

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LAKTOKOK FAJLARININ, SICAKLIK UYGULAMALARI VE BİYOSİTLERİN
KULLANIMI YOLU İLE İNAKTİVASYONU**

Pınar ÖZTÜRK

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

ANKARA
2006

Laktokok Fajlarının Sıcaklık Uygulamaları ve Biyositlerin Kullanımı Yolu İle İnaktivasyonu

ÖZET

Bu çalışmada, endüstriyel üretim süreçlerinde hammaddeye (süt) uygulanan ısı işlemlerin ve alet ve ekipmanların dezenfeksiyonu için kullanılan belli başlı biyositlerin, laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerindeki etkileri araştırıldı. Temel biyomateryal olarak 10 adet faj ile bu fajların homolog konakçıları olan 5 adet *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 3 adet *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve 1 adet *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* suşu kullanıldı. Laktokok fajları ve homolog konakçı suşları Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Kütür Koleksiyonundan sağlandı. Çalışmada kullanılan diğer *L. lactis* alt türleri ve biyovaryetesi, Türkiye' nin değişik yörelerinden sağlanan çiğ sütlerden izole edildi. İzole edilen laktokok suşları içerisinde, 21 adet *L. lactis* subsp. *lactis*, 10 adet *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve 18 adet *L. lactis* subsp. *cremoris* suşu tespit edildi. Bu suşların, denemelerde kullanılan 10 adet laktokok fajına karşı dirençlilik özellikleri belirlendi.

Laktokok fajlarının etanole ve izopropanole duyarlılık düzeyleri; bu alkollerin % 10, % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonları için ayrı ayrı tespit edildi. % 10 etanol ve % 10 izopropanol uygulamasının fajlar üzerinde inhibisyon etkisi olmadığı belirlendi. Bu araştırmada, denenen 10 laktokok fajı için en etkin etanol konsantrasyonu, % 75 olarak saptandı. % 50 etanol konsantrasyonunda, Øpl162 ve Øpld6737 fajlarının dışındaki tüm fajların litik etkinlikleri 4. dakika sonunda tamamen kayboldu. Etanol uygulama konsantrasyonu % 100 oranına çıkarıldığında ise, yalnız Øpld6636 fajı, 60 dakika sonunda tamamen inaktivasyona uğradı. % 50 izopropanol uygulamasında 15. dakika sonunda Øplc6158 ve Øpl13614; 20. dakika sonunda Øpld6737 ve Øplc6154 fajları tamamen inaktive olduğu saptandı. % 75 izopropanol uygulamasında 15 dk sonunda Øpld6434 ile Øpl1356 fajları dışında kalan 8 faj tamamen inaktive oldu. % 100 izopropanol konsantrasyonunda, 60 dakika sonunda bile hiçbir laktokok fajı homolog konakçısına karşı tam aktivite kaybına uğramadı. Laktokok fajlarına karşı etkinliği denenen son biyosit olan sodyum hipoklorit için; 2000, 3000, 4000, 5000 ppm olmak üzere, 4 farklı uygulama konsantrasyonu kullanıldı. Sodyum hipoklorit uygulamasında da, diğer etkin biyosit uygulamalarında olduğu gibi, zamanın artışı ile doğru orantılı olarak faj titrelerindeki düşmeler arttı. Tüm fajların tamamen inaktivasyonu için gereken konsantrasyon ve minimum süre; 2000 ppm' de 45 dakika, 3000 ppm' de 30 dakika, 4000 ppm' de 20 dakika ve 5000 ppm' de 15 dakika olarak belirlendi. Tez kapsamında kullanılan fajların sıcaklık duyarlılıkları; 63 °C' de 30 dakika, 72 °C' de 15 dakika ve 90 °C' de 5 dakika uygulanmaları sonucu tespit edildi. Bu araştırmada da, denenen tüm fajların inaktivasyonunu gerçekleştirmek için yeterli olmamakla birlikte, en etkin sıcaklık uygulaması ve süresi 63 °C' de 30 dakika olarak tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Lactococcus*, Faj, Biyosit, Sıcaklık, İnaktivasyon

