

## SÜT ENDÜSTRİSİNDE SORUN YARATAN TERMOFİLİK FAJLAR

Esra Acar Soykut<sup>1</sup>, Nezihe Tunail<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 31.03.2008

Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 04.05.2008

Kabul tarihi / Accepted: 08.05.2008

### Özet

Starter kültürler standart tat, aroma ve kıvama sahip hijyenik ürünlerin eldesi için yoğurt dahil birçok fermente ürünün üretiminde kullanılmaktadır. Üretim sırasında, teknolojik proses parametrelerinin yanında starter olarak kullanılan kültürlerin taşıdıkları özellikler çok büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle üreme yetenekleri ve fizyolojik verimlilikleri yüksek, bakteriyofajlara dirençli, lizogen olmayan aktif kültürler seçilmektedir. Starter kültür kullanımı standart kalitede ürün eldesini sağlamış olsa da faj problemini de beraberinde getirmiştir. Faj sorunu ile sıklıkla karşılaşılması, bu fajların kontaminasyon kaynaklarının lizogen suşlar mı yoksa çiğ süt mü olduğu araştırılmasına neden olmuştur. Faj probleminin önüne geçilmesi amacıyla rotasyon programları, temizlik, dezenfeksiyon uygulanmakta, direkt set kültürler ve faj inhibitör ortamları kullanılmaktadır. Ayrıca bazı kültürler fajlara karşı; faj adsorbsiyonunun ve DNA injeksiyonunun engellenmesi, abortif infeksiyon ve restriksiyon/modifikasyon sistemleri olmak üzere toplam dört adet faj direnç mekanizmasından birini taşıyabilmektedirler. Virulent veya temperent karakterde olan bu fajların, konakçıları üzerinde sırasıyla litik ve lizogenik olmak üzere iki tip yaşam şekli vardır. Bu yaşam döngülerinin başından sonuna kadar fajların her birine özgü olan gelişme parametreleri bulunmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, litik döngü, lizogenik döngü, faj direnç sistemleri, replikasyon parametreleri

## TERMOPHILIC PHAGES THAT CAUSE FAILURE IN DAIRY INDUSTRY

### Abstract

Starter cultures are used in the production of a wide variety of fermented products to achieve hygienic products with standard flavour, aroma and consistency. During the production, the properties of the starter cultures are critically important besides the technological process parameters. For this reason, active cultures with high growth potential and physiological yield, which are resistant to bacteriophages and are not lysogenic, must be preferred. Although it provides products with standard quality, utilizing starter cultures introduced the bacteriophage problem. There have been many attempts to investigate whether the contamination results from the lysogenic strains or the raw milk. In order to prevent the phage problem, rotation programs, cleaning and disinfection are implemented and direct set cultures and phage inhibitor mediums are used. Besides, some cultures may show resistance to phages due to having one of the four resistance mechanisms which are phage adsorption, inhibition of DNA injection, abortive infection and restriction/modification systems. These phages which are either virulent or temperent, have two types of life cycles in their hosts, namely lytic or lysogenic. Through out these life cycles, each individual phage has its specific growth parameters.

**Keywords:** *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, litic cycle, lysogenic cycle, phage defense mechanism, replication parameters

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ esraacar2@gmail.com, ☎ (+90) 312 297 7100 📠 (+90) 312 299 2123

## GİRİŞ

Laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) ve *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*), yoğurt üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Termofilik karakterde olan bu bakterilerin kullanıldıkları üründe standart kalitenin eldesi için, laktik asit ve asetaldehit üretim yeteneklerinin, proteolitik ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu özellikleri bilinen suşlar arasında oluşan simbiyotik ilişki sayesinde, yoğurda özgül koku, tat, aroma ve yoğunluk oluşmaktadır (1). Ayrıca, kültürlerin bakteriyofajlara (faj) karşı duyarlı olup olmadığının da kontrol edilmesi gerekir. Aksi takdirde starter kültürlerden birinin bile ortamda bulunabilecek faj veya fajlara duyarlı olması durumunda, hücreler lize olacağından fermentasyon yavaşlayacak veya durma noktasına gelecek, ürün kaybı söz konusu olacak ve dolayısıyla kültürün sahip olduğu diğer özelliklerin bir anlamı olmayacaktır (2-4). Ticari starter kültür kullanımının, beraberinde faj problemini de getirdiği düşünülmektedir (5). Böyle düşünülmesinin nedeni, endüstriyel *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarından neredeyse hepsinin, çalışmalarda kullanılan yerel fajlara duyarlılık gösteriyor olmasıdır (3, 4, 6-8).

