

Retentate Süt, Permeate ve UF Retentate Peyniraltı Suyunda Bakteriyofaj Aranması Üzerinde Bir Araştırma

Yrd. Doç. Dr. Yavuz İBEYATLI

Gazi Univ. Fen - Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü — ANKARA

ÖZET

Bu çalışmada Ultrafiltrasyon ile elde edilen retentate, permeate ve UF retentate ile yapılan peynirin peyniraltı suyundaki fajların 5 adet laktik asit bakterisi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Deneme materyalinde *S.thermophilus* ve *L.bulgaricus*'u lize eden faja rastlanmamış, ancak *S.lactis*, *S.cremoris* ve *S.diacetylactis* üzerine etkili fajların varlığı gösterilmiştir.

SUMMARY

In this research, presence of bacteriophages active against 5 different lactic acid bacteria in UF retentate, permeate and UF retentate whey have been examined.

While no bacteriophage of *S.thermophilus* and *L.bulgaricus* have detected in all samples, phages active against to *S.lactis*, *S.cremoris* and *S.diacetylactis* were found in some samples of materials.

1. GİRİŞ

Bakteriyofajlar (ya da kısa deyiimi ile fajlar) bakterilerin zorunlu parazitleri olup ancak canlı bakteri hücreleri içinde çoğalabilen viruslardır. Fajlarla, enfekte edebildikleri bakterinin türü, tipi hatta suşu arasındaki ilişki yüksek derecede özgüldür; bir bakteriyofaj tipi özgül bir bakteri tipini (ve bir çok olgularda sadece belirli suşlarını) enfekte edebilir. Bu özgül ilişki karşılıklı olarak bakteri (ya da faj) suşlarının tanımlanması, genetik yapılarının belirlenmesi ve herhangi bir kaynaktan arzu edilen fajların elde edilmesi için kullanılabilir (1).

Bakteriyofajların laktik starter kültürleri üzerindeki etki mekanizması pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Starter kullanılan ülkelerde peynir yapılacak süte katılan saf kül türlerin peynirlerde gerekli asitliği oluşturamadığı, bundan dolayı arzu edilen tat ve aromanın gelişemediği, peynirlerin düşük kaliteli olduğu görülmüştür. Konu üzerinde çalışan araştırmacılar bu duruma bakterileri lize ederek onların

gelişmesini, dolayısıyla fonksiyonlarını engellen laktik asit bakterilerine özgül virulent karakterli bakteriyofajların neden olduğunu saptamışlardır. İlk kez 1935 yılında Yeni Zelanda'da bir işletmede kullanılan starter kültürde bakteriyofaj varlığı Whitehead tarafından saptanmıştır (2).

Laktik asit bakterilerinde bakteriyofajların varlığı ortaya konulduktan sonra, sorunun giderilmesi için uzun yıllar çalışmalar sürdürülmüş, özetle starter olarak kullanılacak kültürlerin faj akrahalığı bulunmayan suşlardan karışık kültür olarak hazırlanması ve bunlarında işletmelerde rotasyon sistemi ile kullanılması önerilmiştir. Ayrıca fajlara dirençli laktik asit bakterilerinin seçimi ve bu karakterin bakteride stabil hale getirilmesi çalışmaları bu alanın boyutlarını genişletmiş, pek çok olumlu karakter gibi faj dirençliğinde plazmidlerle olan ilişkisi gündeme gelmiştir (2, 3, 4, 5, 10, 11, 12).

Ultrafiltrasyon (UF) süt teknolojisinde geliştirilen yeni bir konsantrasyon yöntemidir. ABD'de ve Avrupa ülkelerinde bu yeni yöntem ile elde edilen sütler çeşitli peynirlerin yapımında kullanılmaktadır (6, 7).

Bu çalışmanın amacı UF yöntemi ile elde edilen retentate (koyulaştırılmış) süt, permeate (UF sonucu geriye kalan sıvı) ve retentate süt ile yapılan peynirin peynir altı suyunun da starter olarak kullanılan 5 laktik asit bakterisine özgül bakteriyofajların aranmasıdır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

— **Bakteriler** : A.B.D. Oregon State University'den sağlanan *Streptococcus thermophilus*, A.B.D. Cornell University'den sağlanan *Lactobacillus bulgaricus*, Kanada Roseil Inst'dan sağlanan *S.lactis*, *S.diacetylactis* ve *S.cremoris* kullanılmıştır.

