fajları 6 basit tipe (A-F) ayırmıştır. 1971 yılından bu yana geçerliliğini koruyan Bradley sınıflamasına göre 6 faj morfotipinin varlığı kabul edilmiştir (Acar Soykut ve Tunail 2009a). Şekil 1.2'de Bradley'in faj sınıflandırılması görülmektedir.



Tip	Nükleik Asit	Özellik	Örnek
A	DNA, 2, L	Polihedral baş, uzun kuyruk etrafında kontraktıl kılıf kuyruk levhası (hegzaganol) kuyruk iğnesi ve fibrilleri	T2, T4, T6
B	DNA, 2, L	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan uzun kuyruk	T1, T5, λ
C	DNA, 2, L	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan kısa kuyruk	T3, T7, P22
D	DNA, 1, C	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok büyük kapsomer	Φ X174, S13
E	RNA, 1, L	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok küçük kapsomer	F2R17, Fr, MS2
F	RNA, 1, L	Fleksibl filamentöz	FE, fd, M13

1: Tek iplikçik L: Lineer

Şekil 1.2 : Bradley'in faj sınıflandırması (Ackermann 2003, Acar Soykut ve Tunail 2009a)

Daha sonraki yıllarda fajların morfolojik özellikleri yanında nükleik asit yapılarının da dikkate alındığı "Ackermann Sınıflaması" olarak adlandırılan, diğer bir sınıflama modeli geliştirilmiştir (Tablo 1.1) (Acar Soykut ve Tunail 2009a).

Tablo 1.1 : Faj temel özellikleri ve sınıflandırılması-Ackermann Sınıflaması
(Ackermann 2003, 2007, Acar Soykut ve Tunail 2009a)

Morfoloji	Nükleik Asit	Takım ve Familyalar	Cins	Örnek	Üye Sayısı	Özellikleri
Kuyruklu	DNA, ds, L	Caudovirales	15		4950	
		Myoviridae	6	T4	1243	Kontraktıl kuyruk
		Siphoviridae	6	λ	3011	Uzun kuyruk
		Podoviridae	3	T7	696	Kısa kuyruk
Polihedral	DNA, ss,C	Microviridae	4	Φ X174	40	Lipid içeren kompleks
		Corticoviridae	1	PM2	3?	Kapsid
	ds,C, T	Tectiviridae	1	PRD1	18	Lipoprotein kaplı
	ds, L	Leviviridae	2	MS2	39	Kapsid
		Cystoviridae	1	Φ 6	1	Lipid zarf
Filamentöz	DNA, ss, C	Inoviridae	2	Fd	57	Uzun veya kısa
		Lipothrixviridae	1	TTV1	6?	Filament
		Rudiviridae	1	SIRV1	2	Lipid zarf TMV benzeri yapı
Pleomorfik	DNA,ds,C,T	Plasmaviridae	1	L2	6	Kapsid Yok, Lipid Zarf
		Fuselloviridae	1	SSV1	8?	Kapsid Yok, LimonFormlu

ds: çift sarmal, C: sirküler; S: parçalı; ss: tek sarmal, L: lineer; T: süper helikal

Hibridizasyon analizlerinde sağlanan gelişmeler özellikle laktokok fajlarının sınıflandırılmasında etkili olmuştur (Forde ve Fitzgerald 1999). Forde ve Fitzgerald'ın (1999) bildirdiğine göre Jarvis vd (1991) morfolojik yapılarına göre 12 laktokok fajı tanımlamışlardır ve süt endüstrisinde çok sık rastlanan fajların küçük izometrik baş

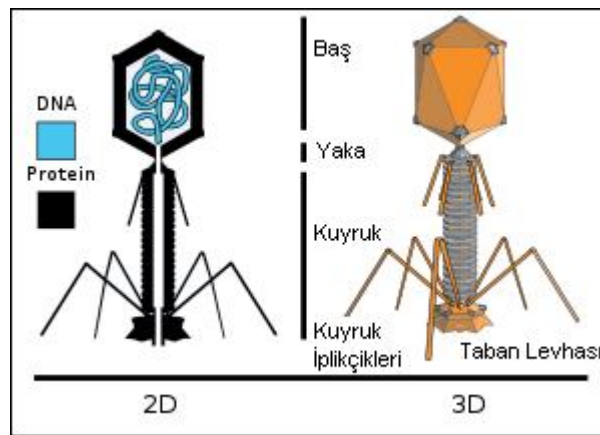
yapısına (936 tür) sahip olduğunu belirtmişlerdir. 1959 yılından 1990 yılına kadar 3400, günümüze kadar ise yaklaşık 5100 adet değişik bakteri türlerine özgül faj; dört yapısal gruba ayrılmış ve 1 takım, 13 aile ve 31 cins olarak karakterize edilmiştir (Acar Soykut ve Tunail 2009a). Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV, International Committee of Taxonomy of Viruses) fajları nükleik asit yapıları ve morfolojilerine göre 14 aileye ayırmıştır (Anonim 2009). Bugün için tüm fajları 20 morfotipte toplamak mümkündür (Tunail 2009).

Bugüne kadar incelenmiş olan yaklaşık 5100 adet fajın çoğu (%96), Bradley ve Ackermann sınıflamalarına göre Siphoviridae familyasında bulunmaktadır. Yoğurt yapımında kullanılan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül termofilik fajlar da ikosahedral kapside, kontraktil (kasılabilme özelliği) olmayan uzun kuyruğa sahip olmaları nedeniyle Bradley sınıflaması B grubuna ve lineer çift sarmal DNA içermelerinden dolayı Ackermann sınıflaması Siphoviridae familyasına dahil edilmişlerdir. Günümüzde fajlar, ICTV, tarafından oluşturulan ve politetik türler kavramı olarak adlandırılan, taşınabilir kriterler seti ile aileye kadar sınıflandırılabilmektedir. Virüslerin cins ve tür bazında ayrımı için belirgin bir kriter bulunmamaktadır. Politetik türler kavramında, bir faj türü, belirlenmiş özelliklerden tamamını veya bir kısmını taşıyarak tanımlanabilmektedir. Nükleik asit doğası, partikül yapısı, DNA-DNA hibridizasyonu, nükleotit veya aminoasit dizilimleri gibi parametreler bu sınıflandırma sistemi için kullanılabilir. Ayrıca fajlar, yapılan farklı araştırmalarda, konakçı özgüllükleri, restriksiyon endonükleaz kesim şablonları, DNA hibridizasyon ve sekans analizleri, yapısal protein profilleri ve serolojik test sonuçlarına göre sınıflandırılmakta ancak her bir çalışmada elde edilen sonuçlar kendi içinde değerlendirildikten sonra diğer çalışma sonuçları ile karşılaştırılmaya çalışılmaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009a). Laktik asit bakteri fajlarının konakçı özgüllüğünü Guanin + Sitozin içeriği etkilemektedir. Bu durumun laktokok fajlarındaki etkisi yaklaşık % 37 iken *Lactobacillus casei* fajlarındaki oranı % 48'dir (Forde ve Fitzgerald 1999).

1.1 Bakteriyofajların Yapısı ve Özellikleri

Bakteriyofajların kimyasal yapısını protein ve nükleik asit oluşturmaktadır. Fajlar ancak bir tip nükleik asit içermektedir. Fajların çoğunda DNA bulunmakla birlikte bazı fajlar yalnızca RNA içermektedir. Fajların kuru ağırlığının yaklaşık %60'ı protein, %40'ı nükleik asittir ve faj ancak nükleik aside özgü şekilde çoğalmaktadır (Ergüllü 1982, Kılıç 2008). Fajlar, enerji üretme gücünde olan ajanları sentezlemeye yarayan hiçbir genetik bilgi üretememektedirler. Bu nedenle zorunlu olarak parazit gibi yaşadığı konakçı bakteriye gereksinimi vardır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008) Yapılarında lipit bulunmadığı için bakterileri hızla öldüren kloforma dayanıklıdır. Bu özelliğinden yararlanarak fajları bakteri ortamından ayırmak mümkün olur. Fajların çoğu 37°C'de gelişmektedir. Optimum pH istekleri 6-6.5'tur. Bir fajın ağırlığı 5×10^{-13} gramdır (Kılıç 2008).

Tipik bir faj baş, boyun, kuyruk, taban ve taban uzantıları gibi kısımlardan oluşmaktadır. Baş kısmı yumak şeklinde bir yapı oluşturan nükleik asit moleküllerini bulundurmaktadır. Nükleik asit molekülleri bir protein kılıf tarafından sarılmıştır. Kapsit adı verilen bu protein kılıf, prizma şeklinde bir yapı oluşturmak üzere bir araya gelen, birbirine benzer alt birimlerden meydana gelmiştir (Douglas 1975, Ergüllü 1982, Kılıç 2008, 2010). Başın kesiti alındığında, genellikle altıgen bir görünüm ortaya çıkmaktadır (Ergüllü 1982). Şekil 1.3'de tipik bir kuyruklu bakteriyofajın 2 ve 3 boyutlu yapısı görülmektedir (Anonim 2010a).



Şekil 1.3 : Tipik bir kuyruklu bakteriyofajın 2 ve 3 boyutlu yapısı (Anonim 2010a)

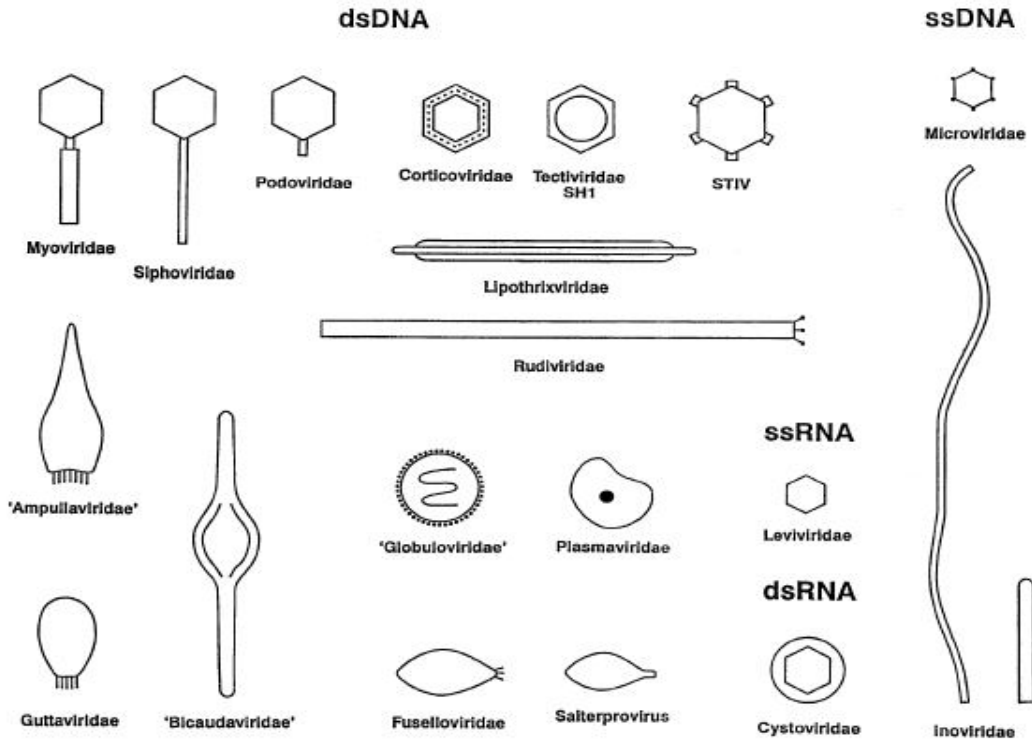
Faj kuyruğu değişik fajlarda büyük farklılıklar göstermekle beraber, genellikle 50-100 nm uzunluğunda ve 30 nm kalınlığındadır. Kuyruk ucunda altıgen şeklinde olan terminal bir taban levhası bulunmaktadır. Bu levhaya kuyruk dikenleri ve iplikçikleri yerleşmiş durumdadır. Taban levhasında genellikle 6 adet diken ve / veya 6 adet kuyruk iplikçiği yer almaktadır (Ergüllü 1982, Kınık vd 2000). Bir fajın baş, kuyruk ve kuyruk tablasındaki farklı yapıdaki proteinlerden meydana geldiği tespit edilmiştir. Farklı morfolojik özelliklere sahip fajlar ise farklı protein profilleri göstermektedir (Ergüllü 1982, Kınık vd 2000, Kılıç 2008).

Diğer canlılarda olduğu gibi fajların da antijenik özellikleri onların proteinlerine bağlıdır. Bu yüzden bir fajda baş, boyun ve kuyruk iplikçiklerini oluşturan proteinler antijenik yapıları bakımından birbirinden farklıdır. Yapılan çalışmalar baş proteinlerine karşı elde edilen antiserumların fajların adsorbsiyonunu önlemediği halde faj kuyruklarına karşı hazırlanan antikörlerin fajların konakçı bakterilerine adsorbsiyonunu etkili bir şekilde engellediğini göstermiştir (Kılıç 2008).

Fajlar kuyruğun uç yapılarına göre de değişiklik göstermektedirler. Bazı fajlarda hiçbir özgül uç yapısı olmadığı halde, bazılarında yumru veya topuz şeklinde görülen bir uç yapısı bulunmaktadır (Ergüllü 1982). İlk modelde DNA yapışkan uca (cos-bölgesi) sahipken, diğerinde genomun küt uca (pac-bölgesi) sahip olduğu görülmektedir. Bu bölgelerin varlığına göre kuyruklu fajlar, sırasıyla Sfi 21 (cos) ve Sfi11 (pac tipi) fajlar olarak birbirinden ayrılmaktadır. Sfi21 grubunda olduğu gibi sadece *S.thermophilus* fajları değil, farklı konakçı türlerini enfekte eden pac bölgeye sahip *Lactobacillus lactis* LL-H fajı da Sfi11 pac-tipi fajlar gurubu içerisinde yer almaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009a).

DNA ve protein dizilerindeki farklılıklar, fajların çeşitliliğinin artmasına neden olmaktadır. Faj popülasyonunun %96'sını, "kuyruklu fajlar" oluşturmaktadır. Yoğurt yapımında starter kültür olarak kullanılan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül fajlar da kuyruklu fajlar arasında bulunmaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009a). Kuyruklu fajlardaki kuyruk, adsorbsiyon organı olarak rol oynamaktadır. Bazı fajlarda ise bir kuyruk bölümü yoktur. Örneğin, RNA fajlarında kuyruk bulunmaz ve bu fajlar yalnız bir kapsidden oluşmaktadır (Ergüllü 1982).

Kuyruklu fajlar, linear çift sarmal DNA ve bu DNA'yı çevreleyen ikosahedral kapside ve helikal tasarımlı düz görünüşlü uzun veya kısa kuyruğa sahiptirler. DNA büyüklükleri 17-500 kilobase (kb) kuyruk uzunlukları da 10-800 nm arasında değişmektedir. Kapsidleri, "kapsomer" adı verilen alt ünitelerden, kapsomerler ise 5 veya 6 adet "protemer"den oluşmakta, kontraktıl veya kontraktıl olmayan kuyruklarının sonunda kuyruk plağı, kuyruk iğnesi ve / veya fibrilleri bulunabilmektedir. Bu gruptaki fajlar, monofletik (monophletic) bir evrim grubu oluşturmuş ve "Caudovirales" (Cauda=kuyruk) adlı tek bir takım içerisinde yer almışlardır. Bununla beraber bu fajlar; büyüklüklerinin, DNA içerik ve kompozisyonlarının, proteinlerinin, serolojik özelliklerinin, konakçı dizgeleri ve fizyolojilerinin farklılık göstermesi nedeniyle Myoviridae (%25), Siphoviridae (%61) ve Podoviridae (%14) familyaları (Bradley sınıflamasına göre sırasıyla A, B ve C grubu) içerisinde gruplandırılmıştır. Kuyruklu fajlar, cos veya pac uca sahip olmalarına, DNA veya RNA polimeraz varlığına, farklı baz içermelerine, nükleotit dizileri ile konkatamer oluşumlarına bakılarak 15 cinse ayrılmıştır. Şu anda, izolasyonları gerçekleştirilen fajlardan sadece 250 adedinin tür bazında ayrımı yapılabilmektedir (Acar Soykut ve Tunail 2009a). Şekil 1.4'de Ackermann sınıflandırmasına göre bakteriyofajların morfolojik yapıları görülmektedir.



Şekil 1.4 : Bakteriyofajların morfolojik yapıları (Ackermann 2003, 2007)

Cins ve tür bazında sınıflandırılmayı bekleyen çok sayıda fajdan, *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus*'a etkili olanlar da; diğerleri gibi sırasıyla keşfedildikleri 1952 (Acar Soykut ve Tunail 2009a) ve 1972 [LL-H (Alatossava ve Pyhtilä 1980, Alatossava vd 1995, Mikkonen vd 1996, Ravin vd 2002)] yıllarından günümüze kadar her bir çalışma kapsamında morfolojik yapılarına, konakçı dizgelerine, serolojik özelliklerine, protein profilleri ile restriksiyon kesim şablonlarına ve DNA hibridizasyon sonuçlarına göre karakterize edilmiş ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Günümüze kadar yapılan tüm çalışmalarda, morfolojik olarak Bradley sınıflamasına göre B grubuna ve Ackermann sınıflamasına göre de Siphoviridae familyasına dahil edilen bu fajların kapsid büyüklüklerinin 42-74 nm, kontraktil olmayan uzun kuyruklarının ise 117-330 nm arasında değiştiği görülmüştür (Acar Soykut ve Tunail 2009a).

Mezofilik laktik streptokoklara saldıran bir bakteriyofajla ilgili bilgiler ilk olarak 1935 yılında Whitehead ve Cox tarafından elde edilmiştir (Whitehead ve Cox 1935). Fajlar hakkındaki çalışmalar, daha çok -Whitehead ve Cox tarafından 1935 yılında izole edildiklerinden dolayı- laktokok fajları üzerinde yoğunlaşmıştır. Laktobasil fajları ile ilgili çalışmalar nispeten daha yenidir ve 1970'li yıllarda başlamıştır (Kılıç 2008, Acar Soykut ve Tunail 2009a). Laktokok fajlarının genom boyutları 18.1 kb ile 134 kb arasında değişmesine karşın, laktobasil fajlarının genom boyutları, 34-38 kb arasında bulunmaktadır (Kınık vd 2000). Forde ve Fitzgerald (1999) fajların genom boyutlarının 18-55 kb arasında değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *bulgaricus* ve *Lb. helveticus* fajları; izometrik bir baş, kasılabilen kuyruk ile kuyruk dikenleri bulunan kuyruk tabanından oluşmaktadır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008).

S. thermophilus ve *Lb. bulgaricus* dahil, süt endüstrisinde kullanılan diğer cins ve türlere ait fajların tamamının taksonomik durumları, Tablo 1.2'de verilmiştir (Acar Soykut ve Tunail 2009a).