Süt endüstrisinde fermentasyonların başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olan bu virüent fajların kaynağının, çiğ süt mü yoksa lizogenik starter kültürler mi olduğu, günümüzde hala tartışılmaktadır. *Lactococcus* fajları söz konusu olduğunda; temperent ve virüent fajlar arasında homoloji saptanmadığından sorunun lizogenik suşlardan kaynaklandığı söylenemez. Ancak *Lactobacillus* ve *S. thermophilus* virüent ve temperent fajları arasında var olan homoloji, kaynağın lizogenik suşlar olduğunu düşündürmektedir (9-11). *S. thermophilus* fajlarından Sfi21 temperent fajının, lizogeni modülündeki 2.4 kb'lık kayıp ile virüent faja dönüştüğü ve Sfi19 litik fajından sadece %10 oranında farklı olduğu rapor edilmiştir (12). Lizogeninin laktik asit bakterilerinde yaygın olduğu bilinmektedir (13). Bununla beraber laktokoklara ve laktobasilere oranla *S. thermophilus* suşlarında lizogeniye daha ender rastlanmaktadır (13, 14-18). Sechaud ve ark., 148 adet laktobasil suşunda %27, 105 adet *Lb. bulgaricus* suşunda %9.5 (15); Smaczny 24 adet *S. thermophilus* suşunda %25 (19); Brussow ve ark., 100 adet *S. thermophilus* suşunda %2 (17); Brussow ve Bruttin ise 196 adet *S. thermophilus* suşunda %1.53 (20) lizogeniye rastlamışlardır. Kaleli ve

Tunail ile Kahraman ise çalıştıkları yerel ve ticari *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşlarında lizogeni saptamamışlardır (8, 21). Diğer yandan laktik fajların pastörizasyon normlarında aktif kalabilmeleri kaynaklarının çiğ sütler olduğunu düşündürmektedir (22, 23). Binetti ve Reinhammer, çalıştıkları *S. thermophilus* fajlarından bazılarını 90 °C'de 5 dk., Sozzi ve Maret ise 72 °C'de bir saat veya 90 °C'de yirmi saniye tutulması durumunda ancak inaktive olduğunu belirtmişlerdir (23). Acar Soykut tarafından yapılan başka bir çalışmada da 72 °C'de 1 dakika süreyle pastörize edilmiş süttten ticari *S. thermophilus* suşu ile faj izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir (24).

Faj probleminin önüne geçmek için, starter kültürlerin hazırlanmasında faj inhibitör ortamların kullanımı, yeni bir fabrika dizaynı, kültür hazırlama bölümünün tamamen fabrika ortamından ayrılması, DVI (direct vat inoculation) ve DVS (direct vat set) kullanımı, sanitasyon prosedürlerinin iyileştirilmesi, peynir üretiminde; peynir yapımı için kapalı düzeneklerin kullanılması, hijyenik çalışılması gibi pek çok önlem alınabilmektedir. Ancak bu önlemler faj çoğalmasını sadece sınırlandırabilmekte, elimine edememektedir. Bu yüzden, ortamda baskın bulunan faj/fajlara dirençli starter kültürlerin rotasyona sokulması tercih edilmektedir (22, 25).

Termofilik fajlar hakkındaki bilgilerimiz, laktokok fajları ile kıyaslandığında sınırlıdır (2, 26). Çünkü laktokok fajları White ve Cox tarafından izole edildikleri 1935 yılından itibaren yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. *S. thermophilus* fajı ise 1952-1953 yıllarında (27), *Lb. bulgaricus* fajı ise 1974 yılında (28) izole edilebilmiş dolayısıyla çalışılmaya geç başlanmış ve daha az bilgi toplanabilmiştir (5). Ülkemizde de starter kültür kullanımının artışıyla, öncelikle laktokok fajları üzerinde yoğunlaşmış (29-32), ancak asıl faj atağı 1996 yılında termofilik kültürlerin kullanıldığı yoğurt işletmelerinde görülmüş ve 16 adet *S. thermophilus* fajı izole edilmiştir (33). O günden bugüne kadar gerçekleştirdiğimiz çalışmalar doğrultusunda termofilik fajlar konusunda okuyuculara genel bir bilgi vermek amacıyla bu makale hazırlanmıştır.