Inactivation of Lactococcal Phages by Heat Treatment and Biocides

ABSTRACT

In this study, the effect of heat treatment applied to raw material (milk) during industrial manufacturing processes and biocides used for disinfection of process equipments in the inactivation of lactococcal phages were investigated. 10 phages and their homologous host strains of 5 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 3 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and 1 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* were used as the main biomaterial. Both lactococcal phages and their homologous host strains were obtained from Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology Culture Collection. Other than the strains above, *L. Lactis* subspecies and biovarieties were isolated from raw milk obtained different regions of Turkey. Among the isolates, 21 *L. lactis* subsp. *lactis*, 10 *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and 18 *L. lactis* subsp. *cremoris* strains were determined. Resistance of these strains against 10 lactococcal phages used in the experiments was also examined.

Susceptibility of phages to ethanol and isopropanol were detected with the 10 %, 50 %, 75 % and 100 % concentrations of these alcohols respectively. It was determined that, 10 % ethanol and isopropanol had no inactivation effect on lactococcal phages. In this research, the most effective ethanol concentration was observed to be 75 % against 10 lactococcal phages examined. At the 50 % concentration of ethanol, all phages lost lytic effectiveness at the end of fourth minute, except the phages Øpl162 and Øpld6737. When ethanol concentration was increased to 100 %, only the phage Øpld6636 was totally inactivated after 60 minutes. With 50 % isopropanol concentration, complete inactivation was observed after 15 minutes for Øplc6158 and Øpl13614; 20 minutes for Øpld6737 and Øplc6154. At the 75 % isopropanol concentration, all phages are totally inactivated after 15 minutes, except the phages Øpld6434 and Øpl1356. None of the lactococcal phages lost effectivity completely against their respective host strain with 100 % isopropanol concentration even at the end of 60 minutes. The last biocide examined for its effectivity against lactococcal phages was sodium hypochlorite for which 4 different concentrations used: 2000, 3000, 4000 and 5000 ppm. As for the other biocides used, there was found a positive correlation between phage titer reduction and application time increase for sodium hypochlorite. 2000 ppm for 45 minutes, 3000 ppm for 30 minutes, 4000 ppm for 20 minutes and 5000 ppm for 15 minutes were the required concentration and minimal time for complete inactivation of all phages. Heat susceptibility of the phages used in the thesis was investigated at 63 °C for 30 minutes, 72 °C for 15 minutes and 90 °C for 5 minutes. In this research, the most effective temperature and time was determined as 63 °C for 30 minutes, although it was not as effective as to inactivate all phages examined.

Key Words: *Lactococcus, Phage, Biocide, Temperature, Inactivation*

TEŞEKKÜR

Sıcaklık uygulamalarının ve biyositlerin, Türkiye kökenli laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından “Endüstriyel Açıdan Kullanışlı *Lactococcus lactis* Suşlarının Tanısı ve Laktik Fajların İnaktivasyonu Üzerinde Araştırmalar” adlı ve 2004-154 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi) e;

Çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar göstererek beni destekleyen eşim Yusuf İlker ÖZTÜRK e,

Hayatımın her aşamasında bana, iyi bir eğitim imkânı sunan sevgili annem, babam ve ağabeyime,

Tüm yardımları için laboratuvar arkadaşlarım, Banu ÖZDEN, Araş. Gör. Ömer ŞİMŞEK, Araş. Gör. Dr. Yasin TUNCER, Araş. Gör. Dilek AVŞAROĞLU ve Burcu ÖZKALP e

En derin duygularıyla teşekkür ederim.