Tablo 1.2 : Süt endüstrisinde karşılaşılan bazı fajların taksonomik durumları
(Acar Soykut ve Tunail 2009a)

Konakçı Türleri	Faj Tipi	Prototip Faj	Üye Fajlar
<i>Streptococcus termophilus</i>	B1; cos; Sfi21-türleri	Sfi21(T); Sfi19(V)	DT1, 7201, Sfi18
	B1; pac; Sfi11-türleri	O1205(T); Sfi11(V)	
<i>Lactococcus lactis</i>	B1; cos:936-türleri	Sk1(V)	bIL170, bIL41, bIL66,P008, F4-1,
	B2;cos:c2-türleri	C2(V)	US3
	B1;P335-türleri.cos	Φ31(V); rit(T)	c6A, bIL67
	B1;P335-türleri:pac	TP901-1(T)	
	Büyük B1:949-türleri		Tuc2009
	B1;cos:BK5-T-türleri	BK5-T(T)	Φ111, P026
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	B1; pac grup a	mv4(T); LL-H(V)	LL-K, lb539
	B1; cos grup b	LL-Ku(V)	C5
	B3; cos grup c	JCL1032	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	B1; pac	phigle(T)	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	B1; cos	adh(T)	
<i>Lactobacillus casei</i>	B1; cos	A2(T)	PL-1
	B1; pac	FSW	
<i>Lactobacillus johnsoni</i>	Profaj	Lj965	

B1: İzometrik kapsid, B2 ve B3: Prolat kapsid, cos: cos bölge: yapışkan uçlu DNA, pac: pac bölge: küt uçlu DNA, T: temperent, V: virulent

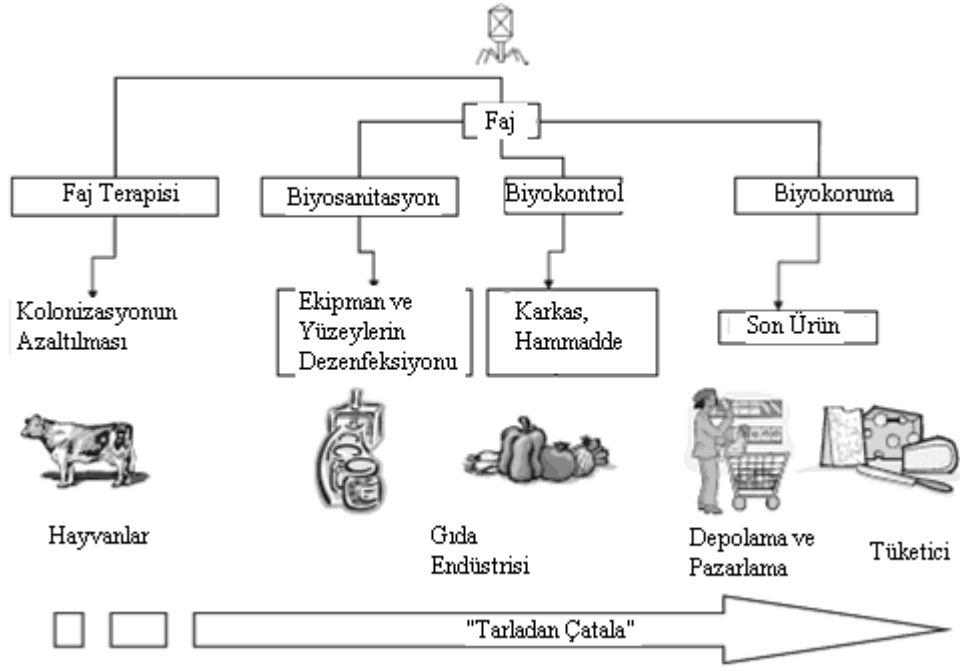
Alatossava vd (1995) yaptıkları bir çalışmada *Lactobacillus delbrueckii* bakteriyofajları mv4 (temperent), LL-H, LL-K ve JCL1032 (virulent) arasındaki DNA homolojilerini araştırmışlardır. Southern hibridizasyon sonuçlarına göre, mv4, LL-K ve JCL1032 fajlarının her genomunda homolog element gözlenmişken LL-H fajında bu durum gözlenmemiştir. Räisänen vd (2007)'nin bildirdiğine göre LL-H fajının DNA'sı belirli oranda JCL1032 fajıyla benzerlik göstermektedir. Alatossava vd (1995)'nin yaptıkları araştırma sonuçları göstermiştir ki mv4, LL-H, LL-K ve JCL1032 fajlarının tümü *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* LKT suşunu enfekte etme kabiliyetindedir.

İnsanlarda ve deneysel olarak enfekte edilmiş hayvanlardaki bazı enfeksiyonların tedavisinde fajların antibiyotiklerden daha etkili oldukları rapor edilmektedir. Terapötik

fajlar antibiyotikler ile kıyaslandıklarında, en azından teorik olarak bazı avantajlar içermektedirler (Durupınar 2005). Fajların fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon prosedürlerine göre bazı avantajları olabilmektedir. Örneğin gıdalarda bazı fiziksel muhafaza uygulamalarının aksine fajların, gıdanın duyuşal özelliğini etkilemesi beklenen bir durum değildir. Ayrıca fajlar konakçı özgülüğünden dolayı fermente gıdalardaki starter kültürlerin canlılığını etkilemeyecektir (Anonim 2009).

Fajların lokal kullanımlarının bazı avantajları vardır. Enfeksiyon durumunda derin dokulara hızla penetre olmakta ve hedef bakteri öldüğünde de üremeleri durmaktadır. Antibiyotiklerin aksine fajlarda ikincil direnç gelişimi söz konusu değildir. Antibiyotiklere dirençli bakterilerdeki artışın yanı sıra, etkili yeni sınıf antibiyotiklerin geliştirilmesindeki eksiklikler fajların enfeksiyonların tedavisinde kullanımlarını gündeme getirmiştir. Litik fajlar, antibiyotiklere benzer şekilde belirgin antibakteriyel aktiviteye sahiptir (Durupınar 2005). Ayrıca fajlar diabetik ülser ve yanıkların tedavisi için umut vaat etmektedir (Stone 2002).

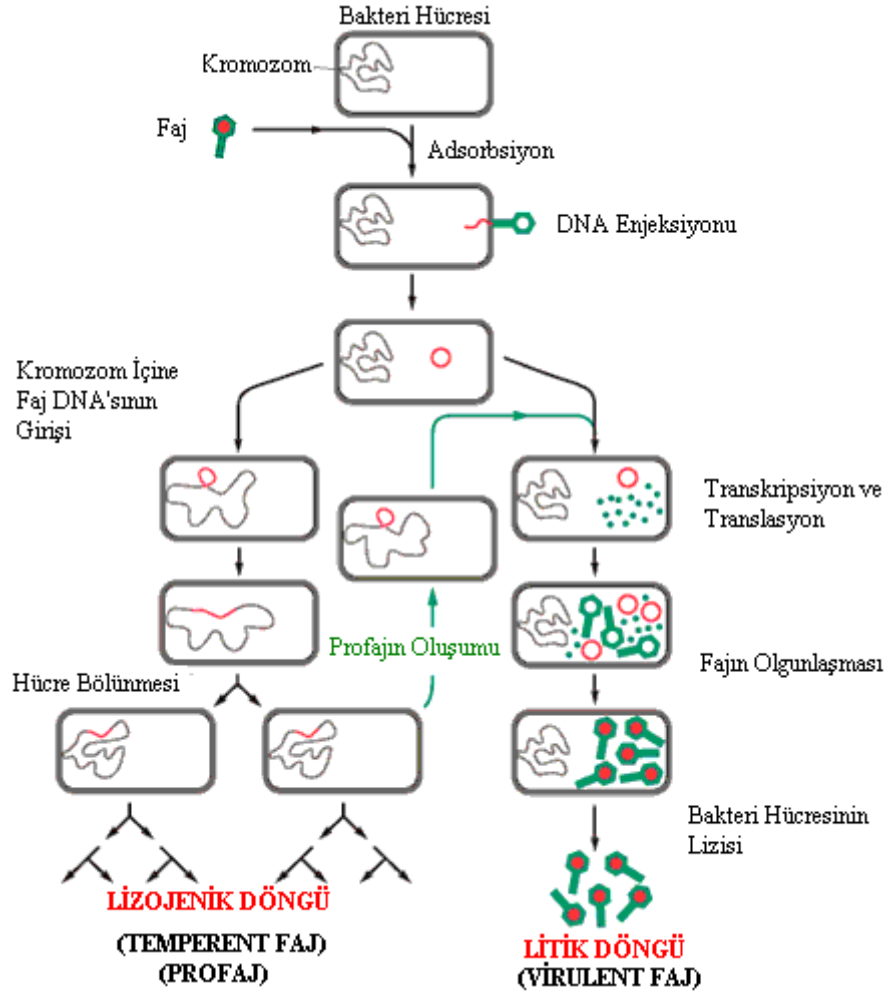
Çeşitli bakteriyel enfeksiyonlara karşı Paris d'Herelle laboratuvarında hazırlanmış en az 5 faj preparatı (Bacte-coli-phage, Bacte-rhino-phage, Bacte-intesti-phage, Bactepyo-phage, Bacte-staphy-phage) bulunmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde de Eli Lilly firması tarafından insanlarda kullanılmak üzere üretilmiş terapötik faj preparatları mevcuttur. Bu preparatlar, stafilokok, streptokok, *Escherichia coli* ve diğer patojenlere karşı hazırlanmıştır. Preparatlar (örn; Colo-jel, Ento-jel, Staphylo-jel) faj lizatları ve hedef bakterinin steril sıvı kültürlerini içerir. Terapötik fajlar, apse, vajinit, üst solunum yollarının akut ve kronik enfeksiyonlarında kullanılmaktadırlar (Durupınar 2005). Fajlar halen Doğu Avrupa ve Rusya'da terapötik amaçlı olarak antibiyotiklerin yerine veya antibiyotikler ile birlikte kullanılmaktadır (Duckworth ve Gulig 2002, Durupınar 2005). Şekil 1.5'de gıda zincirindeki faj uygulamaları gösterilmiştir.



Şekil 1.5 : Gıda zincirinde faj uygulamalarına örnekler (Garcia vd 2008)

1.2 Bakteriyofajların Yaşam Şekilleri

Bakteriler fajlar tarafından ancak özel koşullarda enfekte edilmektedirler. Enfeksiyon sırasında fajın bakteriyi enfekte etmesi ve hücrede fajların gelişerek çoğalmaları ve hücreyi parçalayarak bakteriyi öldürmeleri birçok aşamada gerçekleşmektedir (Tunail 2009). Bakterilere bulaşan virulent ve temperent fajların, bakteri faj uyumu, onların koşulları, faj tipi gibi etkenlere bağlı olarak konakçıları üzerinde sırasıyla litik ve lizojenik olmak üzere iki tip yaşam şekli vardır (Kılıç 2008, Acar Soykut ve Tunail 2009b, Anonim 2009, Tunail 2009). Ortam pH'sı, belirli mineral maddeler ile bazı önemli aminoasitlerin bulunup bulunmaması da oluşacak yaşam döngüsü ve sonucunu belirlemektedir (Kılıç 2008). Şekil 1.6'da bakteriyofajlarda gözlenen yaşam döngüleri şematize edilmiştir.



Şekil 1.6 : Faj yaşam döngüsü (Anonim 2010b)

Fajın hangi yaşam döngüsüne gireceği aynı operatör (O_L ve O_R) bölgesine bağlanabilen *cro* ve *CI* proteinleri arasındaki yarışa bağlıdır. *CI* proteini, lizojenik döngünün; *cro* proteini ise litik döngünün başlaması ve devamı için gereklidir. Proteinlerden hangisi operatöre bağlanırsa, kendi sentezini stimüle ederken diğer proteinin sentezini bloke etmektedir. Buna göre de lizojenik veya litik yaşam başlamış olmaktadır. T4 fajı, virüent fajların; λ fajı ise temperent fajların prototip örneği olarak kabul edilmektedir. Her iki yaşam tipinde de, fajın konakçısına adsorbsiyonu ve DNA'sını enjekte etme aşamaları ortaktır. Kuyruklu fajlarda fibril, kuyruk plağı gibi özel adsorbsiyon yapıları, konakçı üzerindeki belirli moleküllere bağlanmaktadır. Birçok fajın konakçıya adsorbe olması, adsorbe olma hızı ve etkinliği, bazı maddelerin ortamda yüksek konsantrasyonda bulunmasına ve konakçının fizyolojik durumuna bağlıdır. T4 tipi fajlar, iki ayrı aşamada ve farklı iki reseptöre bağlanarak konakçılarında adsorbe olabilmektedirler. T4 fajı, ortamda L-triptofan olması durumunda; λ fajı ise

maltoz varlığında konakçısına adsorbe olabilmektedir. *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus* ve T1-T7 grubu fajlarının da konakçılara adsorbe olabilmeleri için gereken Ca, Mg, Mn gibi iyonların, optimum konsantrasyonları belirlenmiştir. Fajın dönüşümsüz olarak hücre yüzeyine bağlanmasından sonra, faj DNA'sı konakçı hücre sitoplazmasına bırakılmaktadır. Hücre yüzeyine bağlı olan kuyruk, DNA'nın, konakçıya uygun bir şekilde bağlanana kadar kapsidde kalmasını sağlamaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009b).

1.2.1 Litik yaşam döngüsü

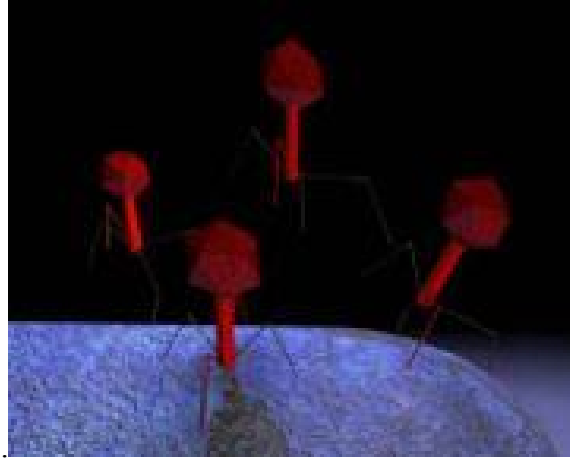
Litik yaşam döngüsü;

1. Bakterinin hücre çeperindeki özel alıcılara bakteriyofajın tutunması,
2. Bakteri hücre sine faj kalıtım materyalinin enfekte edilmesi,
3. Faj tarafından bakteri metabolizmasının faj DNA'sı ve faj proteinlerinin yapımına yönlendirilmesi,
4. Bakteri hücre sine içerisinde yeni fajların oluşumu,
5. Fajın kendine özgü enzimi ile konakçı bakteri hücre sine parçalanması,
6. Olgunlaşmış fajların serbest hale geçmesi,
7. Oluşan fajların diğer bakterilere tutunması aşamalarından meydana gelmektedir (Ergüllü 1982).

Bakteriyofajlar metabolik sistemleri olmadığı için, kendi makro moleküllerinin sentezinde konakçı bakteri hücre sine metabolik aktivitesine bağımlı bulunmaktadır. Konakçı bakteri hücrelerini enfekte edip onları lize eden (eriten) fajlara virulent faj denmektedir. Starter kültürlerde bakterilerin erimesi, yeni hücreleri enfekte edebilecek yeni virulent faj partiküllerinin serbest kalmasına yol açmaktadır. Virulent fajların bu şekilde serbest kalması, yani "gelişmesi", faj gelişiminin "litik döngüsü" olarak isimlendirilmektedir (Kınık vd 2000, Kılıç 2008).

Litik döngü, lizojenik döngüden 'Latent Dönem' olarak adlandırılan periyodun başlaması ile ayrılmaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Faj gelişiminin litik döngüsü, virulent fajın bakteriyel konakçı hücre sine yüzeyine adsorbsiyonu ile başlamaktadır. Bu olay, bakteriyel hücre duvarında uygun bir faj reseptörünün varlığına

bağlı olan oldukça spesifik bir olgudur. Genellikle fajlar proteinden oluşmuş kuyruk uzantılarının uçlarını kullanarak bakteri hücre duvarına tutunmaktadırlar. Faj kuyruklarının ucundaki taban plakaları ve bunun uzantıları bakteri hücre yüzeyindeki reseptör bölgelerin bulunmasını ve tanınmasını sağlamaktadırlar. Spesifik bir konakçı hücreye fajın başarıyla bağlanabilmesi, fajın ve faj reseptör yüzeyinin uygun bir kilite bir anahtarın uyması gibi zorunludur. Fajların büyük çoğunluğu, hücre zarı üzerine sınırlı sayıdaki reseptör iplikçikleri ile adsorbe olurken, bazı fajlar tüm hücre yüzeyine homojen bir şekilde adsorbe olmaktadır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008). Bakteriyofajların bakteri hücrelerine adsorbsiyonu Şekil 1.7’de verilmiştir. Adsorbsiyon işlemi fajla bakterinin birbirine temasından sonra ortalama 5 dakikada tamamlanmaktadır (Kınık vd 2000).



Şekil 1.7 : Bir bakteriyofajın (faj) bakteri hücre yüzeyine adsorbsiyonunu gösteren şematik gösterim (Anonim 2010c)

Laktokoklar üzerinde yapılan çalışmalarda faj reseptörlerinin proteinli ve karbonhidratlı bileşikleri ortaya çıkarılmıştır. *Lactobacillus casei*'de ramnoz'un reseptör alanlarından bir kısmını oluşturduğu, *Lb. plantarum*'un bir suşunda ise hücre duvarındaki ribitol teikoik asidin glukoz kısmının önemli bir tutunma yeri olduğu belirlenmiştir (Kılıç 2008). *Lb. helveticus*'taki reseptörün ise bir protein olduğu tespit edilmiştir (Kınık vd 2000, Kılıç 2008).

Genel olarak fajların adsorbsiyonu için bazı iyonlarla aminoasitlerin gelişme ortamında bulunmaları gereklidir. Yapılan çalışmalar L-triptofan ile Ca ve Mg iyonlarının incelenen fajların bakteriye adsorbsiyonu için gerekli olduklarını

göstermiştir. Bu maddeler adsorbsiyon sırasında fajın kuyruk iplikçiklerinin açılmasına ve hücre çeperine tutunmasına yardım ederler. NaCl ve CaCl₂ gibi tuzların da adsorbsiyon sırasında bakteri ve fajın negatif elektrik yüklerini nötralize ettikleri bilinmektedir. NaCl ve CaCl₂ bulunmaması halinde bakteri içindeki fajın bakteriyi eritmediği yine bazı araştırmacılar tarafından saptanmıştır. Zn iyonları bulunan ortamlarda ise tüm koşullar uygun olsa dahi bazı tür fajların konakçı bakteriyeye adsorbe olmadıkları gözlenmiştir (Kılıç 2008).