## BAKTERİYOFAJLARIN YAŞAM ŞEKİLLERİ

Virüent ve temperent fajların, konakçıları üzerinde sırasıyla litik ve lizogenik olmak üzere iki tip yaşam şekli vardır (34). Fajın hangi yaşam döngüsüne

gireceği aynı operatör ( $O_L$  ve  $O_R$ ) bölgesine bağlanabilen cro ve CI proteinleri arasındaki yarışa bağlıdır. CI proteini, lizogenik döngünün; cro proteini ise litik döngünün başlaması ve devamı için gereklidir. Proteinlerden hangisi operatöre bağlanırsa, kendi sentezini stimüle ederken diğer proteinin sentezini bloke eder. Buna göre de lizogenik veya litik yaşam başlamış olur. T4 fajı, virulent fajların;  $\lambda$  fajı ise temperent fajların prototip örneği olarak kabul edilmektedir (35, 36). Her iki yaşam tipinde de, fajın konakçısına adsorbsiyonu ve DNA'sını enjekte etme aşamaları ortaktır (34, 37). Kuyruklu fajlarda fibril, kuyruk plağı gibi özel adsorbsiyon yapıları, konakçı üzerindeki belirli moleküllere bağlanır. 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;  $\lambda$  fajı ise maltoz varlığında konakçısına adsorbe olabilmektedir. *S. thermophilus* (18), *Lb. bulgaricus* (38) ve T1-T7 grubu fajlarının da konakçılarında adsorbe olabilmeleri için gereken  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  gibi iyonların, optimum konsantrasyonları belirlenmiştir. Fajın dönüşümsüz olarak hücre yüzeyine bağlanmasından sonra, faj DNA'sı konakçı hücre sitoplazmasına bırakılır. Hücre yüzeyine bağlı olan kuyruk, DNA'nın, konakçıya uygun bir şekilde bağlanana kadar, kapsidde kalmasını sağlamaktadır (34, 39).

### Litik Yaşam Döngüsü

Litik döngü, lizogenik döngüden 'Latent Dönem' olarak adlandırılan periyodun başlaması ile ayrılır. Çünkü faj DNA'sının hücre içine alınmasıyla, konakçı RNA polimeraz enzimi devreye girer ve erken genlerin transkripsiyonu başlar. 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 (middle) genlerin transkripsiyonu ile yeni faj DNA'sının sentezi gerçekleşmektedir. Son olarak, geç genlerin kodlanması ile faj partikülünün kapsid, kuyruk, kuyruk fibrilleri gibi parçalarının üretimi, yani morphogenesis başlamaktadır (35). Prokapsid olarak adlandırılan tam yapılanmamış ikosahedral protein kılıf içerisinde, faj DNA'sı paketlenmekte

ve kuyruk ile kapsid birleştirilmektedir (40). Litik döngünün son aşaması, konakçı hücrenin lizize uğratılmasıdır. Kuyruklu fajlar, lizinin 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 lizininin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (34).

### Lizogenik Yaşam Döngüsü

Lizogenik durum, CI, CII ve CIII kodlu üç viral proteinin varlığına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Viral DNA'nın hücreye girişiyle birlikte, CI proteininin 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 eder, ya da konakçı genomuna entegre olmaya başlar. 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 enzimleri 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 (35, 36). Bakteri genomuna entegre olmuş faj DNA'sına 'profaj', profajı taşıyan bakteriye de 'lizogen bakteri' adı verilmektedir. 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 infeksiyonu söz konusu olamamaktadır. Bu duruma 'süperinfeksiyon' denilmekte ve faj direnç sistemlerinden biri olarak da kabul edilmektedir. Profajın; UV, mitomisin C, mutajenik maddeler ve inkübasyon sıcaklığındaki değişim ile indüklenemediği bilinmektedir (13, 16, 17, 35-37, 41).