Pınar Öztürk

Ankara, Mayıs 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. <i>Lactococcus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	3
2.2. <i>L. lactis</i> Türünün Endüstriyel Açından Önemi	4
2.3. Laktokok Fajlarının Biyolojisi.....	4
2.4. Laktokok Fajlarının Yarattığı Endüstriyel Sorunlar.....	7
2.5. Endüstriyel Fermentasyon Süreçlerinde Laktokok Fajlarının İnaktivasyonu Amacı ile Kullanılan Stratejiler.....	8
2.5.1. Sıcaklık uygulamalarının laktokok fajları üzerine etkisi.....	10
2.5.2. Biyosit uygulamalarının laktokok fajları üzerine etkisi.....	11
2.5.2.1. Alkoller.....	12
2.5.2.2. Sodyum hipoklorit.....	13
3. MATERYAL VE METOT.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Bakteriler ve fajlar.....	15
3.2. Metot.....	18
3.2.1. Laktokok suşlarının izolasyonu.....	18
3.2.2. İzolatlardan laktokok suşlarının tanısı.....	18
3.2.2.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi.....	20
3.2.2.2. Arjininden amonyak oluşumu.....	20
3.2.2.3. Elliker broth besiyerinde gelişme.....	21
3.2.2.4. Sitrat fermentasyon testi.....	22
3.2.2.5. Mannitol fermentasyon testi.....	23
3.2.3. Faj biyodenemeleri.....	23
3.2.3.1. Faj titresinin belirlenmesi.....	23
3.2.3.2. Faj titresinin yükseltilmesi.....	26
3.2.3.3. Bakterilerin faj duyarlılıklarının saptanması.....	26

3.2.3.4. Fajların sıcaklık uygulamalarına karşı duyarlılığının belirlenmesi.....	26
3.2.3.5. Fajların etanol ve izopropanole karşı duyarlılığının belirlenmesi.....	27
3.2.3.6. Fajların sodyum hipoklorite karşı duyarlılığının belirlenmesi.....	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	29
4.1. <i>L. lactis</i> Suşlarının Tanısı.....	29
4.2. Bakterilerin Faj Duyarlılıkları.....	32
4.3. Biyositlerin Laktokok Fajları Üzerine Etkisi.....	35
4.3.1. Etanol uygulaması.....	35
4.3.2. İzopropanol uygulaması.....	46
4.3.3. Sodyum hipoklorit uygulaması.....	56
4.4. Sıcaklık Uygulaması.....	68
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	81

SİMGELER DİZİNİ

dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
g	Gram
kb	Kilobaz
L	Litre
<i>L</i>	<i>Lactococcus</i>
Log ₁₀	10 Tabanında Logaritma
M	Molar
Mpa	Mega Paskal
mL	Mililitre
nm	Nanometre
pfu/mL	Mililitredeki Plak Oluşturma Birimi
ppm	Milyonda bir birim
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikada devir sayısı
UHT	Ultra yükek sıcaklık
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	<i>L. lactis</i> suşlarının tanısında kullanılan testler ve akım şeması.....	19
Şekil 3.2.	Faj titresinin belirlenmesi.....	25
Şekil 4.1.	% 10 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.2.	% 50 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.3.	% 75 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.4.	% 100 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.5.	% 10 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	49
Şekil 4.6.	% 50 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	51
Şekil 4.7.	% 75 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.8.	% 100 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.9.	2000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.10.	3000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	63
Şekil 4.11.	4000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	65
Şekil 4.12.	5000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	67
Şekil 4.13.	Sıcaklık uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan laktokok suşlarının izolasyon materyalleri ve izolasyon materyallerinin sağlandığı bölgeler.....	16
Çizelge 4.1. Laktokok suşlarının tanısı.....	30
Çizelge 4.2. Bakterilerin faj duyarlılıkları.....	33
Çizelge 4.3. % 10 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	38
Çizelge 4.4. % 50 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	40
Çizelge 4.5. % 75 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	42
Çizelge 4.6. % 100 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	44
Çizelge 4.7. % 10 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	48
Çizelge 4.8. % 50 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	50
Çizelge 4.9. % 75 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	52
Çizelge 4.10. % 100 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	54
Çizelge 4.11. 2000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	58
Çizelge 4.12. 3000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	62
Çizelge 4.13. 4000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	64
Çizelge 4.14. 5000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	66
Çizelge 4.15. Sıcaklık uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi.....	70