— **Retentate** : Çiğ süt 50°C'da Abcor 22-5 UF cihazında 2:1 konsantrasyonda koyu-

laştırılmıştır. Bu sütün proteinini çöktürmek amacıyla % 50 laktik asit ilave edilip iyice karıştırılmış, kendi halinde 3' bırakıldıktan sonra Whatman 42 filitre kağıdından süzülmüştür (8). Bu şekilde elde edilen berrak sıvı faj aranmasında kullanılmıştır.

— **Permeate** : UF sonucu elde edilen düşük kuru maddeli artıktır.

— **Peyniraltı suyu** : Retentate sütün üretilen peynirin peyniraltı suyudur.

2.2. Yöntem

2.2.1. Bakterilerin Aktifleştirilmesi ve Muhafazası

Liyofilize kültürler M 17 Broth besiyerinde aktifleştirildikten sonra % 10 oranında koruma ortamına (% 11 W/V skimmilk + % 15 W/V Gliserol) inoküle edilip hemen -20°C 'da dondurulmuşlar, kullanılacakları zaman 30°C 'da 16 saat inkübasyon ile aktifleştirilmişler, sonra % 11 W/V skimmilk ortamında 2-3 ardışık transferle tam aktif duruma getirilmişlerdir.

2.2.2. Örneklerin Hazırlanması

Retentate, permeate ve peyniraltı suyunun sıvı kısımları 20.000 d/d'da 20' santrifüjlenmiş, süpernatantlar önce 43, sonra 1 nolu Whatman filitre kağıtlarından süzölmüş, süzöntüler ise GS 0,22 μ filitre kağıdından geçirilerek sterilize edilmişlerdir.

2.2.3. Bakteriyofaj Aranması

Terzaghi ve Sandin'e göre (9) yapılmıştır. Bu amaçla skimmilk ortamında aktifleştirilen kültürler M 17 Broth besiyerine inoküle edilmişlerdir. 16 saat inkübasyondan sonra steril tüplere 0,1 ml aktarılmış, üzerlerine 1'er damla kalsiyumklorür (1 Mol) ilave edilip karıştırılmışlardır.

Filtratların ise önce M 17 Broth besiyerinde dilüsyonu yapılmış, sonra bunlardan 0,1'er ml alınıp yukarıda açıklanan kültür +CaCl₂ tüplerine aktarılmış ve iyice karıştırılmışlardır.

Tüpler 10' bekletildikten sonra 45°C da bekletilen M 17 Agar besiyeri üzerine daha önce petri kutularına dökölmüş yine M 17 Agar besiyeri üzerine üst katman olarak dökölmüşlerdir. Termofil kültür içeren petri kutuları 37°C 'da, laktik kültür içeren petri kutuları 28°C 'da 18-20 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyondan sonra petri kutularında plak (plague) oluşup oluşmadığı kontrol edilmiş, ve faj sayısı pfu (plague forming unit = plak oluşturan birim) olarak hesaplanmıştır. Çalışma 5 kez tekrarlanmıştır.

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

Retentate, permeate ve peyniraltı sularındaki özgül fajların varlığı ve sayıları çizelge 1'de toplu halde verilmiştir.

Çizelge 1'den göröldüğü gibi deneme materyallerinin hiçbirisinde **S. thermophilus** ve **L. bulgaricus**'a özgül faja rastlanamamıştır.

S. diacetilactis'e özgül tek faja 5 permeate örneğinden sadece 1'inde rastlanırken toplam 15 materyalden 6'sında **S. lactis**'i, 5'inde **S. cremoris**'i lize eden fajlar bulunmuştur.

Elde edilen toplam 12 faj lizatının materyallere dağılımında ise 2 lizatın retentateden, 5 lizatın permeateden ve 5 lizatın peyniraltı suyundan alındığı yine çizelge 1'den görölmektedir.