Laktik asit bakterilerine ait fajların genomları, proteinden oluşan ve faj başı içerisinde lokalize olan çift sarmallı DNA'dan oluşmaktadır. Fajın uygun bir konakçı hücreye adsorbsiyonundan sonra, faj kılıfı bakteriyel yüzeyin dışında kalırken, faj DNA'sı faj başından, faj kuyruğu yolu ile bakteriyel hücrenin iç kısmına geçmektedir. Adsorbsiyon işleminin tamamlanmasından hemen sonra faj, kuyruğunda bulunan lizozime benzer bir enzimi, bakterinin hücre çeperi üzerine salgılamaktadır. Bu enzim, bakterinin hücre çeperinin bütünlüğünden sorumlu olan lipopolisakkaritleri eriterek, fajın sadece DNA'sının bakteri içerisine girmesine neden olmaktadır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008). Bu aşama yaklaşık 20 saniye ile birkaç dakika arasında tamamlanmaktadır (Kınık vd 2000).

Faj DNA'sının bakteri içine girmesinden birkaç dakika sonra bakteri metabolizması durur ve tamamen değişmektedir (Kılıç 2008). Konakçı RNA polimeraz enzimi devreye girer ve erken genlerin transkripsiyonu başlamaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Bakteri çoğalmaz fakat solunum enzimleri aktivitelerini sürdürmektedirler (Kılıç 2008). Bu gen ürünleri, faj genomunu konakçı tarafından sentezlenen endonükleazlara karşı korumakta ve fajın ihtiyacına göre konakçıda tekrar yapılanmayı sağlayabilmekte, konakçı proteazlarını ve diğer bazı proteinleri inaktive edebilmektedir. Daha sonra, orta genlerin transkripsiyonu ile yeni faj DNA'sının sentezi gerçekleşmektedir. Son olarak, geç genlerin kodlanması ile faj partikülünün kapsid, kuyruk, kuyruk fibrilleri gibi parçalarının üretimi (morfogenez) başlamaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Prokapsid olarak adlandırılan tam yapılanmamış ikosahedral protein kılıf içerisinde, faj DNA'sı paketlenmekte ve kuyruk ile kapsid birleştirilerek tam faj meydana gelmektedir (Kınık vd 2000, Kılıç 2008, Acar Soykut ve Tunail 2009b).

Litik döngünün son aşaması, konakçı bakteri hücrelerinin lizis'i ile çevreye yeni olarak sentezlenmiş virüs partiküllerinin serbest bırakılmasıdır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008, Acar Soykut ve Tunail 2009b). Bakteri hücrelerinin lizis'i bir şişme veya bir gerilme sonucunda olmamaktadır. Latent Dönemin sonuna doğru, yapımı faj genleri tarafından yönetilen lizin enzimi salgılanmaktadır. Bu enzim bakteri hücre duvarının bileşimindeki peptidoglikan tabakasının yıpranmasına sebep olmaktadır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008). Enzim, bakteri hücresi üzerindeki etkisini geniş bulanık halelerle ortaya koymaktadır. Bunlar faj kaynaklı plaklardır ve faj lisinin hücre duvarındaki litik etkisinden dolayı meydana gelmektedir. Bu durumda çeper, iç ozmotik basınca dayanamayıp yırtılmaktadır (Kılıç 2008).

Kuyruklu fajlar, lizisin gerçekleşmesi için iki bileşen kullanmaktadır. Bunlardan, 'lizin' enzimi peptidoglikan matriks içerisinde kesim yaparken; 'holin' adlı ikinci enzim de, iç membranda porlar açarak lizin enziminin peptidoglikan tabakaya ulaşmasını ve hücre lizisinin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009b).

1.2.2 Lizojenik yaşam döngüsü

Lizojenik döngü, faj çoğalması için alternatif bir yoldur. Faj, konakçı hücreye adsorbsiyondan ve onun DNA'sına penetrasyondan sonra, yeni sentezlenmiş faj partiküllerinin oluşumu bastırılmakta ve faj DNA'sı bakteri kromozomuna rekombinasyon yolu ile girmektedir. Böylece konakçı hücrede fajın sebep olduğu lizis meydana gelmemekte ve faj DNA'sı, lizojenik hücrelerin karakterini oluşturmak üzere, bakteriyel DNA ile eşzamanlı olarak replike olmaktadır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008).

Bu tip ilişkilerde bakteri, canlılığını, üreme ve çoğalma yeteneğini kaybetmemektedir. Fajın, içerisinde lizojenik bir yaşam sürdürdüğü bakteriye "lizojen bakteri", bakteri genomuna entegre olmuş özgül ve bulaşıcı olmayan faja "profaj, temperent faj, ılımlı faj, gizli faj" denmektedir. Bakteri hücrelerinin diğer özellikleri gibi profaj kalıtsaldır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008, Acar Soykut ve Tunail 2009b). Bazı temperent fajlar duyarlı hücreleri enfekte edip eritecek yeteneğe sahiptir (Kılıç 2008).

Lizojenik durum, CI, CII ve CIII kodlu üç viral proteinin varlığına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Viral DNA'nın hücreye girişiyle birlikte, CI proteinin üretimi

başlamakta ve yeni faj partiküllerinin üretimi için gereken bilginin genom üzerinden okunması engellenmektedir. Dolayısıyla, litik döngüye geçiş mümkün olamamaktadır. Sitoplazmada dairesel formda bulunan viral DNA; ya plazmid formunda kalmaya devam etmekte ya da konakçı genomuna entegre olmaya başlamaktadır. İntegrasyon, attP ve attB bölgeleri arasında gerçekleşmektedir. CI proteininden sonra üretilmeye başlanan CII proteini, konakçı transkripsiyon organellerini kullanarak CI üretiminin devamını sağlarken; CIII proteini de, CII'nin konakçı enzimler tarafından parçalanmasına engel olmaktadır. CI proteininin cro proteinine oranla daha fazla üretilmesi, viral genomun konakçı genomuna entegre olmasını indüklemektedir. İntegrasyon tamamlandığında ise, sadece CI'in üretimi söz konusudur. Artık viral DNA, konakçı DNA'sı ile aynı hızda replike olmakta ve kardeş hücrelere geçmektedir. Konakçı hücre viral DNA'yı taşıdığından, infeksiyon durumu da devam etmekte ve dolayısıyla aynı karakterdeki başka bir faj ile infeksiyon söz konusu olamamaktadır. Bu duruma "süperinfeksiyon" denilmekte ve faj direnç sistemlerinden biri olarak da kabul edilmektedir. (Acar Soykut ve Tunail 2009b).

Lizojenin laktik asit bakterilerinde yaygın olduğu bilinmektedir (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Laktokokların önemli bir kısmının lizojenik (%60-70) olduğu sanılmaktadır. Laktobasillerde bu durum daha seyrek görülmektedir (Kılıç 2008). Bununla beraber laktokoklara ve laktobasillere oranla *S. thermophilus* suşlarında lizojeniye daha ender rastlanmaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009b).

Dıştan bir etki olmaksızın lizojen bakteriler çok ender olarak yok olmaktadır (Kılıç 2008). Profaj, konakçı bakteri DNA'sından aşağıdaki yollardan biri ile serbest kalarak virulent faj durumuna geçmektedir (Kınık vd 2000, Kılıç 2008, Acar Soykut ve Tunail 2009b).

1. Spontan olarak,
2. UV ışığı ile muameleden sonra,
3. Mitomisin C antibiyotığının düşük dozdaki uygulamalarından sonra,
4. Azot gazı uygulaması,
5. Mutasyon,
6. İnkübasyon sıcaklığındaki değişim ile.

1.3 Faj Gelişme (replikasyon) Parametreleri

Faj gelişme parametreleri denildiğinde, fajın konakçısına adsorbe olma oranı, farklı konakçılar üzerinde plak oluşturma etkinlikleri [EOP-Efficiency of Plating (Singleton ve Sainsbury 1993), Efficiency of Plaquing (Aquad vd 1998)], plak çapları, Latent Dönem ile patlama büyüklükleri akla gelmektedir (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Fajın konakçısına adsorbe olma oranı besiyeri, pH, sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır (Räisänen vd 2007). Bunlardan Latent Dönem ile patlama büyüklükleri, tek aşamalı gelişme eğrileri çıkarılarak belirlenmektedir (Kınık vd 2000, Acar Soykut ve Tunail 2009b). Fajların tek aşamalı gelişme eğrilerinin çıkarılması, konakçılarında adsorbe oranlarının bulunması ve titrelerinin artırılması amacıyla yapılan çalışmalarda, başlangıçta karıştırılan faj ve bakteri sayısı önemlidir ve “İnfeksiyon Çokluğu” (MOI= Multiplicity of Infection) değeri ile belirtilerek konakçı başına düşen infektif faj sayısı olarak tanımlanmaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009b).

Belli bir faj konakçı sisteminin litik döngüsü, Latent Dönem ve patlama büyüklüğü ile karakterize edilmektedir. Enfekte edici fajların, bakteri hücrelerine bağlanması ile başlayan ve faj genomlarının serbest bırakılması ile biten bu faz, “Latent Dönem” olarak isimlendirilmektedir (Kınık vd 2000). Latent Dönem’de, olgun faja rastlanmamakta ve faj plak sayısı sabit kalmaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Latent Dönem sonunda hücrelerin patlaması ve fajların ortama salınması ile sayı birden yükselmekte ve daha sonra durmaktadır. Lizis sona erdiği zaman elde edilen faj sayısının Latent Dönem boyunca sabit kalan faj sayısına oranlanmasıyla, “Patlama Büyüklüğü” elde edilmektedir. Patlama Büyüklüğü ve Latent Dönem, belirli ve sabit koşullarda her bir faj türüne spesifiktir. Ancak kullanılan konakçıya, konakçının bölünme periyoduna, ortama ve sıcaklığa bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Kınık vd 2000, Kılıç 2008, Acar Soykut ve Tunail 2009b).

Lb. bulgaricus fajları ile gerçekleştirilen bazı araştırmalarda, Latent Dönem sürelerinin 40 ve 60 dakika; bazılarında ise 40 veya 30 dakikadan az olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, bu araştırmalarda tespit edilen patlama büyüklüklerinin 23 ile 130 faj partikülü arasında değiştiği görülmüştür (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Kılıç (2008) Latent Dönem süresini yaklaşık 20 dakika, patlama büyüklüğünü ise 150-200 kadar olarak belirtmiştir.

Mikkonen vd (1996) LL-H fajının transkripsiyonunun erken faz (enfeksiyonun başlangıcından enfeksiyon sonrasına kadar 20 dakika) ve geç faz (enfeksiyon aşamasının sonundan bakteri hücrelerinin lizisine kadar 30-40 dakika) olarak ikiye ayrılabilceğini bildirmişlerdir.

Faj plak etkinliği, fajların konakçıları üzerinde oluşturabildiği plaklar olarak tanımlanabildiği gibi; fajın farklı bir konakçıda verdiği titrenin homolog konakçısında verdiği titreye oranlanması da ile de hesaplanmaktadır. Genellikle direnç sistemi aktarılan veya bu sistemlere sahip konakçılarda geliştirilen fajların titrelerindeki değişimleri takip etmek amacıyla bu değerler belirlenmektedir (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Fajın farklı konakçılar üzerinde plak oluşturma etkinlikleri EOP [Efficiency of Plating (Singleton ve Sainsbury 1993), Efficiency of Plaquing (Auad vd 1998, Tunail 2009)] olarak gösterilmektedir. Fajın konakçısı ile EOP'si 1.0'dır. Aynı faj başka duyarlı bir test suşu veya ısıya duyarlı faj direnç mekanizmasını yitirmiş konakçı türevi veya faj direnç geni aktarılmış duyarlı bir mutantı ile karşılaştırılırsa fajın bu denenen test bakterisinde vereceği plak sayısı, homolog konakçısına göre azalacak veya artacaktır. Faj için kısıtlayıcı etkisi kalkan bir mutant suş plak artışına neden olurken, direnç geni aktarılmış bir mutant, plak sayısının indirgenmesine neden olur. Aynı şekilde faj homolog konakçısı dışında bir başka suş ile daha fazla veya daha az plak oluşturabilmektedir (Tunail 2009). Auad vd (1998), çalıştıkları lb539 temperent fajının, *Lb. lactis* ATCC 15808 suşunda üç kez geliştirilmesinden sonra EOP değerinin 9.4×10^{-4} 'ten 1.6' ya yükseldiğini; LL-H virulent fajının ise farklı konakçıda geliştirilmesinden sonra EOP değerinin 1.7'ye çıktığını saptamışlardır.

1.4 Fajlara Karşı Direnç Mekanizmaları

Laktik asit bakterileri hem litik, hem de ılımlı fajlar tarafından enfekte olmaktadır. Birçok farklı özellikte faj içerdikleri de bilinmektedir. Bunun sonucunda özellikle fermente süt ürünlerinin üretiminde yararlanılan starter kültürlerdeki tür veya suşların zaman zaman faj saldırısına uğramalarına işletmelerde sıklıkla rastlanmaktadır. Ancak laktik asit bakterilerinin de farklı fajlara karşı bir savunma mekanizması geliştirdikleri yapılan incelemelerde ortaya konulmuştur (Kılıç 2008). Laktik asit bakterilerinin; faj adsorbsiyonunun engellenmesi, restriksiyon/modifikasyon sistemleri, abortif enfeksiyon ve lizojenik bağıışıklık olmak üzere; bilinen 4 adet faj direnç

mekanizması bulunmaktadır (Auad vd 1998, Forde ve Fitzgerald 1999, Kınık vd 2000, Josephsen ve Neve 2004, Kılıç 2008, Labrie vd 2010).

1.4.1 Adsorbsiyonun bloke edilmesi

Homolog faj / konakçı sistemlerinde fajlar etkin bir şekilde bakteri hücrelerine adsorbe olmaktadır. Bu etkinlikleri deneysel olarak belirlenebilir ve genelde %90'dan fazla adsorbsiyon göstermektedirler. Ne var ki fajlara karşı dayanıklı bazı türlerin, faj reseptör yüzeyinin, fajın adsorbe olmasına izin vermeyecek şekilde modifikasyona uğraması nedeni ile daha düşük adsorbsiyon etkinliği gösterdikleri belirlenmiştir. Hücre duvarı komponentleri ile hücre reseptör alıcı yüzeyinin maskelenmesi de, faj adsorbsiyonunu önleyebilmektedir (Kınık vd 2000, Kılıç 2008).

1.4.2 Restriksiyon (sınırlama, kısıtlama) / modifikasyon sistemleri (R / M)

Çoğu laktik asit bakterisinin, yabancı faj DNA molekülünün hücre içine girmesini engelleyen ve bunları süratle parçalayan restriksiyon enzim sistemleri bulunmaktadır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008, Acar Soykut ve Tunail 2009b). Restriksiyon enzimi yabancı bakteriyel veya viral DNA üzerinde kesim yapmaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Ancak, bazı faj DNA'ları başka bir bakteriyel enzimin (modifikasyon enzimi) etkisi sonucu değişime uğramış oldukları için, bu savunma mekanizmasından kurtulabilmektedirler (Kınık vd 2000, Kılıç 2008, Acar Soykut ve Tunail 2009b). Modifikasyon enzimi, DNA molekülü üzerindeki tanıma dizisinde bulunan belirli bölge ya da bölgelere genellikle metil grubu ekleyerek, konakçı DNA'sını yabancı DNA'ya karşı korumaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Modifiye DNA, bu kısıtlayıcı enzimler tarafından yok edilememektedir. Bu savunma mekanizması R/M sistem olarak isimlendirilir ve 4 tipi bulunmaktadır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008, Acar Soykut ve Tunail 2009b). Ancak T4 gibi diğer bazı fajlar da, kendilerini restriksiyon enzimlerine karşı koruyabilmekte, enzimleri inhibe eden proteinler üretebilmektedirler (Acar Soykut ve Tunail 2009b). R / M sistemleri; birçok fajın konakçı bakteriler üzerinde etkinliklerinin zayıf olmasına ve sonuçta düşük "plak etkinliği"ne neden olmaktadır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008). Laktobasil türleri içinde *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus helveticus*'un restriksiyon / modifikasyon sistemlerine sahip oldukları kabul görmüştür (Auad vd 1998).

1.4.3 Sonuçsuz bırakılan enfeksiyon (abortif enfeksiyonlar)

Birçok faja dayanıklı suşta faj DNA'sı hücre içine kabul edilmekte, ancak daha sonra faj DNA replikasyonuna, RNA transkripsiyonuna, translasyona, yapısal proteinlerin sentezlenmesine veya DNA paketleme sistemine müdahale edilmektedir (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Laktik asit bakterilerinde bu mekanizma tam olarak anlaşılmamış ve abortif enfeksiyonlar olarak adlandırılmıştır. R/M aktivite sistemlerine ya da abortif enfeksiyonlara bağlı olan faj dayanıklılık sistemlerinin daha çok ortam sıcaklığı ile ilişkisi bulunmaktadır. Özellikle sıcaklığın 30°C'den 37-40°C'ye artması, laktokok türlerinin önemli ölçüde duyarlılık kazanması ya da faja dayanıklılığın tam anlamıyla kaybolması ile sonuçlanabilmektedir. Bu konu peynir üretimi sırasında genellikle farklı sıcaklıklar kullanıldığı için pratikte özel bir öneme sahiptir. Bu nedenle peynir işleme proseslerindeki sıcaklık profillerinin dikkate alınacağı bir aktivite testinin laboratuvar koşullarında uygulanması gerekmektedir (Kınık vd 2000, Kılıç 2008).

1.4.4 Lizojenik bağıklık

Lizojenik bakteri türleri, benzer virulent ve temperent fajlara karşı dayanıklıdır (Kınık vd 2000, Kılıç 2008, Labrie vd 2010). Ancak profajı aktifleştirildikten sonra bile bu türler bazı durumlarda faja dayanıklılıklarını sürdürmektedirler (Kılıç 2008).

1.5 Bakteriyofajların Süt Teknolojisinde Yarattığı Sorunlar

Süt teknolojisinde saf kültür adını verdiğimiz starter kültürlerin, süt ürünleri teknolojisinde kullanılmaya başlanılmasından sonra, bu kültürlerin çok büyük olumlu etkileri görülmüş ve süt ürünlerinde standart bir kalite ve arzu edilen tat ve aroma sağlanmıştır. Ancak saf kültür kullanımının yaygınlaşmasından sonra ortaya bakteriyofaj sorunu çıkmıştır (Ergüllü 1982).

Bakteriyofaj sorunu 20. yüzyılın başlarında ilk olarak Avustralya ve Yeni Zelanda'da kendisini göstermiş ve bu ülkelerde peynir yapılacak süte katılan saf kültürlerin, peynirlerde gerekli asitliği oluşturmadığı ve buna bağlı olarak arzu edilen tat ve aromanın meydana gelmediği peynir kalitesinin çok düşük olduğu görülmüştür. Bu konu üzerine eğilen araştırmacılar, peynire işlenecek süte saf kültür olarak katılan

bakterilerde gelişmenin kısa sürede sona erdiğini, hücre zarlarının parçalandığını saptamışlardır (Ergüllü 1982, Kılıç 2008).