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri; hububat, sebze, et ve süt gibi değişik hammaddelerden fermente gıdaların üretiminde kullanılan başlıca starter kültür suşlarını içeren ve *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* olarak adlandırılan 11 cinsten meydana gelen geniş bir gruptur. Starter kültür suşlarının, fermente gıda üretiminin temel araçları olması nedeni ile bu grup bakteriler; biyokimyasal, genetik ve fizyolojik çalışmaların odağı haline gelmiştir. Bu araştırmalar, özellikle starter kültür suşlarının laktik asit oluşturma, aroma, tat ve yapı bileşiklerinin üretimi, fajlara ve çevresel stres koşullarına direnç ve bakteriyosin sentezi gibi endüstriyel açıdan önem taşıyan yetenekleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Endüstriyel üretim süreçlerinde verimliliği ve ürün kalitesini etkileyen koşulların optimizasyonu, üretim ekonomisinin temel sorunudur. Starter kültür suşlarının endüstriyel özelliklerinin tanıması, geliştirilmesi ve üretim koşullarına uyumunun sağlanması, fermente gıda üretiminde ürün kalitesi ve üretim verimliliği üzerine etkili kritik unsurları teşkil etmektedir.

Lactococcus (laktokoklar) cinsi üyeleri (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*); özellikle yarı sert peynirler (Gouda, Edam ve Cheddar gibi) başta olmak üzere çok farklı peynir türlerinin ve diğer fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Bu bakterilerde, endüstriyel üretim süreçlerinde karşılaşılan ve starter kültür performansını etkileyen faktörler arasında en önemlisi bakteriyofaj (faj) kontaminasyonudur. Yüksek düzeyde konakçı adaptasyonu yetenekleri, laktokok fajlarının geniş konakçı dizgesine sahip olmasına yol açmaktadır. Fermente süt endüstrisinde kullanılan hammaddenin sterilizasyona uygun olmaması ve fajların fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı hücresel organizasyon içeren biyosistemlerden daha yüksek direnç özelliği içermelerinden dolayı, faj kontaminasyonları tam anlamı ile engellenememektedir. Faj kontaminasyon kaynakları; hammadde, fabrika havası, alet ve ekipman yüzeyleri gibi dış çevre yanında, doğrudan starter kültür suşları da olabilmektedir. Zira laktokoklarda lizogeni çok yaygın olarak rastlanılan bir özelliktir ve lizogenik-litik döngü çevrimi, üretim koşullarında teşvik edilmektedir. Kontaminasyon düzeyi (enfektif faj sayısı) ne kadar düşük olursa olsun, duyarlı suş üzerinde verimli enfeksiyon yeteneğinin çok yüksek oluşu; laktik fajların kısa sürede starter kültürlerinin önemli bir bölümünü parçalaması sonucu fermentasyonun yavaşlamasına ve giderek durmasına yol açmaktadır. Laktokok fajları halen fermente süt endüstrisinde en yüksek düzeyde ürün kayıplarına yol açan sorun olma özelliğini sürdürmektedir.