### FAJ DİRENÇ MEKANİZMALARI

Faj adsorbsiyonunun ve DNA injeksiyonunun engellenmesi, abortif infeksiyon ve restriksiyon/modifikasyon sistemleri olmak üzere; bilinen 4 adet faj direnç mekanizması bulunmaktadır (22). Adsorb-

siyonun engellenmesi şeklindeki direnç mekanizması, hücre yüzeyindeki faj reseptör bölgelerinin değişmiş olması veya konakçı tarafından üretilen bir madde ile bloke edilmesi şeklinde açıklanmaktadır. Diğer bir mekanizma olan faj DNA injeksiyonunun engellenmesi de, yine hücre yüzeyinden kaynaklanmaktadır. Abortif infeksiyonda ise, 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. (25, 42-44).

Restriksiyon/modifikasyon sistemi ise, iki enzim aktivitesinden oluşmakta ve 4 tipi bulunmaktadır (37, 45). Modifikasyon enzimi, DNA molekülü üzerindeki tanıma dizisinde bulunan belirli bölge ya da bölgelere genellikle metil grubu ekleyerek, konakçı DNA'sını yabancı DNA'ya karşı korur. Restriksiyon enzimi ise yabancı bakteriyel veya viral DNA üzerinde kesim yapar (36, 37). Ancak T4 gibi diğer bazı fajlar da, kendilerini restriksiyon enzimlerine karşı koruyabilmekte, enzimleri inhibe eden proteinler de üretebilmektedirler (37). *S. thermophilus* suşlarından birinden izole edilen *SsII* adlı restriksiyon enziminin, diğer *S. thermophilus* suşlarına özgül faj DNA'larında fragment oluştururken; izole edildiği suşun homolog fajında etkili olamadığı tespit edilmiştir. Bu durumun, fajın taşıdığı modifikasyon sisteminden kaynaklandığı düşünülmüştür (46). Bugüne kadar, *Lactococcus lactis* ve *S. thermophilus* suşlarında 21 adet Abortif İnfeksiyon (Abi), 29 adet Restriksiyon/Modifikasyon sistemleri ile Adsorbsiyonun Engellenmesi (AI) ve DNA injeksiyonunun bloke edilmesi şeklindeki direnç mekanizmalarının tanımı ve moleküler karakterizasyonları yapılmıştır (25, 43). Guimont ve ark., çalıştıkları 9 adet *S. thermophilus* suşundan birinde Tip II (47), Solow ve Somkuti ise *S. thermophilus* suşlarından izole ettikleri 3 adet plazmidten birinde Tip I restriksiyon/modifikasyon sistemini bulmuşlardır (48). Ayrıca başka bir çalışmada Moineau ve ark., Madse ve Josephsen, Lubys ve Januleitis ile Benbadis ve ark. tarafından, bazı *S. thermophilus* suşlarında Tip II restriksiyon/modifikasyon sisteminin varlığının saptandığı ve plazmidde kodlu olduğunu belirtilmiştir (49).

## FAJ REPLİKASYON PARAMETRELERİ

Faj gelişme parametreleri denildiğinde, fajın konakçısına adsorbe olma oranı, farklı konakçılar

üzerinde plak oluşturma etkinlikleri (EOP), plak çapları, latent ve artış dönem süreleri ile patlama büyüklükleri akla gelmektedir. Bunlardan latent ve artış dönemleri ile patlama büyüklükleri, tek aşamalı gelişme eğrileri çıkartılarak belirlenmektedir. Fajların tek aşamalı gelişim eğrilerinin çıkarılması, konakçılarında adsorbe oranlarının bulunması ve titrasyonlarının 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.