Starter kültür aktivasyonunu etkileyen çok sayıda etmen içinde en önemlisi ve çözümü en güç olanı bakteriyofaj kontaminasyonlarıdır (Şanlıbaba ve Akçelik 2000). Bakteriyofajlar laktik asit bakterilerinin metabolik yeteneklerini ve özellikle asitlik üretme kabiliyetlerini olumsuz yönde etkilemekte ve peynir, yoğurt ve tereyağ teknolojisinde çok büyük sorunlar ortaya çıkmaktadır (Ergüllü 1982, Mc Grath vd 2007). Faj kontaminasyonları, fermentasyon ortamlarında %15-20 oranına varan ürün kayıplarına neden olabilmektedir (Şanlıbaba ve Akçelik 2000).

Farklı süt ürünlerindeki faj problemleri aşağıda ayrı ayrı tartışılmıştır.

1.5.1 Fajların peynir teknolojisinde yarattığı sorunlar

Starter kültüre bakteriyofajın bulaşması süt endüstrisinde en önemli sorun olduğu gibi en büyük ekonomik kayba neden olan riskli bir durumdur. Özellikle peynir üreticilerinin sorunları yoğurt ve benzeri ürün üreticilerine kıyasla çok daha fazladır. Bu nedenle yapılan çalışmaların önemli bir kısmı da peynir teknolojisinde yararlanılan kültürler üzerinde yoğunlaşmıştır (Kılıç 2008). Yapılan araştırmalar, fajların en büyük bulaşma kaynağının işletmelerde ortaya çıkan peynir suyu olduğunu ortaya koymuştur (Ergüllü 1982, Kılıç 2008). İlk olarak Whitehead ve Cox (1935) bakteriyofajları peynir starteri olarak kullanılan bir *Streptococcus cremoris* kültürünün asitlik üretme aktivitesindeki bozulmanın sorumlusu olarak rapor etmiştir (Whitehead 1953). İlgili tarihten bu yana bilimsel ve teknolojik gelişmelere rağmen, fajlar hala süt endüstrisinde fermentasyon problemlerine yol açan en önemli sorun olarak dikkati çekmektedir.

Peynirlerde asitliğin kısa sürede ve düzenli bir şekilde artması bir yandan tat ve aroma oluşması, diğer yandan da peynirde bulunabilecek patojen mikroorganizmaların veya çeşitli hatalara neden olabilen diğer mikroorganizmaların ortadan kalkması için gereklidir. Faj nedeniyle asitlik artışının yavaşlaması veya tamamen durması, peynirlerde hem arzu edilmeyen tat ve aroma oluşturmakta, hem de olgunlaşma sırasında diğer zararlı mikroorganizmaların kolaylıkla gelişimi söz konusu olabilmektedir (Ergüllü 1982). Bu hataların çoğu Cheddar gibi peynirlerde

görülmektedir. Çünkü bu tip peynirlerin yapımının ilk safhasında, mayalanan süte katılan *Lc. lactis* ssp. *lactis* ve *Lc. lactis* ssp. *cremoris*'in düzenli bir şekilde asitliği artırması gerekmektedir. Bu asitlik oluşumu peynir suyunun teleden uygun oranda ayrılmasını kolaylaştırır ve istenilen sertlikte pıhtı teşekkülünü sağlamaktadır. Yine pıhtı parçalama ve çedarlama işlemi, asitliğin belirli bir seviyeye yükselmesine bağlıdır. Bu bakımdan fajların etkinliği peynir yapımının daha ilk kademesinde kolaylıkla fark edilebilmektedir (Kılıç 2008).

Fajların gelişme ve çoğalmaları, ortam koşullarına bağımlı olmakla beraber, fajlar bakterilere göre çok kısa sürede ve süratle çoğalabilmekte ve peynire işlenecek süte katılan saf kültürlerin gelişimi önlendiğinden peynirde asitlik artışı durmaktadır (Ergüllü 1982). Genellikle peynir yapımının başlangıç safhasından olgunlaşmanın belirli bir devresine kadar, oluşması istenen asitliğin uygun bir seviyede artmaması veya tamamen durması halinde tat, koku ve diğer kalite özellikleri arzulanan düzeyde olmamaktadır (Kılıç 2008).

Fajlar saf kültür katılarak yapılan peynirlerde zararlı etki göstermekte, fakat direkt olarak çiğ süttten veya pastörize edilen ancak saf kültür katılmayan süttten yapılan peynirlerde büyük sorun ortaya koymamaktadırlar. Zira çiğ süttteki laktik asit bakteri popülasyonu *Lc. lactis* ssp. *lactis*'in değişik suşlarından meydana geldiğinden fajlar farklı suşlara aynı anda etkili olamamaktadırlar (Ergüllü 1982, Kılıç 2008).

1.5.2 Fajların yoğurt teknolojisinde yarattığı sorunlar

Yoğurt teknolojisinde faj etkisi büyük sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak peynir kültürlerinde ortaya çıkan başarısızlıklara oranla bakteriyofajlar yoğurt kültürlerinde daha seyrek bulunurlar ve ürün bazındaki zararları da sınırlı kalmaktadır. Yoğurt yapılacak süte önceden faj bulaşsa bile süt yüksek sıcaklık derecesinde bir süre ısıtıldığından bu fajlar ortadan kalkar ve enfeksiyon etkisi düşmektedir (Kılıç 2008). Kültürde faj bulunması ve mayalama sıcaklığına süttün soğutulması sırasında ortaya çıkan bulaşma ise yoğurt oluşumu üzerinde daha çok etkili olmaktadır. Bakteriyofaj tip ve etkililik derecesine bağılı olarak tatlımsı veya ekşi, tatsız, aromasız yoğurt oluşumuna neden olur. İnkübasyon süresini uzatmaktadır (Ergüllü 1982, Kılıç 2008). Yoğurtta *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fajına göre *S. salivarius* ssp. *thermophilus*'un fajının kötü

etkileri daha çöktür. Çünkü *S. salivarius* ssp. *thermophilus* fajı, pH, ısı değişimi ve kimyasal maddelere daha dayanıklıdır (Kılıç 2008). Bakteriyofaj etkisinin oranına bağlı olarak inkübasyon süresi uzamakta ve ileri düzeydeki bir etkide yoğurt yapımı söz konusu olmamaktadır (Ergüllü 1982).

1.5.3 Fajların tereyağ teknolojisinde yarattığı sorunlar

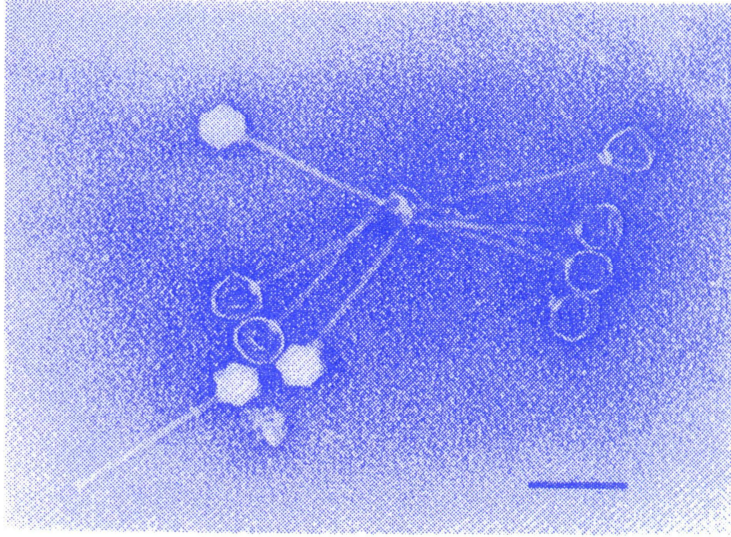
Tereyağ yapımında kremayı olgunlaştırma devresinde saf kültür olarak kullanılan *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* ve *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*'in faaliyetleri sonucu asitlik artışıyla birlikte diasetil istenmektedir. Bu bakterilerin herhangi bir şekilde bakteriyofaj etkisi altında kalmaları durumunda, kremada asitlik artışı durmakta, olgunlaşma yavaşlamakta, kaymak ve aroma oluşmamaktadır. Bazı hallerde tereyağının kendine özgü tat ve aroması yerine, bir malt aroması ortaya çıkmaktadır (Ergüllü 1982, Kılıç 2008).

1.6 *Lactobacillus delbrueckii* LL-H Bakteriyofajı

Lactobacillus delbrueckii LL-H bakteriyofajı ilk kez 1972 yılında Finlandiya'daki yerel bir süt fabrikasında üretilen Emmental peynirinden izole edilmiştir (Alatossava ve Pyhtilä 1980, Alatossava vd 1995, Mikkonen vd 1996, Ravin vd 2002). Daha sonra 1970'lerin sonlarında ilk defa tez olarak Alatossava ve Pyhtilä (1980) ve daha sonra da Prof. Tapani Alatossava'nın araştırma grubu tarafından çalışılmıştır (Alatossava 1987). LL-H fajı ve ilgili fajlarla ilgili olarak günümüze kadar toplam 4 doktora tezi yapılmıştır. Konu ile ilgili bir doktora tezi daha bu yıl ya da gelecek yıl içerisinde Oulu Üniversitesi'nden (Finlandiya) Katja Riipinen tarafından tamamlanacaktır. Günümüzde LL-H fajı *Lactobacillus* fajlarının model bir fajıdır, çünkü LL-H fajı *Lactobacillus* fajları arasında genom dizilimi ilk defa tam olarak tanımlanan fajdır (Mikkonen, 1996).

Alatossava ve Pyhtilä (1980), Alatossava (1987), Alatossava vd (1995), Mikkonen vd (1996) ve Ravin vd (2002) *Lactobacillus delbrueckii* virulent bakteriyofajı olan LL-H'nin ilk kez 1972 yılında Finlandiya'daki yerel bir süt fabrikasında üretilen Emmental peynirinden izole edildiğini, 50 nm çaplı küçük izometrik bir başa, 180 nm uzunluğunda kontraktil olmayan bir kuyruğa sahip olduğunu ve bu özellikleriyle Bradley sınıflamasına göre B grubuna dahil olabileceğini bildirmişlerdir. Mikkonen vd (1996),

Ravin vd (2002), Räisänen vd (2007) LL-H fajının pac-tipi çift sarmallı DNA genomunun 34.6 kb boyutunda olduğunu bildirmişlerdir. LL-H fajının genomu pac-tipi temperent fajlar mv4 ve lb539 ile benzerlik göstermektedir (Josephsen ve Neve 2004). Şekil 1.8 LL-H bakteriyofajının elektron mikroskopundaki görünümünü göstermektedir (Alatossava ve Pyhtilä 1980).



Şekil 1.8 : LL-H bakteriyofajının elektron mikroskopundaki görünümü (Alatossava ve Pyhtilä 1980)

Konu ile ilgili sorulardan bir tanesi, LL-H gibi laktik asit bakteri fajlarının gıda sistemlerinde yeni uygulamalarda kullanılıp kullanılmayacağıdır. Diğer bir deyişle LL-H fajının sadece starterleri öldüren ve fermentasyonu yavaşlatarak ya da durdurarak zarar veren negatif özelliklere sahip olmadığını, ve bazı pozitif özelliklere sahip olup olmadığını sorgulanması gerekmektedir. Yeni uygulamalar bulmak için (LL-H fajı ve *Lb. delbrueckii*'nin bakteriyel suşları arasındaki etkileşimler üzerinde daha temel veriler) günümüze kadar LL-H fajının konakçı suşları değerlendirilmiştir. LL-H fajı adsorbsiyon proteini ve konakçı reseptörü konusunda bazı moleküler veriler mevcuttur: LL-H fajının g71 proteini (Ravin vd 2002) ve bakteriyel konakçı suşun lipoteikoik asitleri (LTA) (Räisänen vd 2004) sırasıyla bu verilerdir. Bu moleküler veriler enfeksiyon döngüsünün ilk basamağının (faj adsorbsiyon basamağı) başarısını anlamamız için temel bilgileri oluşturmaktadır. Şimdiye kadar *Lb. delbrueckii* LL-H fajının konakçı spektrumu detaylı bir şekilde çalışılmamıştır. Yalnızca *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ve birkaç *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ile diğer birkaç *Lactobacillus* türü

test edilmiştir. Zira LL-H fajı reseptör molekülleri olan lipoteikoik asitler genellikle Gram (+) bakteriyel türler içerisinde dağıtılmıştır. Aktif LL-H fajı reseptörleri şimdiye kadar bilinenden çok daha yaygın bulunabilmektedir. Bunlara ilaveten başarılı bir LL-H fajı adsorbsiyonu için LTA'nın düşük D-alanilasyon seviyesinin gerekli olduğu (Räisänen vd 2007) ve g71 genindeki tek bir nokta mutasyonun LTA etkileşimlerinin spesifitesini (Ravin vd 2002) ve buna bağlı olarak da konakçı spektrumunu etkileyebileceği bilinmektedir. Alkali ortam koşullarında faj reseptörü LTA moleküllerinde bulunan D-alanil uzaklaştırılarak P⁻ bağları serbest hale geçmektedir. Bu durumda fajın daha iyi adsorbsiyonuna imkan sağlamaktadır (Räisänen vd 2007).

LL-H fajının gen g71 mutantları ve bakteriyel LTA yer değiştirmelerinin (biyo)kimyasal/fiziksel işlemler bazlı modifikasyonları LL-H fajı adsorbsiyon basamağı için konakçı spektrumunun açığa çıkarılmasında, DNA injeksiyon basamağı/öldürme etkisi ve *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ve *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşları, diğer *Lactobacillus* türleri, ve süt sistemleri ile ilgili *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* gibi diğer Gram (+) bakteriyel türler ile çoğalma için ilave araçlar verecektir.

Ravin vd (2002)'in yaptıkları bir çalışmanın sonuçları, *Lb. delbrueckii* türlerinde en azından 3 farklı faj reseptör molekülü olduğuna işaret etmektedir. Bunlardan ikisi küçük izometrik başa sahip fajlar (LL-H gibi) için özgülken, bir tanesi prolat başa sahip JCL1032 fajı için özgüldür.

Lb. delbrueckii ssp. *bulgaricus* ve *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* bakterileri yoğurt ve peynir üretiminde starter kültür olarak geniş kullanım alanı bulmuştur (Auad vd 1998). *Lb. delbrueckii* fajlarının da içinde bulunabileceği çeşitli fajlar sürekli olarak yoğurt ve peynir üretiminde problemlere neden olmaktadır. Süt işletmelerindeki faj problemlerinin çözümünde yardımcı olabilecek uzman personel gereksinimi olmasına karşın, günümüzde faj biyolojisinin ve gıda sistemlerinde fajların gelişiminin anlaşılması konularında oldukça az sayıda uzman bulunmaktadır. Bütün bunlara ilaveten, son yıllarda faj teknolojisi kavramı ortaya çıkmış ve fajların biyokontrol ve terapi ajanı olarak kullanımı ile ilgili yeni faj uygulamaları ticari olarak geliştirilmiştir.

Günümüze kadar *Lb. delbrueckii* LL-H fajının konakçı spektrumu detaylı bir şekilde çalışılmamıştır. LL-H fajının konakçı spekturumunun kapsamlı biçimde belirlenmesi ve konakçı-faj etkileşimlerinin moleküler düzeyde incelenmesi bu konudaki önemli bir eksikliği giderecektir. Aynı zamanda çalışma sonuçları ilgili fajın yeni geliştirilebilecek biyokontrol ve terapi uygulamaları için de temel araştırma niteliğinde olacaktır.

Tezin başlıca amaçlarını:

- *L. delbrueckii* LL-H fajı ve etkili adsorbsiyon bazında potansiyel faj reseptörleri olarak lipoteikoik asitleri (LTA) içeren çeşitli Gram (+) bakteriyel suşlar kullanarak faj-konakçı reseptörü etkileşimlerini açığa çıkarmak,
- Mikrobiyolojik ekim çalışmalarıyla faj LL-H'nin konakçı spektrumunu belirlemek,
- LL-H fajının adsorbsiyonu üzerine hücrenin gelişme evresinin, bakır ilavesinin ve alkali koşulların etkisini belirlemek oluşturmaktadır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Bakteriyofaj

Araştırmada kullanılan bakteriyofaj LL-H (Valio, Finlandiya) proje danışmanlarından Prof. Dr. Tapani Alatossava'nın (Helsinki Üniversitesi, Gıda ve Çevre Bilimleri Bölümü, Finlandiya) stok koleksiyonundan sağlanmıştır.

2.1.2 Bakteri kùltürleri

Araştırmada; *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Lactobacillus helveticus*'a ait toplam 18 bakteri suşuyla çalışılmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 : Araştırmada kullanılan bakteri suşları ve kaynakları

Bakteri	Suş	Kaynak
<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	ATCC 15808 (CNRZ 326)	ATCC ^a
	LKT (CNRZ 700)	Valio, Finlandiya
	LL23	Valio, Finlandiya
	LL78	Valio, Finlandiya
	CRL 934 (ATCC 8000)	CRL ^b
	CNRZ 327	CNRZ ^c
	CRL 539	CRL
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	YC380	Chr. Hansen A/S, Danimarka
	LT4	INRA ^d , Fransa
	LB120	Helsinki Üniversitesi, Finlandiya
	HAMBI1449	Helsinki Üniversitesi, Finlandiya
	LB S-jarvi	Valio, Finlandiya
	MK9	Ticari, Finlandiya
<i>Lb. helveticus</i>	ATCC 15009	ATCC
	AKI4	Valio, Finlandiya
	1518	Valio, Finlandiya
	1175	Valio, Finlandiya
	1129	Valio, Finlandiya

^a ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

^b CRL: Centro de Referencia para Lactobacilos, Tucumán, Argentina

^c CNRZ: Centre National de Recherches Zootechniques, Jouy-en-Josas, France

^d INRA: Institut National de la Recherche Agronomique, France

2.2 Metot

2.2.1 Bakteriyofaj LL-H'nin aktivasyonu

-20°C'de muhafaza edilen bakteriyofaj LL-H'den 10 µL alınıp, 200 µL *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* ATCC 15808 + 10mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich, USA) içeren 10 mL de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth'a (LAB M Limited, United Kingdom) inoküle edilerek, 37°C'de bir gece su banyosunda (Grant SUB Aqua Dual, England) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen lizat 1 mL'lik eppendorf tüplerinde +4°C'lik ortamda 13500 rpm'de (14263 g) 5 dakika santrifüjlenmiştir (Sigma Laborzentrifugen 2-15, Germany). Elde edilen süpernatantın (4x10⁹ plak oluşturan

birim - plaque forming unit - pfu/mL) uygun dilüsyonu araştırma süresince faj kaynağı olarak kullanılmıştır. Süpernatant ve dilüsyonları +4°C'de muhafaza edilmiştir.