Süt endüstrisinde faj sorununun kontrolünde temel yaklaşım; dominant faj tiplerine karşı etkin dirençlilik özellikleri içeren starter kültür suşlarının seçimi yanında, fermentasyon ortamlarında faj kontaminasyonlarını ve faj gelişimini sınırlayan fiziksel ve/veya kimyasal ajanların kullanımını esas almaktadır. Bu tez çalışmasında, endüstriyel üretim süreçlerinde hammaddeye (süt) uygulanan ısıl işlemlerin ve alet ve ekipmanların dezenfeksiyonunda kullanılan belli başlı biyositlerin, laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Lactococcus* Cinsinin Genel Özellikleri

Schleifer *et al.* (1985), hücre duvarı yapısı, yağ asidi ve menakinon kompozisyonunu esas alarak; iki *Streptococcus* (*Str. lactis* ve *Str. raffinolactis*) ile iki *Lactobacillus* (*Lb. hordniae* ve *Lb. xylosus*) suşunu *Lactococcus* (laktokoklar) cinsi altında yeniden sınıflandırmıştır (*L. lactis*, *L. raffinolactis*, *L. hordniae*). *Lb. xylosus*, ileri moleküler analiz çalışmalarından elde edilen veriler ışığında, *L. lactis* subsp. *lactis* alt türü olarak sınıflandırılmıştır (Schleifer *et al.* 1985, Williams *et al.* 1990). Daha sonra laktokoklara dahil edilen iki tür ise, balık parazitleri olan *L. gavriae* (eski adı *Enterococcus seriolicida*) ve *L. piscium*' dur (Williams *et al.* 1990).

Gram pozitif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, fakültatif anaerob, katalaz ve oksidaz enzim sistemleri içermeyen laktokoklar homofermentatif özellikte olup, hekzozların fermentasyonu sonucunda L(+) laktik asit üretirler. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ayrıca asetaldehit, diasetil ve asetoin oluşturma yeteneğindedir. Oval hücreler 0,5-1,5 µm büyüklüğünde olabilmektedir. Üreme ortamlarında genellikle çiftler ya da kısa zincirler halinde bulunurlar. Laktokokların optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C' dir. 10 °C' nin altında, 45 °C' de, % 6,5 NaCl ve % 40 safra tuzu varlığında üreyemezler (Holt *et al.* 1994, Boumerdassi *et al.* 1997). Başta çok sayıda vitamin ve amino asit olmak üzere, değişik gelişme faktörlerine gereksinim duyarlar. Bu cinsin tüm üyeleri, serolojik açıdan Lancefield' in N grubuna dahil edilmiştir (Boumerdassi *et al.* 1997).

Laktokokların sınıflandırılmasında klasik tanı testlerinin kullanımı, özellikle atipik üyelerin çok sayıda olması ve biyokimyasal açıdan yüksek düzeyde benzerlik içermeleri nedeniyle birçok durumda kesin sonuç vermemektedir. Günümüzde klasik tanı testlerine ilave olarak; 16 S ve 23 S rRNA sekansları, süperoksit dismutaz enzimlerinin ve rRNA' nın immunolojik analizleri de doğrulama testleri olarak kullanılmaktadır. Tür düzeyinin altındaki sınıflandırmada ise, ribotiplendirme ve rastgele çoğaltılan polimorfik DNA (RAPD) tekniklerinden de yaygın bir şekilde yararlanılmaktadır (Pot *et al.* 1994, Lauridsen *et al.* 2003).

2.2. *L. lactis* Türünün Endüstriyel Açısından Önemi

Mezofilik laktik asit bakterilerine dahil olan *Lactococcus* cinsi üyelerinin primer habitatı

yeşil bitkiler ve balıklardır. Bu türler içerisinde *L. lactis*' e ait iki alt tür (*L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*) ile bir biyovaryete (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) günümüzde; tüm dünyada üretilen fermente ürünlerin, ekonomik değer açısından % 20' sinin üretiminde starter kültür suşları olarak kullanılmaktadır (Hill and Ross 1998, Kleerebezem *et al.* 2002). Bu bakterilerin fosfoenol piruvata bağlı fosfotransferaz sistemi (PEP-PTS) içermesi, laktozun transferi ve etkin bir şekilde fermente edilmesini garanti altına almaktadır. Diğer bir ifade ile, PEP-PTS sistemleri söz konusu bakterilerin süt ortamına adaptasyonunda anahtar rol oynamıştır. Sadece *L. lactis* subsp. *hordniae* PEP-PTS sistemine sahip olmadığından starter kültür suşu olarak kullanılmamaktadır (Kleerebezem *et al.* 2002).