Faj replikasyon parametrelerinden olan Latent Dönemde olgun faja rastlanmamakta ve faj plak sayısı sabit kalmaktadır. Latent dönem sonunda hücrelerin patlamasıyla 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. (34, 50). 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. *Lb. bulgaricus* fajları ile gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, latent dönem sürelerinin 40 ve 60 dakika (26, 41); bazılarında ise 40 veya 30 dakikadan az olduğu belirtilmiştir (3, 51). Ayrıca, bu araştırmalarda tespit edilen patlama büyüklüklerinin 23 ile 130 faj partikülü arasında değiştiği görülmüştür. Acar Soykut ise çalıştığı fajlardan Y4 ticari *Lb. bulgaricus* suşuna etkili olan fajın latent dönem süresinin 85 dk., patlama büyüklüğünün de 140 olduğunu belirtmiştir. Bu çalışma ile diğerleri karşılaştırıldığında hem latent dönem süresinde hem de patlama büyüklüğünde belirgin bir farklılık olduğu göze çarpmaktadır (24). Larbi ve ark. ile Tremblay ve Moineau, çalıştıkları *S. thermophilus* fajların hepsinin latent dönem sürelerini 25 dakika, patlama büyüklüklerini ise sırasıyla 88 ile 56 ve 276 olarak bulmuştur (11, 52). Yine *S. thermophilus* fajları ile çalışan Suarez ve diğerleri, artış dönem sürelerini 140-200 dakika olarak belirtmişlerdir (3). Patlama büyüklüklerinin de 300-600 faj partikülü arasında değiştiğini saptamışlardır. *S. thermophilus* fajlarının tek aşamalı gelişme eğrilerinin çıkarıldığı başka bir çalışmada da artış dönem süreleri aynı olan fajların latent dönem sürelerinin 15-35 dakika arasında değiştiği, patlama büyüklüklerinin ise geniş bir aralıkta (64-620 faj) değişim gösterdiği tespit edilmiştir (24).

Faj plak etkinliği, fajların konakçıları üzerinde oluşturabildiği plaklar olarak tanımlanabildiği gibi (53); fajın farklı bir konakçıda verdiği titrenin homolog konakçısında verdiği titreye oranlanması ile de hesaplanmaktadır. Genellikle direnç sistemi aktarılan veya bu sistemlere sahip konakçılarda geliştirilen fajların titrelerindeki değişimleri takip etmek amacıyla bu değerler belirlenmektedir (54). Auad ve ark., çalıştıkları lb539 temperent fajının, *Lb. lactis* CNRZ 326 suşunda üç kez geliştirilmesinden sonra EOP değerinin  $9.4 \times 10^{-4}$ 'ten 1.6'ya yükseldiğini; LL-H litik fajının ise farklı konakçıda geliştirilmesinden sonra EOP değerinin 1.7'ye çıktığını saptamışlardır (55). Kivi ve ark. ise *S. thermophilus* fajlarının plak etkinlikleri ile farklı konakçılara adsorbe olma oranlarını belirlemiştir. Bu araştırmanın sonunda fajlardan bazılarının çok yüksek yüzde ile konakçı olarak kullanılan suşlara adsorbe olabildiği ancak plak oluşturamadığı, bazılarının hem homolog hem de heterolog konakçılarda hemen hemen aynı titreyi vermelerine karşın en yüksek EOP değerini her birine heterolog olan başka bir konakçıda verdiği, bazılarının ise heterolog konakçılara homolog konakçılardan daha yüksek yüzde ile bağlandıkları görülmüştür. Dolayısıyla araştırmacılar konakçı olarak kullanılan suşların restriksiyon-modifikasyon sistemlerinin incelenmesi gerektiğini vurgulamışlardır (56). *S. thermophilus* fajlarının farklı konakçılarda ve kendi homolog konakçılardaki plak etkinliklerini inceleyen başka bir araştırmada; fajların heterolog konakçılarda  $3 \times 10^{-5}$ 'ten 1'e kadar değişen, farklı EOP değerleri verdiği görülmüştür. Çalıştıkları fajlardan birinin kendi homolog konakçısında hazırlanması durumunda heterolog konakçısında EOP değeri  $3 \times 10^{-5}$  olarak bulunmuşken; heterolog konakçısında hazırlandığında, homolog konakçısındaki EOP değerinin  $3 \times 10^{-6}$ 'ya düştüğü görülmektedir. Ayrıca bu fajın iki ayrı konakçıda hazırlanmasından sonra *HindIII*, *HhaI* ve *PvuII* enzimleriyle kesim yapılabiliyor iken, heterolog konakçısında hazırlanması durumunda *Sau3A* enzimiyle kesilememesi, konakçılarda restriksiyon/modifikasyon sistemlerinin varlığını göstermektedir (2). *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* fajları ile yapılan başka bir çalışmada da fajların, homolog ve heterolog konakçılarına yaklaşık aynı oranda (%99) adsorbe olmalarına rağmen farklı EOP değerleri verdiği tespit edilmiş ve konakçıların farklı restriksiyon/modifikasyon sistemlerinin olduğu düşünülmüştür (24).