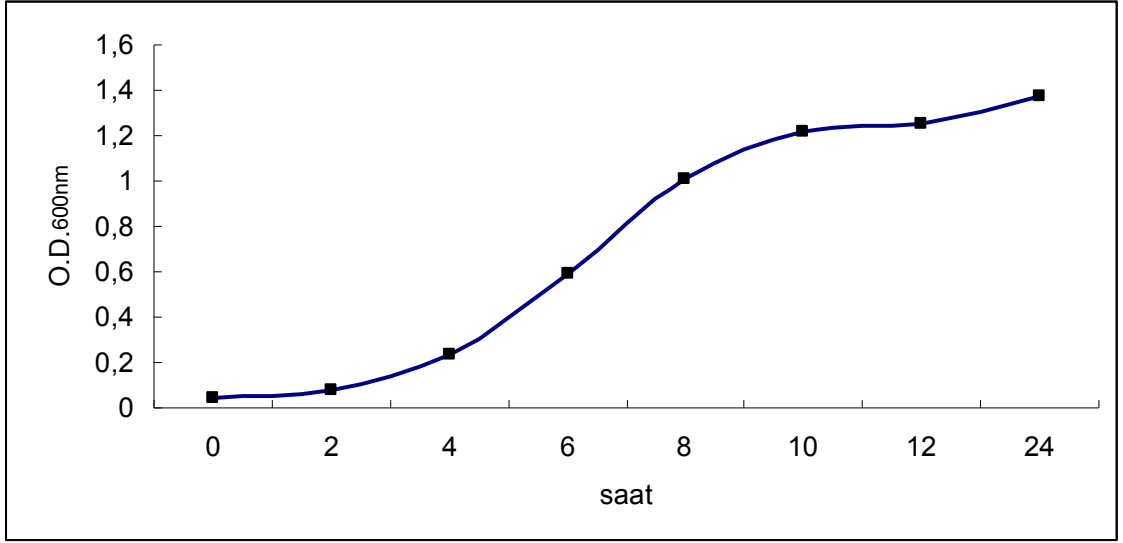
2.2.2 Bakteri kültürlerinin aktivasyonu

Bakteri kültürlerinin aktivasyonunda Rodriguez ve Alatosava'nın (2008) belirttikleri yöntem modifiye edilerek çalışılmıştır. Logaritmik çoğalma dönemindeyken %20 gliserol ile -20°C'de muhafaza edilen bakteri suşları, MRS agar (%1.5 agarlı, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) petrilere öze yardımıyla yayılmıştır. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşları %5 CO₂ içeren anaerobik inkübatörde (WTB Binder Labortechnik GmbH Tuttlingen, Germany) 37°C'de 48-72 saat; *Lactobacillus helveticus* suşları ise 42°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda yeterli sayıdaki bakteri suşu öze ile 10 mL MRS broth'a aktarılıp 37°C'de bir gece çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bakteri kültüründen 300 µL alınıp 10mM CaCl₂ içeren 10 mL MRS broth'a aktarılarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen bakteri kültürü kullanılarak adsorbsiyon testleri gerçekleştirilmiştir.

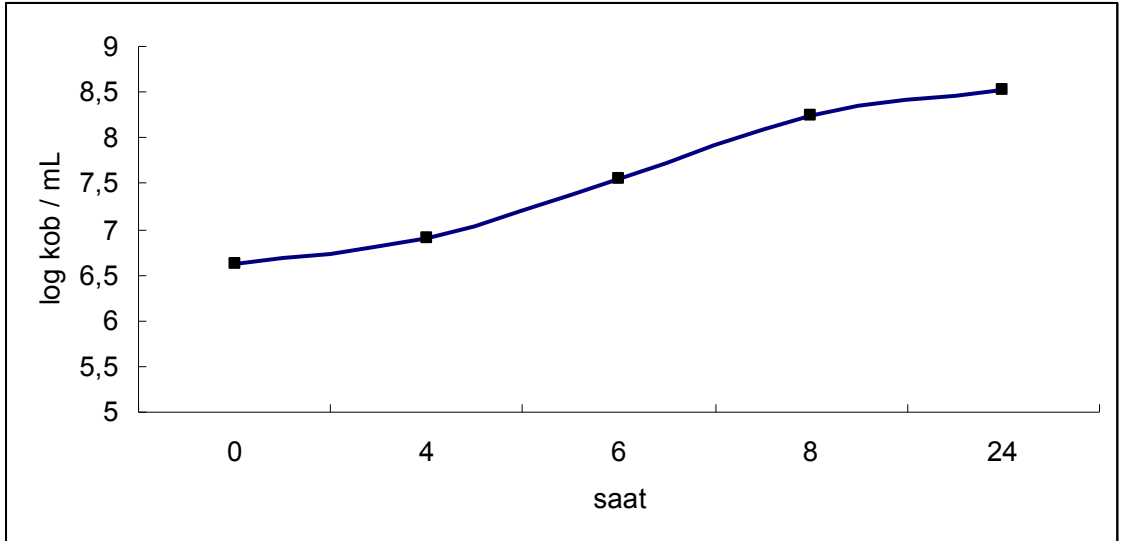
2.2.3 Adsorbsiyon testi

Adsorbsiyon testi, Clokie ve Kropinski'nin (2009) belirttikleri çift tabakalı plak titresi (Double-Layer Plaque Assay) yönteminin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, aktive edilen bakteri kültüründen 300 µL alınıp 10mM CaCl₂ içeren 10 mL MRS broth'a aktarılarak 37°C'lik su banyosunda 6-7 saat süreyle (bakteri suşuna bağlı olarak değişen sürede) inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 2.1'de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 (tüm çalışma süresince adsorpsiyon testlerinde petri ekimleri için kullanılan temel bakteri suşu) suşunun optik yoğunluğunun zamana bağlı değişimi gösterilmiştir. Bakteri kültürünün optik yoğunluğu (OD) spektrofotometrede (Novaspec II Visible Spectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Adsorpsiyon testine bakteri kültürünün OD değeri 0.7 ile 1.0 aralığındayken başlanmıştır. Böylelikle tüm çalışma süresince, logaritmik dönemde bulunan belirli sayıda bakteri içeren kültürle çalışılarak, bakteri sayısı değişiminin adsorbsiyon testini etkilemesi önlenmeye çalışılmıştır. Şekil 2.2'de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*

ATCC 15808 suşunun 10mM CaCl₂ içeren MRS broth'daki çoğalma eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 2.1 : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşunun 600 nm'deki optik yoğunlunun zamana bağlı değişimi



Şekil 2.2 : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşunun 10mM CaCl₂ içeren MRS broth'daki çoğalma eğrisi

İstenilen OD değerindeki 10mL bakteri kültürü 15 mL'lik steril falcon tüpe aktarılarak + 4°C'de 4000 rpm'de (2150.4 g) 15 dakika santrifüjlenmiştir (Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Germany). Santrifüj işlemi sonunda süpernatant

uzaklaştırılarak elde edilen pelet üzerine 10mM CaCl₂ içeren 37°C'deki 10 mL MRS broth ilave edilmiştir. Elde edilen bakteri kültürü 37°C'lik su banyosunda yaklaşık 10 dakika bekletilerek sıcaklığın 37°C'ye gelmesi sağlanmıştır.

Adsorbsiyon testi, faj bakteri kültürüne inoküle edildikten sonra 3, 10, 30 ve 50. dakikalarda gerçekleştirilmiştir. 0. dakika için 37°C'de bulunan 10mM CaCl₂ içeren 10 mL MRS broth'a 10⁻⁴'lük bakteriyofaj dilüsyonundan 50 µL ilave edilmiştir. 52°C'lik su banyosunda (daha düşük sıcaklık derecelerinde agar hızla katılaştığı için bu sıcaklıkta çalışılmıştır) bulunan 10mM CaCl₂ içeren 2.25 mL yumuşak MRS agara (%0.7 agarlı) önce 100 µL *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 kültürü ilave edilmiştir. Söz konusu karışımın üzerine fajlı MRS brohtan 100 µL eklenmiştir. Karışım bekletilmeden yaklaşık 10 saniye kadar vortekslendikten sonra 10mM CaCl₂ içeren MRS agar (%1.5 agarlı) petrisine dökülerek tüm yüzeyin kaplanması sağlanmıştır. Petri düz şekilde laminer kabin (Biowizard Kojair Tech Oy, Vilppula, Finland) içinde kurumaya bırakılmıştır.

Adsorbsiyon testinin 3, 10, 30 ve 50. dakikaları için aşağıdaki prosedür izlenmiştir. 37°C'de 10 dakika bekletilen bakteri kültürüne 10⁻⁴'lük faj dilüsyonundan 50 µL ilave edilerek tekrar 37°C'lik su banyosuna bırakılmıştır. Fajın, kültüre eklenmesiyle eş zamanlı olarak süre başlatılmıştır. Süre başlangıcından 3 dakika sonra faj ilaveli kültürden 1 mL alınıp 1.5 mL'lik steril eppendorf tüpe konularak + 4°C'lik ortamda yaklaşık 14263 g'da 5 dakika santrifüjlenmiştir. 10mM CaCl₂ içeren 2.25 mL yumuşak agara önce 100 µL *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 ilave edilmiş, ardından santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatanttan 100 µL ilave edilmiştir. Karışım bekletilmeden yaklaşık 10 saniye kadar vortekslendikten sonra 10mM CaCl₂ içeren MRS agar petrisine dökülerek tüm yüzeyin kaplanması sağlanmıştır. Petri düz şekilde laminer kabin içinde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan petripler ters çevrilerek 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oluşan faj plakları sayılarak aşağıdaki formül yardımıyla pfu (plak oluşturan birim) / mL cinsinden faj sayısı (N) hesaplanmıştır.

$$N = \text{plak sayısı} \times 20 \times 10^4 \text{ pfu / mL}$$

Optimal koşullar altında her faj partikülü, konakçı bakteri bulunan petri kutusunda bir plağın oluşmasından sorumludur (Tunail 2009). 0. dakika için pfu/mL cinsinden elde edilen faj sayısı %100 kabul edilerek 3, 10, 30 ve 50. dakikalar için % değerler hesaplanmıştır. Elde edilen değerler kullanılarak zamana bağlı adsorbsiyon eğrisi çizilmiştir.

2.2.4 LL-H fajının adsorbsiyonu üzerine hücrenin gelişme evresinin etkisi

Çalışma boyunca ana suş olarak kullanılan *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşu için gelişme evresinin adsorbsiyon kinetiğine olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla “2.2.3 Adsorbsiyon testi” bölümündeki prosedürde herhangi bir değişiklik yapılmadan logaritmik fazdaki (OD 0.7-1.0) *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşu yerine durağan fazdaki (OD 1.2-1.4) bakteri kültürü ile çalışılmıştır.

2.2.5 Bakır ilavesinin faj adsorbsiyonuna etkisinin belirlenmesi

Lb. delbrueckii ssp. *lactis* ATCC 15808 suşu için 1mM CuSO₄ ilaveli koşullarda çalışılarak Cu elementinin fajın adsorbsiyon kinetiği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla “2.2.3 Adsorbsiyon testi” bölümündeki prosedürde herhangi bir değişiklik yapılmadan faj inokülasyonu öncesinde besiyerine 1mM CuSO₄ ilave edilmiştir.

2.2.6 Alkali koşulların (pH=8.5) faj adsorbsiyonuna etkisinin belirlenmesi

Çalışmada orta hızlı adsorbsiyon gözlenen *Lb. lactis* CRL 934 ve mevcut *Lb. helveticus* suşları içinde adsorbsiyon gözlenmeyen tek suş olan *Lb. helveticus* ATCC 15009 bakterilerinin sırasıyla, adsorbsiyon hızını arttırmak ve adsorbsiyonu mümkün kılabilmek hedefiyle, alkali koşullarda (pH 8.5, tampon çözelti olarak 200 mM TRİS çözeltisi kullanılmıştır) çalışılmıştır.

”2.2.2. Bakteri kültürlerinin aktivasyonu” bölümündeki prosedür izlenerek elde edilen bakteri kültürleri 10 mL MRS broth içinde 1 gece 37°C'lik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Ardından Şekil 2.3'deki prosedür izlenmiştir. Prosedür, Räsänen vd'nin (2007) belirttikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Burada

aynı koşullarda alkali ve alkali olmayan gelişme ortamında çalışılarak alkali ortamın faj adsorbsiyonuna etkisi araştırılmıştır.

İstenilen OD değerine ayarlanan bakteri kültürüyle “2.2.3. Adsorbsiyon testi” bölümündeki prosedür izlenerek adsorbsiyon kinetiği çalışılmıştır. TRİS ile 24 saat muamele edilen *Lb. lactis* CRL 934 suşuna ait adsorbsiyon kinetiği incelendikten sonra, aynı bakteri için 2 saat ve 24 saat TRİS muameleli koşullarda 1, 3 ve 10. dakikalar için analiz tekrarlanmıştır.

2.2.7 Faj plak etkinliğinin belirlenmesi

Çalışmada ana suş olan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşu dışında diğer 17 suş için faj plak etkinliği araştırılmıştır. Faj plak etkinliğinin araştırılmasında “2.2.3. Adsorbsiyon testi” bölümündeki prosedür modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için 10mM CaCl₂ içeren 2.25 mL yumuşak MRS agar içine 100 µL *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 ilavesi yerine EOP’si araştırılan bakteri suşu eklenmiştir. EOP değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{EOP} = \frac{\text{İncelenen suş ile elde edilen plak sayısı (pfu / mL)}}{\text{Lb. delbrueckii ssp. lactis ATCC 15808 ile elde edilen plak sayısı (pfu / mL)}}$$

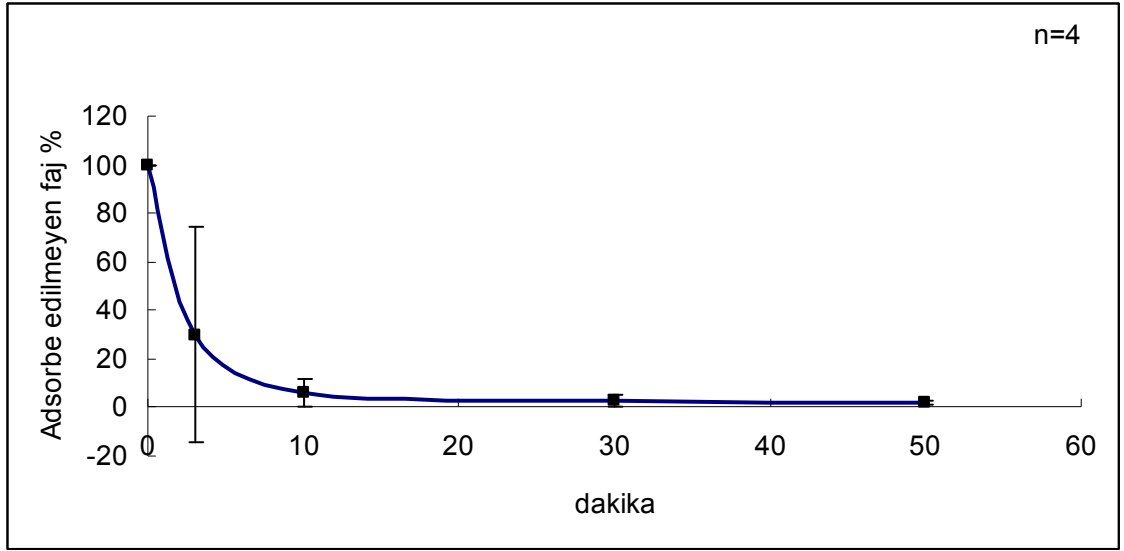
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* (7 adet), *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (6 adet) ve *Lb. helveticus*'a (5 adet) ait toplam 18 bakteri suşuyla çalışılmıştır (Bkz. Tablo 2.1). Araştırmada adsorbsiyon kinetiği çalışılarak bakteri suşlarının LL-H fajına olan hassasiyetleri incelenmiştir. Elde edilen tüm adsorbsiyon eğrileri Şekil 3.1-Şekil 3.15'de sırasıyla gösterilmiştir.

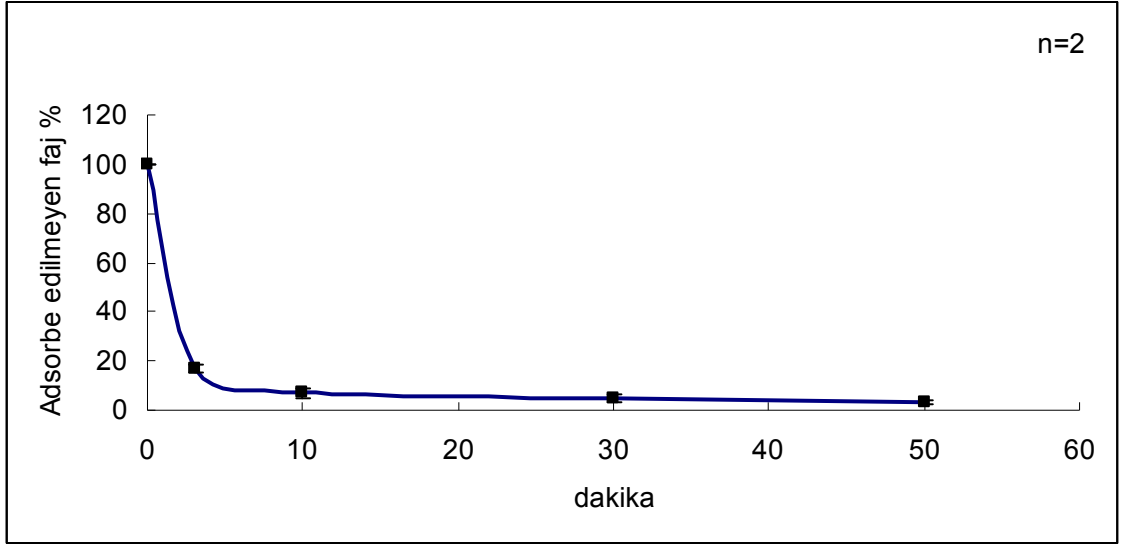
3.1 LL-H Fajının Konakçı Spektrumu

3.1.1 *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* suşları ile elde edilen adsorbsiyon eğrileri

Araştırmada çalışılan 7 adet *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* suşu ile elde edilen adsorbsiyon eğrileri Şekil 3.1-3.6'da gösterilmiştir.