PEP-PTS sistemine sahip laktokokların süt fermentasyonlarındaki ana rolü; süt şekeri laktozdan hızlı bir şekilde laktik asit üretimi ve ürün oluşumunda doğrudan bir etkiye sahip olmayan H₂O₂ gibi metabolitlerin sentezi sonucu ortam pH' sını 4.0-5.6 arasına düşürmeleridir. Ortam pH' sının düşmesi, fermentasyonun başlatılması ve ortamda bulunan patojen ve çürükçül mikroorganizmaların gelişiminin engellenmesi gibi iki ana işlev görmektedir. Diğer yandan, bu bakterilerin içerdiği proteolitik aktivite, sitrat metabolizması ve hücre dışı polisakkaritlerin üretimi, söz konusu fermente süt ürünlerinin yapısal ve aromatik özelliklerinin gelişiminde anahtar rol oynamaktadır (Şanlıbaba ve Akçelik 2000, Vereecken and Van Impe 2002). Laktokoklarda faj dirençlilik ve bakteriyosin üretimi gibi özellikler ise, starter kültür performansını belirleyen diğer karakterlerdir. Starter kültür suşlarının faj dirençlilik özelliği ürün ekonomisi, bakteriyosin üretimi ise ürünün mikrobiyel güvenliği bakımından kritik bir önem taşımaktadır (Akçelik 1999a, Mills *et al.* 2002, Smid *et al.* 2005).

Laktokokların gıda fermentasyonları açısından önem taşıyan özelliklerinin plazmid DNA kökenli olduğunun ve konjugasyon ile ya da kromozomal DNA üzerinde yaygın olarak bulunan insersiyon (IS) elementleri tarafından suştan suşa aktarılabilirdiğinin belirlenmesi, laktokokları endüstriyel starter kültür suşu geliştirme çalışmalarında model organizmalar haline getirmiştir (Smid *et al.* 2005).

2.3. Laktokok Fajlarının Biyolojisi

Laktokok bakteriyofajları, ilk kez Whitehead ve Cox tarafından 1935 yılında süttten izole edilmiştir (Sandine 1979). Faj morfolojisi esas alınarak yürütülen sınıflandırma

çalışmalarında, laktokok fajlarının büyük bir bölümünün *Siphoviridae* familyasının B1 ve B2 morfotiplerine ait olduğu saptanmıştır (Klaenhammer 1984, Jarvis and Meyer 1986, Sanders 1988). B1 morfotipleri, izometrik bir baş, uzun ve kasılma yeteneği içermeyen bir kuyruk yapısı ile karakterize edilmektedir. Yaka, taban plağı ve kuyruk fibrilleri gibi yapılar bu fajlar için ayırıcı özellikler olarak tanımlanmamıştır. B2 morfotiplerinin tanımlayıcı unsurları ise; prolat bir baş ve kasılma yeteneği içermeyen bir kuyruk yapısı olarak belirlenmiştir. Bu fajlarda da yaka, taban plağı ve kuyruk fibrilleri, morfotiplendirme kriteri olarak kullanılabilir bir stabilite göstermemektedir (Sanders 1988, Jarvis *et al.* 1991, Moineau *et al.* 1996). Laktokok fajlarının *Siphoviridae* familyası dışındaki üyeleri, *Podoviridae* familyasının C1 ve C3 morfotipleri içerisinde sınıflandırılmıştır. C1 morfotipleri izometrik bir baş ve kısa bir kuyruk, C3 morfotipleri ise uzamış prolat bir baş ve kısa kuyruk yapısı ile karakterize edilmektedir. Bu fajlarda da diğer yapısal faj elemanları morfolojik sınıflandırmada kullanılmamaktadır (Jarvis *et al.* 1991, Ackermann 1999). Laktik fajlarda baş büyüklüğü; izometrik olanlar için genellikle 45-65 nm, prolat fajlar için ise 45-65 x 40-50 nm arasında değişme göstermektedir. Kuyruk uzunlukları ise, 80-300 nm arasında tespit edilmiştir (Moineau *et al.* 1996, Ackermann 1999, Madsen *et al.* 2001).