## SONUÇ

Süt endüstrisinde problem yaratan fajlardan termofilik karakterdeki olanlar hakkındaki bilgilerimiz mezofilik karakterde olan *Lactococcus* fajlarına oranla bir hayli azdır. Ancak 1996 yılından itibaren gerçekleştirdiğimiz ve devam etmekte olan çalışmalarımızla (5, 33, 57, 58) bu fajlar ile konakçıları hakkındaki bilgilerimiz artmıştır. Günümüzde de faj problemi yaşayan işletmeler bulunmakta ve onların sorunlarına çözüm aranmaktadır. Daha önce de bahsedildiği gibi bu problemi önlemede çeşitli yöntemlere başvurulabiliyor olsa da en etkili çözümün ortamda baskın olan faj/fajların bilinerek bunlara dirençli starter kültürlerin rotasyona sokulması olduğudur. Starter kültür üreticileri bu konuda işletmelere rotasyon programı sunarak yardımcı olmaktadır. Ancak ellerinde yerel faj popülasyonunun olmaması bu rotasyon programlarının işe yaramamasına neden olmaktadır. Bu nedenle işletmelerin kendi ortamlarında bulunan faj/fajları izole etmesi, başta konakçı özgüllüğü olmak üzere moleküler düzeyde de identifikasyon çalışmaları yaparak faj koleksiyonlarını oluşturmaları ve bir sonraki aşamada rotasyona sokacakları kültürleri belirlemeleri gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Tamime AY, Robinson RK. 1999. *Yoghurt Science and Technology*, 2<sup>nd</sup>, Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, Pp: 623, USA.
2. Benbadis L, Faalen M, Slos P, Fazel A, Mercenier A. 1990. Characterization and comparison of virulent bacteriophages of *Streptococcus thermophilus* isolated from yogurt. *Biochimie*, 72: 855-862.
3. Suárez VB, Quiberoni A, Binetti AG, Reinheimer JA. 2002. Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries. *J Food Prot* 65 (10): 1597-1604.
4. Quiberoni A, Auad L, Binetti AG, Suarez VB, Reinheimer JA, Raya RR. 2003. Comparative analysis of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from a yoghurt industrial plant. *Food Microbiol*, 20: 461-469.
5. Tunail N, Demirtaş D, Durlu-Özkaya F. 2000. Yoğurt Fabrikalarında Görülen Bakteriyofaj Problemi, Nedenleri ve Çözüm Önerileri, Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, 113-125 s, Tekirdağ.
6. Kaleli D. 2001. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* virulent fajlarının izolasyonu ve yoğurt starter kültürleri üzerine litik etkilerinin belirlenmesi, Ankara

Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Müh. Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

7. Özyurt Ş. 2005. Doğal (yerel) *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarında endüstriyel öneme sahip özelliklerin araştırılması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 85 s, Ankara.

8. Kahraman E. 2006. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarında lizogeninin araştırılması, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Müh. Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 80 s, Ankara.

9. Mata M, Trautwetter A, Luthaud G, Ritzenthaler P. 1986. Thirteen virulent and temperate bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* belong to a single DNA homology group. *Appl Environ Microbiol* 52 (4): 812-818.

10. Lahbib-Mansais Y, Mata M, Ritzenthaler P. 1988. Molecular taxonomy of *Lactobacillus* phages. *Biochimie*, 70: 429-435.

11. Tremblay DM, Moineau S. 1999. Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage DT1 of *Streptococcus thermophilus*. *Virology*, 255: 63-76.

12. Bruttin A, Desiere F, d'Amico N, Guerin JP, Sidoti J, Huni B, Lucchini S, Brüssow H. 1997. Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory. *Appl Environ Microbiol*, 63: 3144-3150.

13. Neve H. 1996. Bacteriophage, In *Dairy Starter Cultures*, TM Cogan and JP Accolas (eds), VCH-Verlag, Weinheim.

14. Cluzel PJ, Veaux M, Rousseau M, Accolas JP. 1987. Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *J Dairy Res*, 54: 397-405.