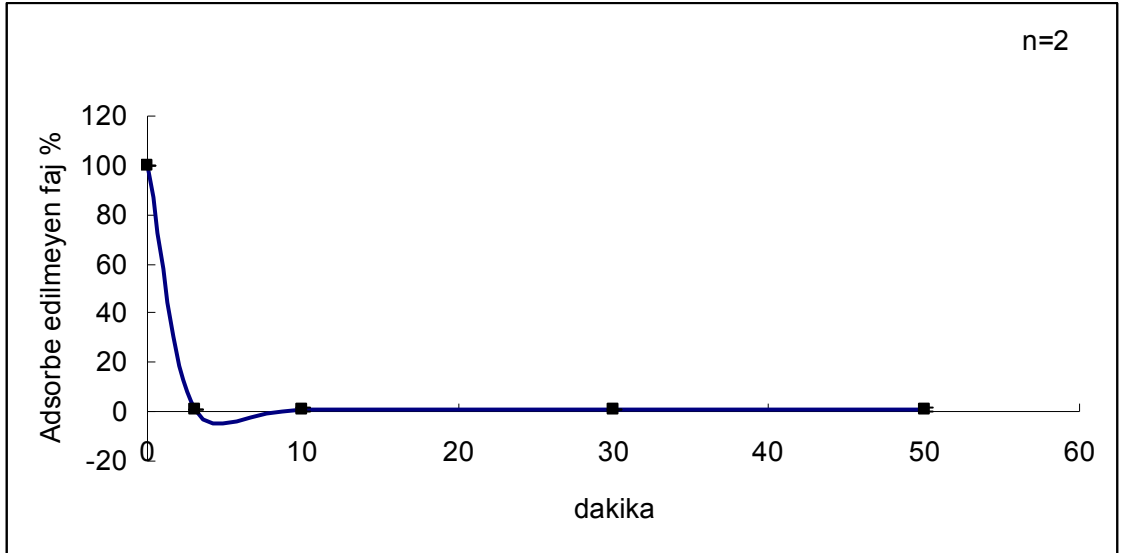


Şekil 3.1 : Logaritmik fazdaki *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi

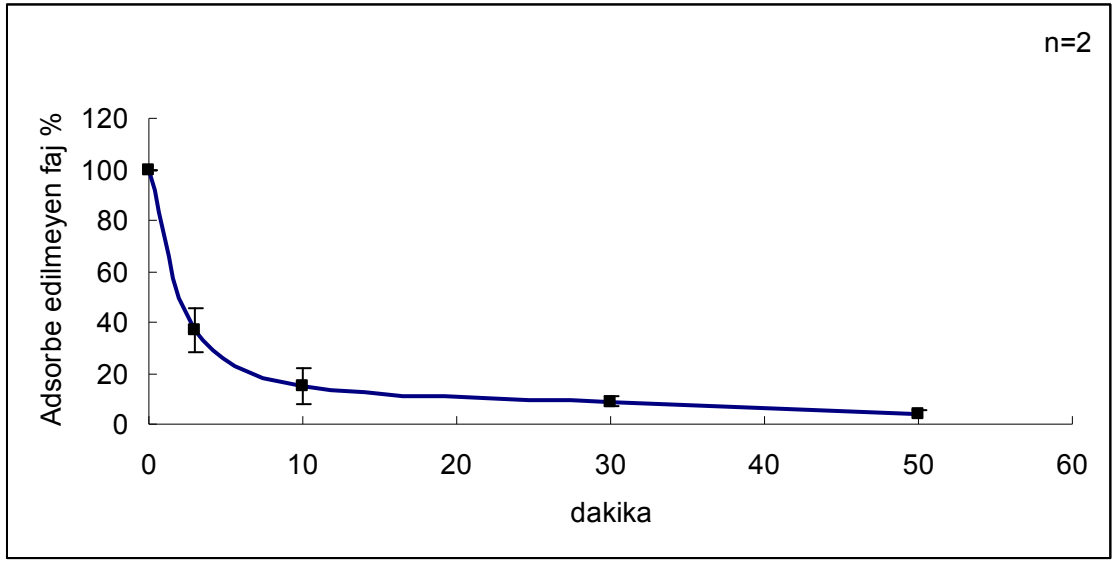


Şekil 3.2 : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* LKT suşuna ait adsorbsiyon eğrisi

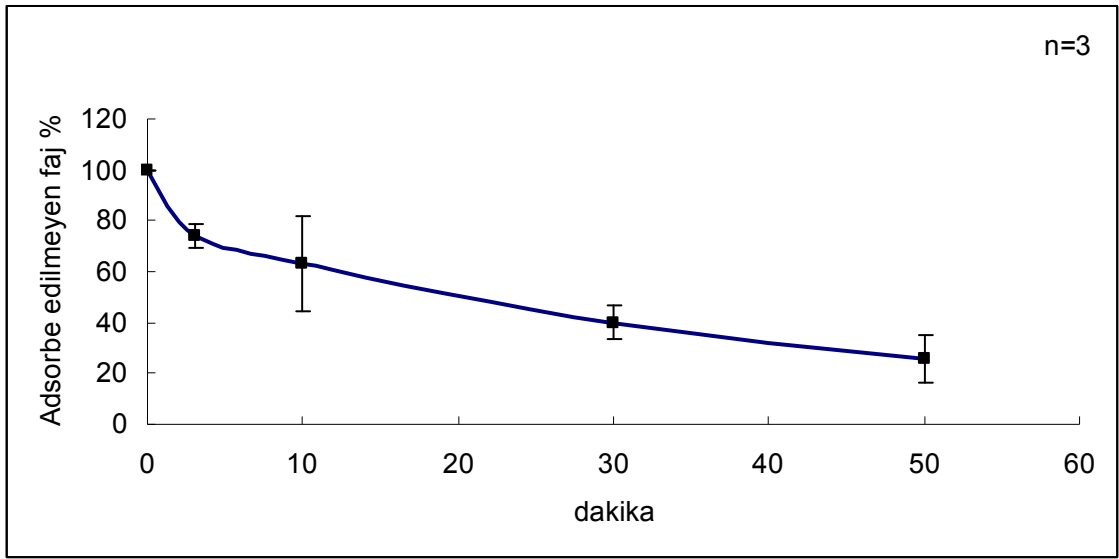
Cluzel vd (1987)'nin yaptığı bir çalışmada *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 ve *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* LKT suşlarının aynı orjinden geldikleri bildirilmiştir (Auad vd 1998). Şekil 3.1 ve Şekil 3.2 göz önüne alınırsa bu iki suşun adsorbsiyon kinetiklerinin benzer olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar iki suşun aynı orjinden geldiğine dair olan görüşü destekler niteliktedir.



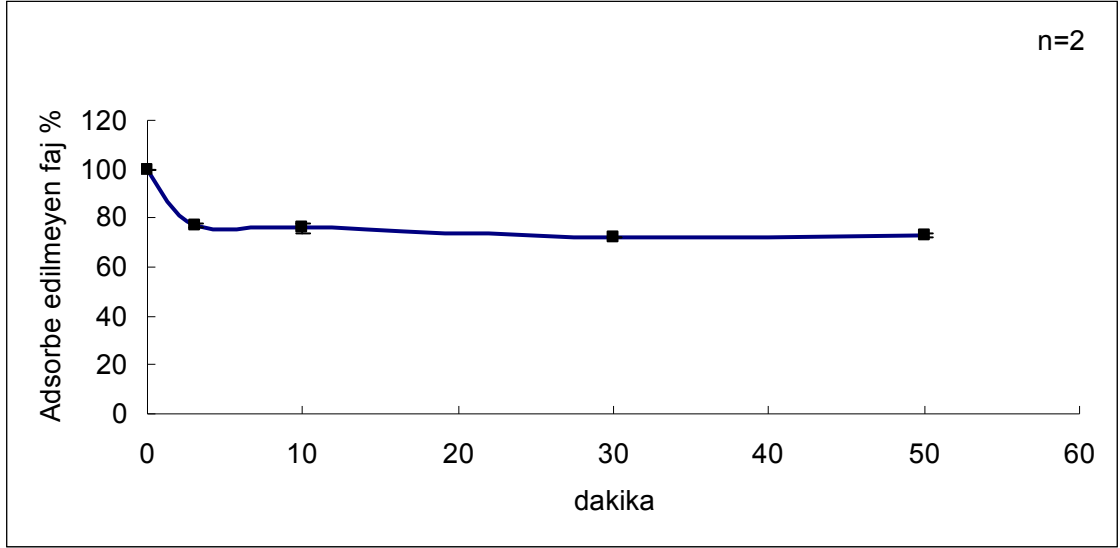
Şekil 3.3 : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* LL 23 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi



Şekil 3.4 : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* CNRZ 327 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi



Şekil 3.5 : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 934 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi

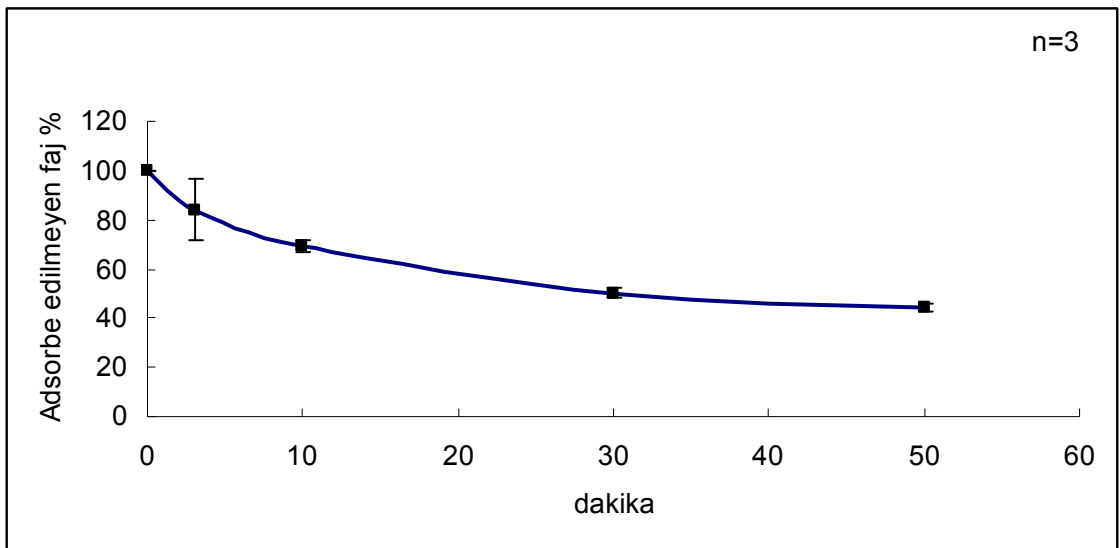


Şekil 3.6 : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* LL78 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi

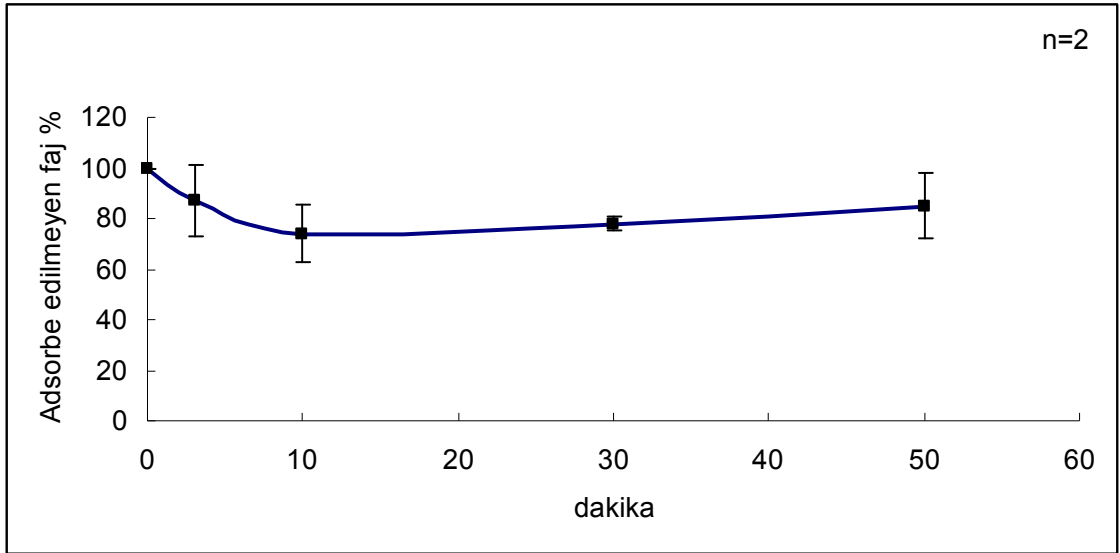
Lb. delbrueckii ssp. *lactis* LL78 suşu kendi altkültürleri arasında en yavaş adsorbsiyon kinetiği göstermiştir. *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* CRL539 suşu lizojenik karakter gösterdiği için adsorbsiyon eğrisi oluşturulamamıştır.

3.1.2 *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşları ile elde edilen adsorbsiyon eğrileri

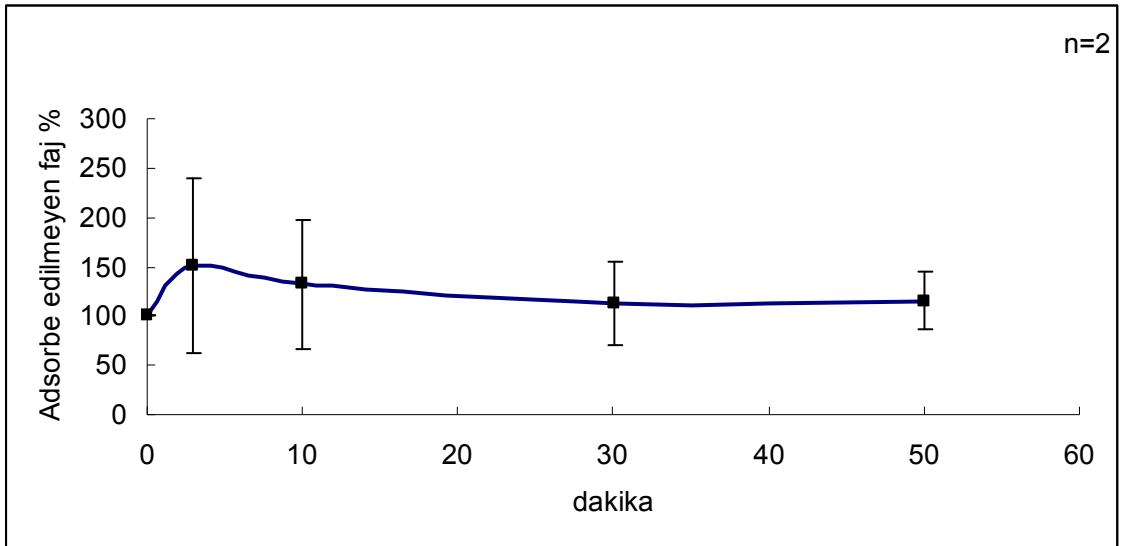
Araştırmada çalışılan 6 adet *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşu ile elde edilen adsorbsiyon eğrileri Şekil 3.7-3.10'da gösterilmiştir.



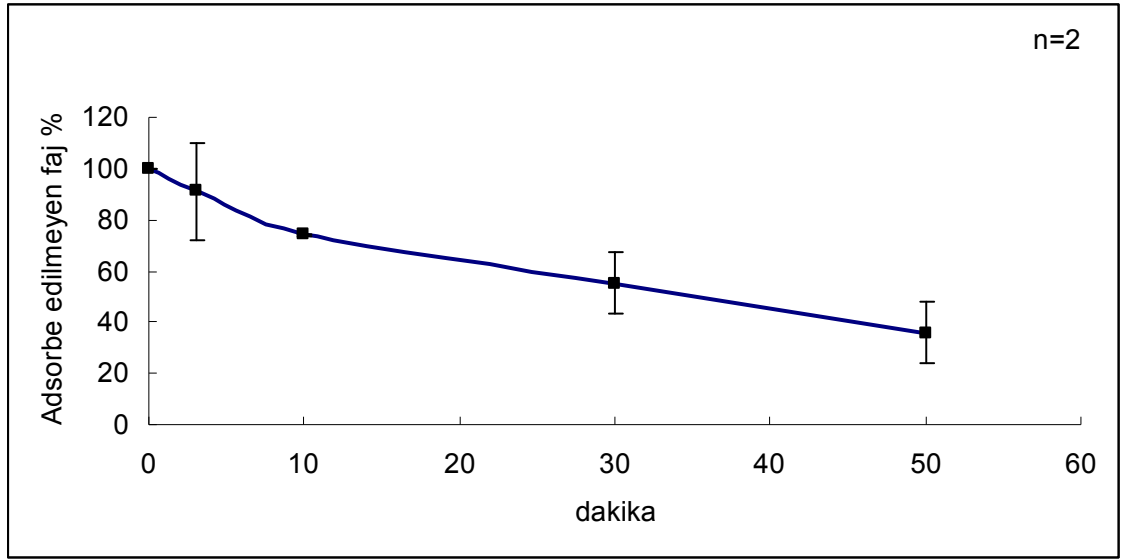
Şekil 3.7 : *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* YC380 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi



Şekil 3.8 : *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB S jarvi suşuna ait adsorbsiyon eğrisi



Şekil 3.9 : *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* MK 9 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi

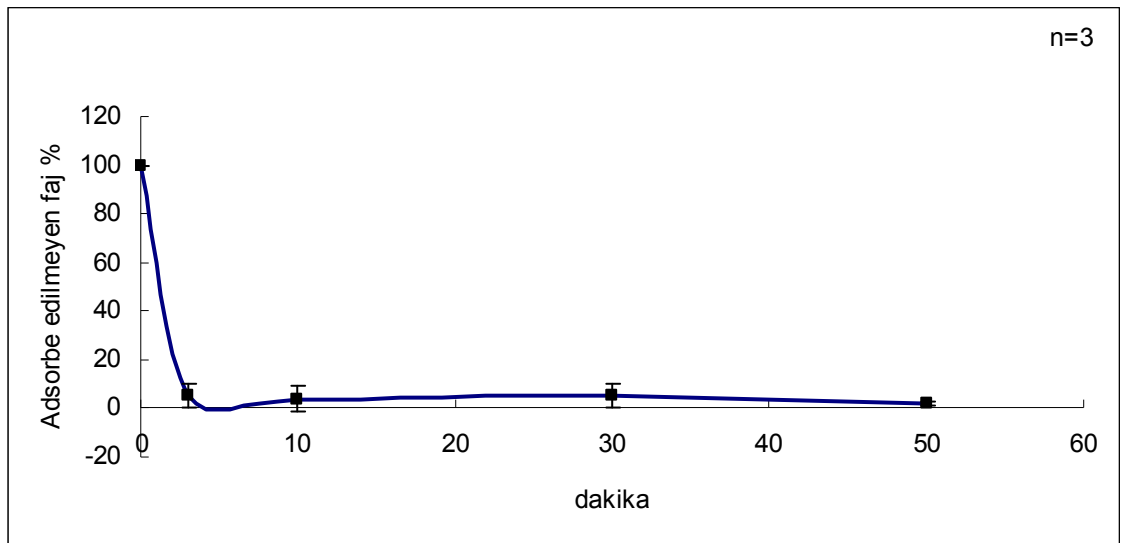


Şekil 3.10 : *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB 120 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi

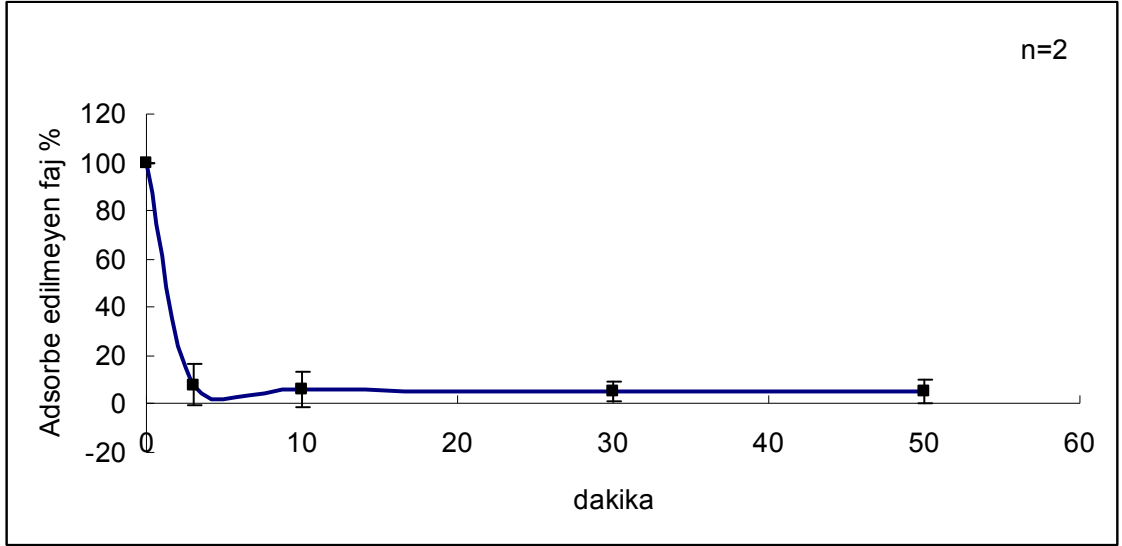
Şekil 3.7, 3.8, 3.9 ve 3.10'dan da görüldüğü gibi *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'a ait suşlarda genel olarak orta hızda adsorbsiyon gözlenmiştir. *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LT4 ve HAMB1449 suşları lizojenik karakter gösterdiği için adsorbsiyon eğrileri oluşturulamamıştır.