Permeate örneklerindeki faj sayısı 10-20 pfu/ml arasında iken retentate peyniraltı suyunda 10-40.000 pfu/ml olması, aynı şekilde UF retentate'den **S. lactis** ve **S. cremoris**'e özgül fajların bulunması, özellikle 5 nolu retentatede **S. cremoris**'e özgül 200 pfu/ml faja rastlanırken 5 nolu örneğin permeatında ve retentate peyniraltı suyunda faja rastlanamaması dikkat çekicidir. Bu sonuçlar; sütte bulunabilen fajların UF işleminden canlı olarak retentateye geçebildiği peynir işleme sırasında ise alet ekipmandan faj bulaşabildiği şeklinde yorumlanabilir (10).

Çizelge 1. UF Retentate, Permeate ve Peyniraltı Suyunda Bakteriyofajların Bulunma Durumları

Bakteriler	Bakteriyofaj pfu / ml														
	UF Retentate Süüt					P e r m e a t e					Peyniraltı Suyu				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>S. thermophilus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. lactis</i>	—	—	—	—	10	—	20	—	—	10	10	10 ³	—	10 ⁴	—
<i>S. cremoris</i>	—	—	—	—	2.10 ²	10	10	—	—	—	—	10 ²	4.10 ⁴	—	—
<i>S. diacetylactis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	10	—	—	—	—	—	—
<i>L. bulgaricus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(—) : Bakteriyofaja rastlanmamıştır.

LİTERATÜR LİSTESİ

- 1) AKMAN, M. 1983. Bakteri Genetiği, 2. bas-
kı. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi
Yayınları no: 8, Emek Basımevi, Sivas, 569
sayfa.
- 2) ÖNER, Z. 1985. Peynir ve Peyniraltı Suyun-
da Bulunan Laktik Streptokokların Özgül
Fajlarının Aranması ve Konakçıları Belli
Bazı Laktik Fajlara Karşı Özgüllüklerinin
Saptanması, Doktora Tezi. Ankara Üniversi-
tesi Ziraat Fakültesi T. Mikrobiyolojisi Biri-
mi, basılmamış.
- 3) HALL, R.R., 1977. Methods for monitoring
bacteriophages in Cheese factories. Austrai-
lian J. of Dairy Technology. 32 (2) 63-64.
- 4) LIMSOUTIN, G.K.Y., B.E. TERZAGHI,
1977. Phage resistant mutants; their selec-
tion and use in cheese factories. N.Z.J.L.
Dairy Sci. Tech. 11, 251 - 256.
- 5) THOMAS, T.D., R.J. LOWRIE, 1975. Star-
ters and bacteriophages in Lactis and Casein
manufacture. J. Milk Food Technol. 38 (5)
269 - 277.
- 6) JONES, T., W. KOERSEN, L. OZIMEK,
M.E. STILLES, 1988. Ability of cheese cul-
tures in concentrated milks prepared by
ultrafiltration. American Dairy Science As-
sociation JDS Volume 71, Supplement 1.
- 7) PREMARATNE, R.J., M.A. COUSIN. 1988.
Growth of Starter cultures in heat processed
ultra filtered skim milk. JDS. Volume 71,
Supplement 1.
- 8) FOSTER, E.M., F.E. NELSON, M.L. SPECK,
J.C. OLSON, 1967. Dairy Microbiology. Pren-
tice - Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. USA.
- 9) TERZAGHI, B.E., W.E. SANDINE, 1975;
Improved medium for lactic streptococci and
their bacteriophages. Applied Microbiology,
29 (6) 807 - 813.
- 10) LODICS, T.A., L.R. STEENSON, 1988. Cha-
racterization of bacteriophage and phage
resistance mechanisms in a commercial,
mixed - strain phage - carrying dairy starter
cultures. JDS, Volume 71, Supplement 1.
- 11) PEARCE, L.E., 1978. The effect of host -
controlled modification on the replication of
a Lactic Streptococcus bacteriophages.
N.Z.J.L. Dairy Sci. Tech. 13, 166 - 171.
- 12) SANDINE, W.E. 1979. Lactic Starter Cul-
ture Technology, Pfizer cheese monographs.
Volume VI. Pfizer INC. New York, USA.