15. Sechaud L, Cluzel PJ, Rousseau M, Baumgartner A, Accolas JP. 1988. Bacteriophages of lactobacilli, *Biochimie*, 70: 401-410.

16. Davidson BE, Powell IB, Hiller AJ. 1990. Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 87: 79-90.

17. Brüssow H, Frémont M, Bruttin A, Sidoti J, Constabla A, Fryder V. 1994. Detection and Classification of *Streptococcus thermophilus* Bacteriophages Isolated from Industrial Milk Fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 60 (12): 4537-4543.

18. Le Marrec C, Sinderen D, Walsh L, Stanley E, Vlegels E, Moineau S, Heinze P, Fitzgerald G, Fayard B. 1997. Two groups of bacteriophages *Streptococcus thermophilus* can be distinguished on the basis of mode of packaging and genetic determinants for major structural proteins. *Appl Environ Microbiol*, 63 (8): 3246-3253.

19. Fayard B, Haefliger M, Accolas JP. 1993. Interaction of temperate bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* with lysogenic affect phage DNA restriction pattern and host ranges. *J Dairy Res*, 60: 385-399.

20. Brussow H, Bruttin A. 1995. Characterization of a temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage and its genetic relationship with lytic phages. *Virology*, 212: 632-640.

21. Kaleli D, Tunail N. 2001. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* virulent fajlarının izolasyonu ve yoğurt starter kültürleri üzerine litik etkilerinin belirlenmesi. XII. Biyoteknoloji Kongresi, 286 s, Ayvalık.

22. Moineau S. 1999. Applications of Phage Resistance in Lactic Acid Bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76: 377-382.

23. Binetti AG, Reinheimer JA. 2000. Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *J Food Prot*, 63 (4): 509-515.

24. Acar Soykut E. 2007. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* virulent fajlarının replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Müh. Ana Bilim Dalı Doktora Tezi, 176 s, Ankara.

25. Coffey A, Ross RP. 2002. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 303-321.

26. Chow J, Batt CA, Sinskey AJ. 1988. Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage ch2. *Appl Environ Microbiol*, 54 (5): 1138-1142.

27. Rasic J, Kurmann AJ. 1978. *Yoghurt*, Technical Dairy Publishing House, pp: 466, Denmark.

28. Reinbold GW, Reddy MS, Hammond EG. 1982. Ultrastructures of bacteriophages active against *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus helveticus*. *J Food Prot*, 45 (2): 119-124.

29. Durlu F, Tunail N. 1991. Resistance of commercial cheese starter cultures to domestic bacteriophages in Turkey, The Third International Congress on Food Industry, pp: 125-139, Kuşadası.

30. Tunail N, Aşkın O. 1991. Çiğ sütlerden laktik streptokok bakteriyofajlarının izolasyonu ve yerli laktik streptokok suşları ile ticari starterlerin faj dirençliliklerinin belirlenmesi. *Doğa Dergisi*, 15 (3): 785-791.

31. Akçelik M, Tunail N. 1992. A 30 kd cell wall protein produced by plasmid DNA which encodes inhibition of phage adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P25. *Milchwissenschaft*, 47 (4): 215-217.