3.1.3 *Lb. helveticus* suşları ile adsorbsiyon eğrileri

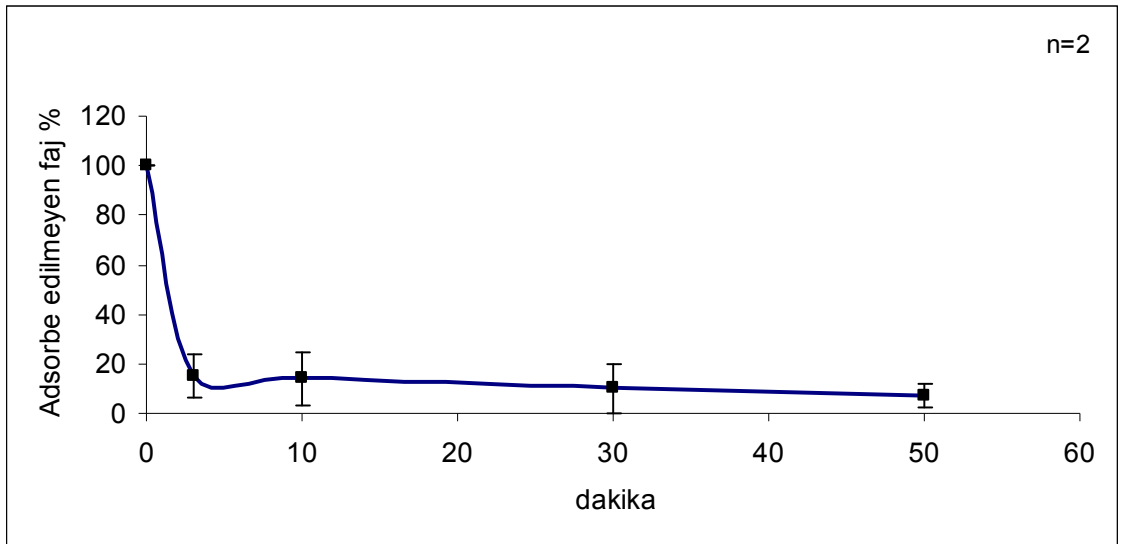
Bilgilerimize göre *Lb. helveticus* suşları için LL-H fajı'nın konakçı spektrumu ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Çalışılan 5 adet *Lb. helveticus* suşu ile elde edilen adsorbsiyon eğrileri Şekil 3.11-3.15'de gösterilmiştir.



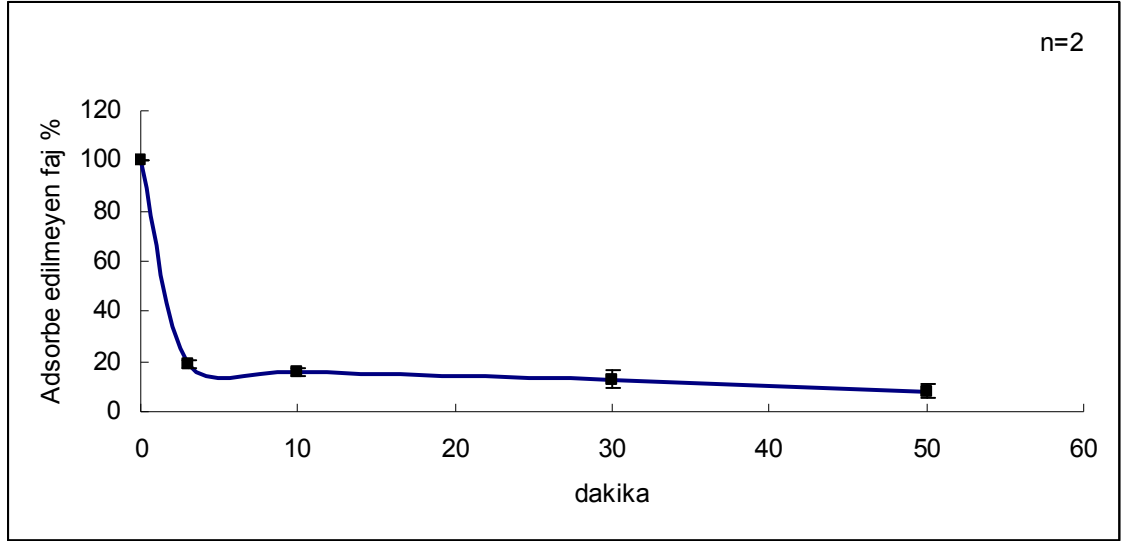
Şekil 3.11 : *Lb. helveticus* 1129 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi



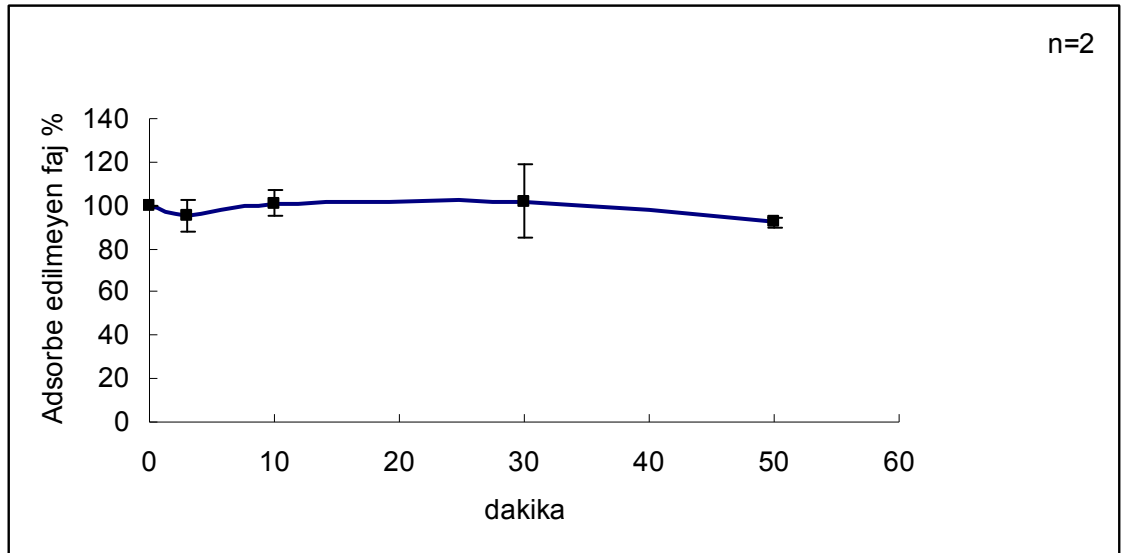
Şekil 3.12 : *Lb. helveticus* 1175 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi



Şekil 3.13 : *Lb. helveticus* 1518 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi



Şekil 3.14 : *Lb. helveticus* AKI 4 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi



Şekil 3.15 : *Lb. helveticus* ATCC 15009 suşuna ait adsorbsiyon eğrisi

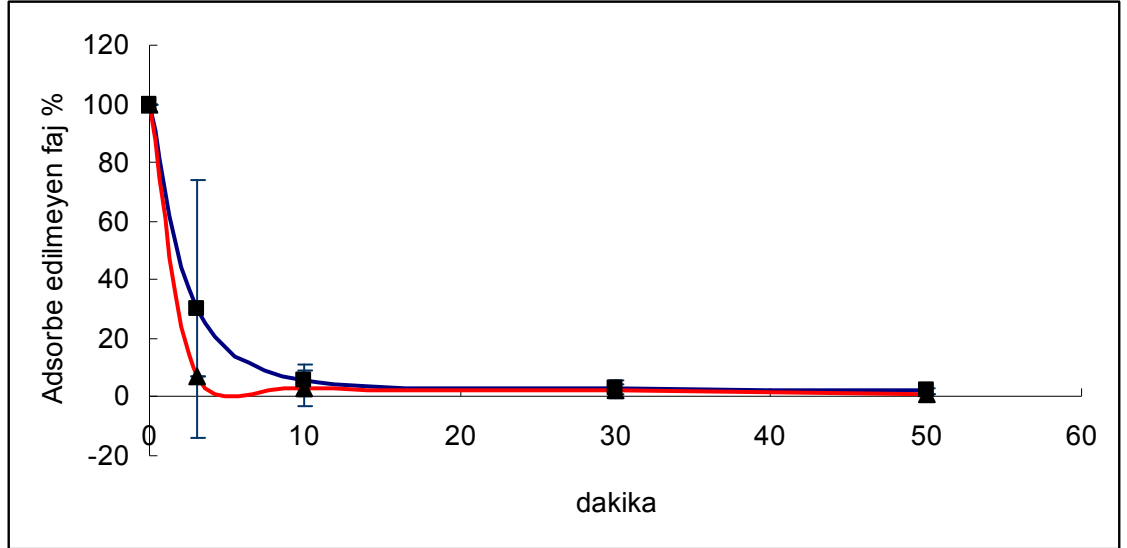
Lb. helveticus ATCC 15009 suşu kendi altkültürleri arasında en yavaş adsorbsiyon göstermiştir. Bu suş haricindeki diğer 4 adet *Lb. helveticus* suşu (1129, 1175, 1518, AKI4) hızlı adsorbsiyon göstermişlerdir.

Farklı suşlara ait adsorbsiyon eğrileri göz önüne alınarak *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ve *Lb. helveticus* suşlarının *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarına kıyasla LL-H fajına daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç farklılığında faj adsorbsiyonu için gerekli olan, hücre membranında bulunan lipoteikoik asit miktarındaki ve yapısındaki

farklılığın rol aldığı düşünülmektedir. Zira yapılan bir çalışmada Räsänen vd. (2004) *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*'den izole edilen lipoteikoik asitlerin *Lb. delbrueckii* fajlarının adsorbsiyonunu engellediğini bildirmektedir. Bakterilerin hücre duvarında bulunan lipoteikoik asitlerin yapılarının farklılıklar gösterebileceği de değişik kaynaklarda bildirilmektedir (Fischer 1988, Fischer vd 1990, Räsänen vd 2004).

3.2 *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 Suşunun Faj Adsorbsiyonu Üzerine Hücrenin Gelişme Evresinin Etkisi

Fajların konakçıya adsorbsiyonlarına konakçı bakterilerin fizyolojik durumları etkili olmaktadır. Genellikle litik fajlar, bakteri metabolizmasının en aktif ve hücre duvarlarının yeni sentezlenmiş olduğu logaritmik gelişme evresindeki bakterilere kolayca adsorbe olmaktadır (Tunail 2009). Çalışma boyunca temel suş olarak kullanılan (LL-H fajı tarafından iyi enfekte edildiği bilinen) *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşu için gelişme evresinin adsorbsiyon kinetiğine olan etkisi incelenmiştir. İki farklı koşul (logaritmik ve durağan faz) için adsorbsiyon eğrileri (Şekil 3.16) değişiklik göstermese de faj plakları büyüklüğünde belirgin değişiklik gözlenmiştir (Şekil 3.17).

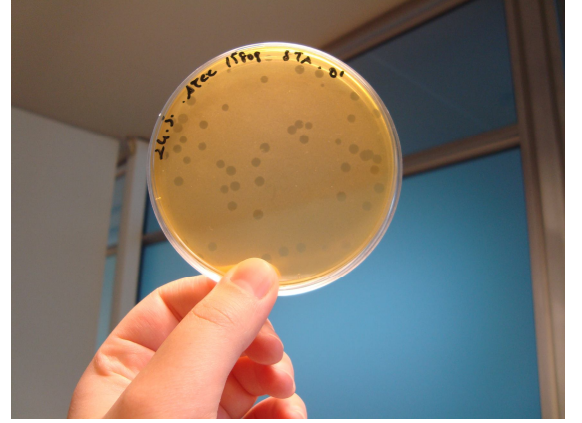


Şekil 3.16 : Logaritmik fazdaki (■, n=4) ve durağan fazdaki (▲, n=2) *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşuna ait adsorbsiyon eğrileri

Durağan fazla çalışıldığında faj plaklarının sayısı azalmış fakat plak büyüklüğü artmıştır. Ancak bu durumun neden kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir. İleride yapılacak moleküler çalışmalarla konu ile ilgili soru işaretlerine netlik kazandırılabilir.



a



b

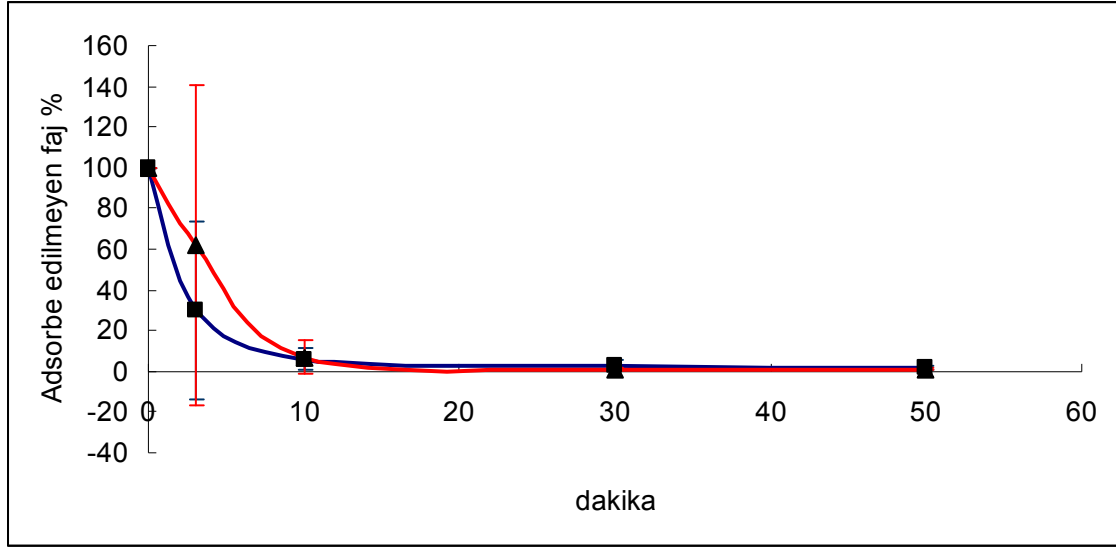
Şekil 3.17 : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşu logaritmik faz (a) ve durağan faz (b) için LL-H bakteriyofajı kullanılarak 0.dakikada elde edilen plaklar

3.3 *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 Suşunun Faj Adsorbsiyonu Üzerine Bakır İlavesinin Etkisi

Emmental peynir üretiminde *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* fajlarının neden olduğu sorunlar ilk kez 1950'lerde Finlandiya'da bildirilmiştir. Bu tarihten sonra *Lb. delbrueckii* fajının süt endüstrisinde önemli bir risk olduğu kabul edilmiştir (Ravin vd 2002). Dünyanın birçok ülkesinde üretilip tüketilen Emmental peynirinin tüketiciler tarafından takdir edilen değeri kullanılan üretim teknolojilerinden kaynaklanmaktadır (Fox vd 2000). Geleneksel yöntemle Emmental peyniri üretiminde bakırın peynir kalitesi üzerine olumlu katkıları nedeniyle, üretimde geleneksel yöntemin (bakır kazanlarda üretim) tercih edilmesi veya peynir üretimi sırasında peynir sütüne ve/veya telemeye bakır çözeltisi ilavesi yoluna gidilmektedir (Walstra vd 2006).

Araştırmada, Emmental peyniri üretimi sırasında ortamda bakır olabileceği göz önüne alınarak temel suş olarak kullanılan *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 kültürü için 1mM CuSO_4 ilaveli koşullarda çalışılarak bakır ilavesinin adsorbsiyon kinetiğine olan etkisi incelenmiştir. 1mM CuSO_4 ilavesi *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşunun çoğalmasında yavaşlatıcı etki gösterirken, adsorbsiyon kinetiğinde herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 3.18). Bu durum bakır

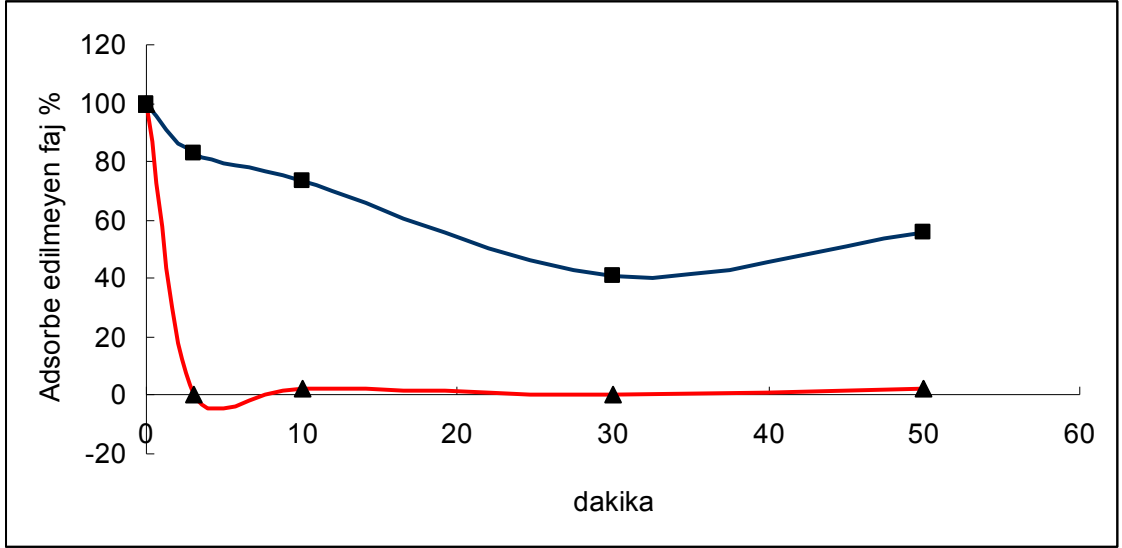
kazanlar kullanılarak üretilen Emmental peynirlerinin faj duyarlılığının azaltılması için alternatif bir yöntem olabilir mi sorusuna olumsuz yanıt oluşturmaktadır.