32. Aydar LY, Tunail N. 1995. Isolation and electron microscopic investigation of lactic phages which isolated from Turkey. *Milchwissenschaft*, 50 (6): 312-316.
33. Durlu-Özkaya F, İç N, Tunail N. 1999. Termofilik fajlara dirençli yoğurt kültürleri ve rotasyon. *Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi*. XI. KÜKEM-Biyoteknoloji Kongresi Özel Sayısı 23 (2): 7-8.
34. Guttman B, Raya RA, Kutter E. 2005. Basic Phage Biology. In *Bacteriophages Biology and Applications*, E Kutter, A Sulakvelidze (eds), pp. 29-67, CRC Press, USA.
35. Hendrix RW. 2002. Bacteriophage  $\lambda$  and Its Relatives, In *Modern Microbial Genetics*, 2<sup>nd</sup>. UN Streips and RE Yasbin (eds), A John Willey&Sons, Inc., New York.
36. Lerner KL, Lerner BW. 2003 *World of Microbiology and Immunology*, Gale Group, pp: 701, USA.
37. Birge EA. 2000. *Bacterial and Bacteriophage Genetics*. 4<sup>th</sup> Edition, Springer-Verlag, pp: 559, New York.
38. Yoon SS, Kim JW, Breidith F, Fleming HP. 2001. Characterization of a lytic bacteriophage and molecular cloning of a lysin gene in *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.*, 65: 63-74.
39. Luria SE, Darnell JE. 1967. *General Virology*, 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley&Sons, pp: 512, USA.
40. Klug WS, Cummings MR. 2000. *Concepts of Genetics*, 6<sup>th</sup> Edition. Prentice Hall, pp: 816, USA (Çeviri Editörü Cihan Öner).
41. Lahbib-Mansais Y, Boizet B, Dupont L, Mata M, Ritzenthaler P. 1992. Characterization of a temperate bacteriophage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and its interactions with the host cell chromosome. *J Gen Microbiol*, 138: 1139-1146.
42. Hill C. 1993. Bacteriophage and Bacteriophage Resistance in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 12: 87-108.
43. Forde A, Fitzgerald GF. 1999. Bacteriophage defence system in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 89-113.
44. McGrath S, van Sinderen D, Fitzgerald GF. 2002. Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. *Int Dairy J*, 12: 3-15.
45. Blumenthal RM, Cheng X. 2002. Restriction-Modification Systems. In *Modern Microbial Genetics*, 2<sup>nd</sup>, UN Streips and RE Yasbin (eds), pp: 350-465, A John Willey&Sons Inc., New York.
46. Benbadis L, Garel JR, Hartley DL. 1991. Purification, properties and sequence specificity of SsII, a new type II restriction endonuclease from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 57 (12): 3677-3678.
47. Guimont C, Henry P, Linden G. 1993. Restriction/modification in *Streptococcus thermophilus*: isolation and characterization of a type II restriction endonuclease Sth455I. *Appl Environ Microbiol*, 39: 216-220.
48. Solow BT, Somkuti GA. 2001. Molecular properties of *Streptococcus thermophilus* plasmid pER35 encoding a restriction modification system. *Current Microbiol*, 42: 122-128.
49. Geis A, El Demerdash HAM, Heller KJ. 2003. Sequence analysis and characterization of plasmids from *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid*, 50: 53-69.
50. Cann AJ. 2001. *Principles of Molecular Virology*, 3<sup>rd</sup> Edition. Elsevier Academic Press, Pp: 339, USA.
51. Quiberoni A, Guglielmotti DM, Binetti A, Reinheimer JA. 2004. Characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages and the physicochemical analysis of phage adsorption. *J Appl Microbiol*, 96: 340-351.
52. Larbi D, Colmin C, Rousselle L, Decaris B, Simonet JM. 1990. Genetic and Biological Characterization of Nine *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Bacteriophages. *Lait*, 70: 107-116.
53. Ellis EK, Delbrück M. 1939. The growth of bacteriophage, *Papers on Bacterial Viruses*, Selected by G. S. Stent (1960). 365p, Methuen and Co Ltd. London.
54. Sanders ME, Klaenhammer TR. 1980. Restriction and modification group N Streptococci: Effect of heat on development of modified lytic bacteriophage. *Appl Environ Microbiol*, 40 (3): 500-506.
55. Auad L, Peril MAA, Ruiz Holgado AAP, Raya RR. 1998. Evidence of a restriction/modification system in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326. *Current Microbiol*, 36: 271-273.
56. Kivi S, Peltomäki T, Luomala K, Sarimo SS. 1987. Some properties of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Fotra Microbiol*, 32: 101-106.
57. Tunail N, Ayhan K, Akçelik M, Durlu Özkaya F, Doğan HB, Kaleli D, Tükel Ç, Acar E. 2002. Yoğurt fabrikalarında faj probleminin çözümüne yönelik araştırmalar, TÜBİTAK/TARP-2106 Nolu Proje.
58. Tunail N, Açık L, Acar E, Özyurt Ş, Kahraman E, Çelebi A. 2006. Yerel (doğal) *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* ile özgül fajlarının edüstriyel öneme sahip özellikler açısından tanımlanarak alternatif starterlerin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü 67 nolu proje.