Şekil 3.18 : Logaritmik fazdaki (■, n=4) ve 1mM CuSO₄ ilaveli (▲, n=2) *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşuna ait adsorbsiyon eğrileri

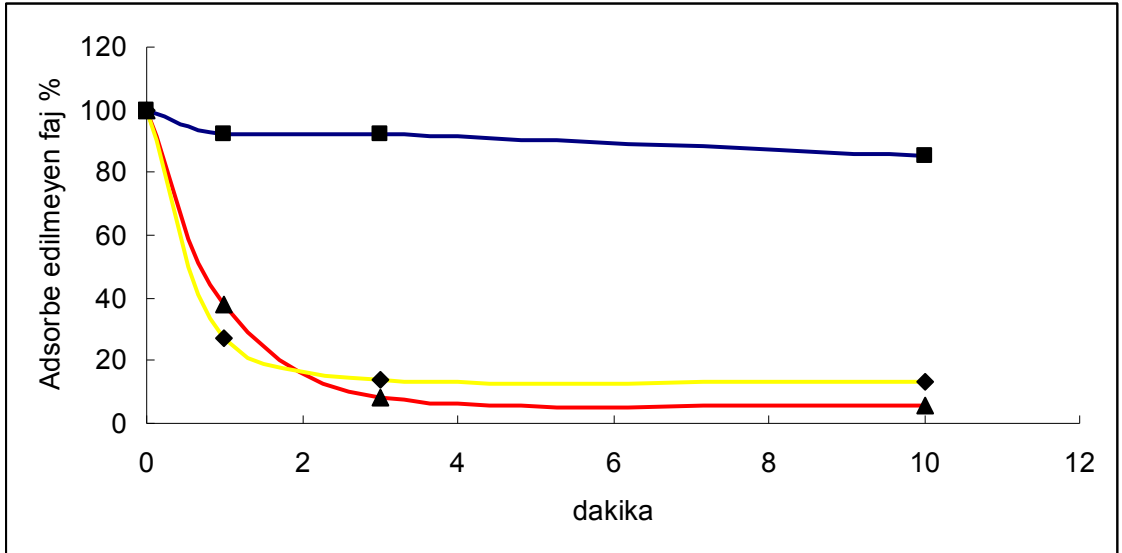
3.4 Alkali koşulların (pH=8.5) faj adsorbsiyonuna etkisi

Alkali ortam koşullarında faj için reseptör olan LTA moleküllerinde bulunan D-alanil'in uzaklaştırılabildiği ve daha iyi faj adsorbsiyonuna olanak sağlanabildiği bilinmektedir (Räisänen vd 2007). Araştırmada normal çalışma koşullarında fajın iyi adsorbe olamadığı (Bkz. Şekil 3.4) *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 934 suşu için ortama alkali ilavesinin faj adsorbsiyon hızını belirgin şekilde arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 3.19, 3.20).



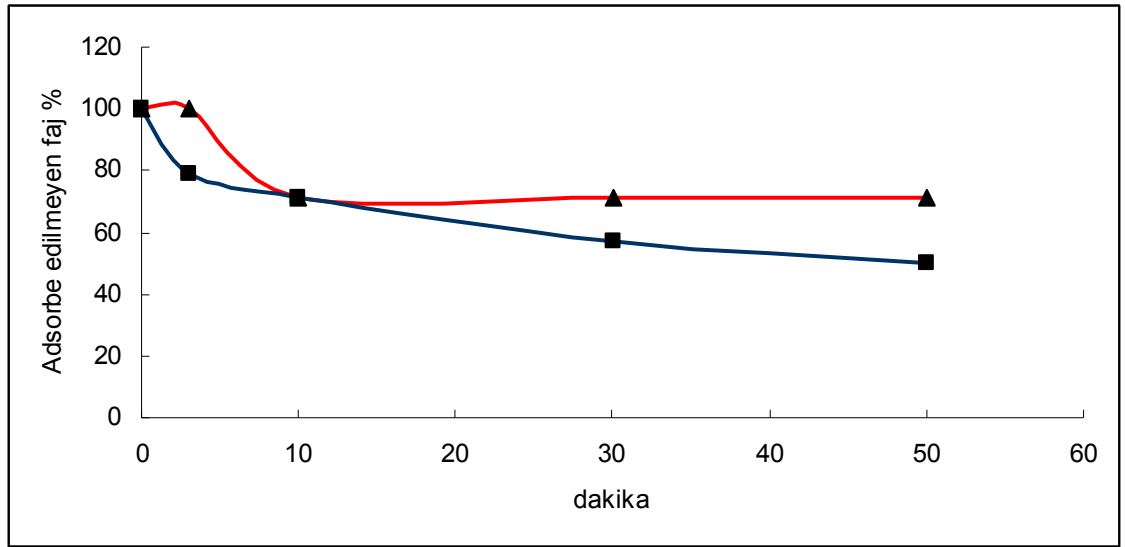
Şekil 3.19 : Alkali ortamda 24 saat bekletilen (▲) ve bekletilmeyen (■, 10 mM Ca'lu) *Lb. lactis* CRL 934 suşuna ait adsorbsiyon eğrileri

Şekil 3.19 dikkate alınarak adsorbsiyon kinetiğinin belirlendiği noktalarda değişiklik yapılmıştır. 2 ve 24 saat alkali ortam muameleli *Lb. lactis* CRL 934 suşu ile 0, 3, 10, 30 ve 50. dakikalar yerine 0, 3 ve 10. dakikalar için adsorbsiyon kinetiği araştırılmıştır (Şekil 3.20).



Şekil 3.20 : Alkali ortamda 24 saat bekletilen (▲), bekletilmeyen (■, 10 mM Ca'lu) ve alkali ortamda 2 saat bekletilen (◆) *Lb. lactis* CRL 934 suşu ile 1, 3, 10. dakikalar için adsorbsiyon eğrileri

Alkali ilavesinin adsorbsiyon gözlenmeyen *Lb. helveticus* ATCC 15009 suşu için belirgin bir etkisi olmamıştır (Şekil 3.21). Bu durum adsorbsiyon gözlenmeyen ve alkali muamelesinin belirgin etki etmediği *Lb. helveticus* ATCC 15009 suşunun hücre duvarı yapısının ve hücre duvarında bulunan LL-H fajının bakteriye adsorbsiyonunda anahtar rol üstlendiği düşünülen lipoteikoik asitlerin kompozisyonunun *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* suşlarının hücre duvarı yapısı ve lipoteikoik asit kompozisyonu farklılığından kaynaklanmış olabilir. Zira bilindiği gibi teikoik asitler, lipoteikoik asitler ve glikolipitler birçok Gram (+) bakterinin hücre duvarı-membran kompleksinin karakteristik bileşikleridir ve farklı bakteriyel türlerin hücre duvarındaki teikoik asit ve lipoteikoik asitlerin kompozisyonları farklıdır (Vasala vd 1995).



Şekil 3.21: Alkali ortamda 24 saat bekletilen (▲) ve bekletilmeyen (■, 10 mM Ca²⁺'lu) *Lb. helveticus* ATCC 15009 suşuna ait adsorbsiyon eğrileri

3.5 Faj Plak Etkinliği

Fajların konakçıları üzerinde oluşturabildiği plaklar olarak tanımlanabilen faj plak etkinliği; fajın farklı bir konakçıda verdiği titrenin homolog konakçısında verdiği titreye oranlanması ile hesaplanabilmektedir (Acar Soykut ve Tunail 2009b). Çalışmada temel suş olan *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşu dışında diğer 17 suş için faj plak etkinliği araştırılmıştır. Çalışılan suşlardan 14 tanesi için plak gözlenmemiş ve dolayısıyla EOP değerleri 0 olarak bulunmuştur. *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* LKT, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* LL 23 ve *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* CNRZ 327 suşları için EOP değerleri sırasıyla 0.76, 0.34 ve 0.27 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar *Lb. delbrueckii*

ssp. lactis suşlarının LL-H fajına, *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Lb. helveticus* suşlarına oranla daha duyarlı olduğuna işaret etmektedir.

Auad vd'nin (1998) yaptığı çalışmada *Lb. delbrueckii ssp. lactis* LKT için EOP değeri 1.2 bulunmuştur. Bu sonuç LL-H fajına karşı iki araştırmada kullanılan *Lb. delbrueckii ssp. lactis* LKT suşu'nun farklı duyarlılık gösterdiğini işaret etmektedir. Aynı suş ve fajla yapılan iki çalışmanın sonuçları arasındaki farklılığın çalışma koşullarının değişikliğinden (besiyeri, bakteri-faj karışımının bekletilme süresi) kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genel olarak araştırma sonuçları değerlendirildiğinde, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ve *Lb. helveticus* suşlarının *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarına göre LL-H fajına daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç farklılığında faj adsorbsiyonu için gerekli olan hücre membranında bulunan lipoteikoik asit miktarındaki ve yapısındaki farklılık rol alıyor olabilir. İlk kez bu araştırmayla *Lb. helveticus* suşları kullanılarak LL-H fajı için adsorbsiyon kinetiği çalışılmıştır. İleride yapılacak olan moleküler boyuttaki çalışmalarla *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ve *Lb. helveticus* suşlarının benzer, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarının ise bunlardan farklı adsorbsiyon kinetiği göstermesindeki nedenler araştırılabilir.

Logaritmik fazdaki ve durağan fazdaki bakteri kültürü kullanımının adsorbsiyon kinetiğini etkilememesine rağmen faj plakları büyüklüğünde belirgin farklılığa yol açtığı gözlenmiştir. Bunun nedenine tam olarak açıklık getirilememiştir. İleride yapılacak moleküler boyuttaki çalışmalarla bu duruma netlik kazandırılabilir.

Çalışma ortamına 1mM CuSO₄ ilavesi *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808 suşunun çoğalmasında yavaşlatıcı etki gösterirken adsorbsiyon kinetiğinde herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. Bu durum bakır kaplar kullanılarak üretilen Emmental peynirlerinin faj duyarlılığının azaltılması için alternatif bir yöntem olabilir mi sorusuna olumsuz yanıt oluşturmaktadır.

Bakteri hücre duvarındaki D-alanil miktarını azaltarak faj adsorbsiyonunun arttırılması için yapılan denemelerde alkali muamelesinin fajın *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 934'e adsorbsiyonunu arttırdığı fakat *Lb. helveticus* ATCC 15009'a adsorbsiyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Konu ile ilgili olarak bundan sonra yapılacak çalışmalarda,

- Faj adsorbsiyonu ve plak büyüklüğü üzerine bakterinin gelişme evresinin etkisinin araştırılması,

- Alkali muamelesinin fajın *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarına olan etkisinin araştırılması,
- Fajın iyi adsorbe olduğu ve olmadığı suşların hücre duvarı yapılarının farklılıklarının araştırılması,
- LL-H fajının gıda endüstrisinde önemli olan diğer laktobasil suşlarını enfekte edip etmediğinin araştırılması,

konu ile ilgili soru işaretlerinin ortadan kaldırılmasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

- Acar Soykut, E., Tunail, N.** (2009a) Termofilik faj taksonomisi. *Gıda*, 34(4):251-258.
- Acar Soykut, E., Tunail, N.** (2009b) Süt endüstrisinde sorun yaratan termofilik fajlar. *Gıda* 34(2): 107-113.
- Ackermann, H. W.** (2003) Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154:245-251.
- Ackermann, H. W.** (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152:227-243.
- Adhya, S. and Merrill, C.** (2006) The road to phage therapy, *Nature*, 443:754.
- Alatossava, T., Pyhtilä, M.J.** (1980) Characterization of a new *Lactobacillus lactis* bacteriophage. *IRCS* 8, 297-298.
- Alatossava, T.** (1987) Molecular Biology of *Lactobacillus lactis* bacteriophage LL-H (PhD Dissertation). *Acta Universitatis Ouluensis* Vol A 191, University of Oulu, Finland.
- Alatossava, T., Formsan, P., Ritzenthaler** (1995) Genome homology and superinfection immunity between temperate and virulent *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages. *Arch Virol.*, 140:2261-2268.
- Anonim** (2009) Scientific opinion on the maintenance of the list of Q PS microorganisms intentionally added to food or feed. *EFSA Journal*, 7(12):1431.
- Anonim** (2010a) Bacteriophage. <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=bacteriophage>
Erişim Tarihi: 17.02.2010.
- Anonim** (2010b) Life cycle of a bacteriophage (bacteriophage lambda). http://www.accessexcellence.org/AB/GG/examples_of_viruses.html Erişim Tarihi: 15.3.2010
- Anonim** (2010c) Bakteriyofaj. <http://tr.wikipedia.org/w/index.php?title=Bacteriophage>
Erişim Tarihi: 17.02.2010.
- Aud, L., Peril, M.A.A., Holgado, A.A.P.R., Raya R.R.** (1998) Evidence of a restriction/modification system in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326. *Current Microbiology*, 36:271-273.
- Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M.** (2009) Isolation of Phage via Induction of Lysogens, Bacteriophages, Volume 1, *Humana Press*, Canada s23-32.
- Douglas, J.** (1975) Bacteriophages. *John Wiley & Sons, Inc.*, New York, USA., 136p.

- Duckworth, D.H., Gulig, P.A.A** (2002) Bacteriophages . Potential treatment for bacterial infections. *Biodrugs*, 16(1):57-62.
- Durupınar, B.** (2005) Bakteriyofajlar Antibiyotiklerin Yerine Kullanılabilir mi?, XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 16-20 Kasım 2005, Belek, Antalya, *Klinik Dergisi*, Özel Sayı 1: 80-81.
- Ergüllü, E.** (1982) Bakteriyofaj ve süt teknolojisinde yarattığı sorunlar. *Gıda*, 7(5):239-245.
- Fischer, W.** (1988) Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 29:233-301.
- Fischer, W., T. Mannsfeld, and G. Hagen.** (1990) On the basic structure of poly(glycerophosphate) lipoteichoic acids. *Biochem. Cell Biol.* 68:33-43.
- Forde, A., Ftizgerald, G.F.** (1999) Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:89-113.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. and McSweeney, P.L.H.** (2000) Principal Families of Cheese. *Funtamentals of Cheese Science. Apsen Publishers Inc.*, Gaithersburg, Maryland: pp:404-408.
- Garcia, P., Martinez, B., Obeso, J. M. and Rodriguez, A.** (2008) Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 479-485.
- Josephsen, J., Neve, H.** (2004). Bacteriophage and Antiphage Mechanisms of Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition, Revised and Expanded (Edited by Salminen, S, von Wright, A. and Ouwehand, A), *Marcel Dekker Inc.*, USA, 295-350p.
- Kılıç, S.** (2008) Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, *Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova*, İzmir, 451.
- Kılıç, S.** (2010) Süt Mikrobiyolojisi. *Sidas Medya Ltd. Şti.*, Çankaya, İzmir, 643s.
- Kımk, Ö., Uysal, H., Kavas, G.** (2000) Pratik Faj Kontrolü, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, İzmir, 109.
- Kutter, E.** (1997) Phage Therapy, Phage Biology, *EverGreen*, 1-15.
- Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S.** (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Microbiology*. 8:317-327.
- Mc Grath, S., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D.** (2007) Bacteriophages in dairy products: Pros and cons. *Biotechnology Journal* 2: 450-455.
- Mikkonen, M.** (1996) Genes and genome of *Lactobacillus* phage LL-H (PhD Dissertation). *Acta Universitatis Ouluensis Vol A 281*, University of Oulu, Finland.

- Mikkonen, M., Räsänen, L., Alatossava, T.** (1996) The early gene region completes the nucleotide sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* phage LL-H. *Gene*, 175:49-57.
- O Flaherty, S., Ross, R. P. And Coffey, A.** (2009) Bacteriophages and their lysins for elimination of infectious bacteria. *Fems microbiol Rev*, 33:801-819.
- Ravin, V., Räsänen, L., Alatossava, T.** (2002) A conserved C-terminal region in Gp71 of the small isometric-head phage LL-H and ORF474 of the prolate-head phage JCL1032 is implicated in specificity of adsorption of phage to its host, *Lactobacillus delbrueckii*. *J. Bacteriol.* 184: 2455-2459.
- Räsänen, L., Schubert, K. , Jaakonsaari, T., Alatossava, T.** (2004) Characterization of lipoteichoic acids as *Lactobacillus delbrueckii* phage receptor components. *J. Bacteriol.* 186: 5529-5532.
- Räsänen, L., Draing, C., Pfitzenmaier, M., Schubert, K., Jaakonsaari, T., von Aulock, S., Hartung, T. and Alatossava, T.** (2007) Molecular interaction between LTAs and *L. delbrueckii* phages depends on D-Alanyl and α -glucose substitution of poly(glycerophosphate) backbones. *J. Bacteriol.* 189: 4135-4140.
- Rodriguez, L.M. and Alatossava, T.** (2008) Effect of copper supplement on growth and viability of strains used as starters and adjunct cultures for Emmental cheese manufacture. *Journal of Applied Microbiology.* 105: 1098-1106.
- Singleton, P., Sainsbury, D.** (1993) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. *Wiley-Interscience.* Great Britain.s321.
- Stone, R.** (2002) Stalin's Forgotten Cure. *Science*, 298:728-731.
- Şanlıbaba, P., Akçelik, M.** (2000) Çiğ süt ve peyniraltı sularından izole edilen laktokokların faj duyarlılıkları. *Türk J Biol*, 24:425-435.
- Tunail, N.** (2009) Virüsler ve Bakteriyofajlar, Mikrobiyoloji, *Pelin Ofset*, Ankara,126-149.
- Vasala, A., Vailkkila, M., Caldentey, J. and Alatossava, T.** (1995). Genetic and biochemical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophage LL-H lysin. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11): 4004-4011.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M. and Geurts, T.J.** (2006) Cheese Varieties. Dairy Science and Technology. 2nd edition. *Taylor & Francis Group*, Boca Raton,pp:719-722.
- Whitehead, H.R., Cox, G.A.** (1935) The occurrence of bacteriophage in cultures of lactic streptococci. *New Zealand J. Sci. Technol.* 16: 319-320.
- Whitehead, H.R.** (1953) Bacteriophage in cheese manufacture. *Bacteriol Rev.* 17(2): 109-123.

VEŞKALIK FOTO

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Özge GÖKÇE

Doğum Yeri ve Tarihi: Antalya / 12.09.1986

Adres: Zafer Mahallesi Antkoop Başak Sitesi B-2 No : 25 Kepez / Antalya

Lisans Üniversite: Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Yayın Listesi:

- Gökçe, Ö., Selçuk, A. R., Yılmaz, Y. ve Gürsoy, O. (2009) Süt ve Süt Ürünlerinde Bitkisel Ekstraktların Fonksiyonel Bileşen Olarak Kullanılması. Pamukkale Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Bildiriler Özet Kitabı, s 65-66.