Gerek morfolojik özelliklerinin çok benzer oluşu ve gerekse konakçı etkinliklerinin değişken bir karakter taşıması, laktik fajların sınıflandırılmasında moleküler tekniklerin kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Yeni sınıflandırma çalışmalarında bu klasik kriterlere ilave olarak, DNA homolojileri ve faj protein profilleri uyumu kullanılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda laktik fajlar oniki tür altında toplanmıştır. Bunlar içerisinde tüm dünyada süt endüstrisinde sorun yaratan başlıca fajlar Ø936, Øc2 ve ØP335 türleri olarak tanımlanmıştır (Jarvis *et al.* 1991, Ackermann 1999, Coffey and Ross 2002). Ø936 ve Øc2 türleri yalnız virüent yaşam tipine sahip fajlardan oluşurken, ØP335 türünün hem virüent hem de temperent yaşam tipine sahip üyeleri belirlenmiştir. Bu fajlarda temperent-virüent yaşam döngüsü sıklıkla rastlanılan bir durumdur (Desiere *et al.* 2002, Moineau *et al.* 2002). Laktik faj genomları üzerinde yürütülen moleküler analizler sonucu, genom büyüklüklerinin genellikle 15-60 kb, % GC oranlarının ise % 32-40 arasında değişme gösterdiği tespit edilmiştir (Lawrence *et al.* 2002, Proux *et al.* 2002). Moleküler genetik çalışmalar, laktik fajların konakçı uyumunun çok yüksek olmasının, söz konusu patojenlerin genetik elastikyetleri ile ilişkili olduğunu kanıtlamıştır. Özellikle son yıllarda yürütülen çalışmalarda; dünyanın değişik bölgelerinde süt endüstrisinde sorun yaratan birçok litik (virüent) fajın, homolog temperent fajları tanımlanmıştır. Bu bulgular, laktokoklarda lizogenik özelliği endüstriyel açıdan çok önemli bir konuma getirmiştir (Madsen *et al.* 2001, Rohwer and Edwards 2002).

Laktokok fajları ile konakçıları arasında; litik, lizogenik ve pseudolizogenik olmak üzere başlıca üç tip etkileşim söz konusudur. Litik yaşam döngüsü genel hatları ile; fajın bakteri hücresi yüzeyinde yer alan almaç (reseptör) bölgelere geri dönüşsüz bir şekilde tutunması (adsorbsiyonu), faj DNA' sının hücre yüzey proteinleri ve faj lisinleri yanında, kasılabilir kuyruk kılıfı içeren fajlarda ayrıca kasılma mekanizması yardımı ile hücre içine sokulması (enjeksiyon), hücre içine giren faj DNA' sı ve yardımcı enzimlerin konakçı hücre replikasyon sistemini kendi replikasyonu için yönlendirmesi, faj RNA ve proteinlerinin sentezi, faj yapısal elemanlarının (baş, kuyruk, yaka ve kuyruk fibrilleri gibi) sentezi, ayrı sentezlenen tüm faj elemanlarının montesi (asemblasyon) ve olgun faj partiküllerinin (virion) salınımı, aşamalarını içermektedir (Sanders 1988, Kraus and Geller 1998, Lauridsen *et al.* 2003). Litik döngü için kritik bir parametre olan faj tutunması; birincisi hücre duvarında ve ikincisi ise hücre membranında olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada fajlar geri dönüşebilir bir mekanizma ile bakteri hücre duvarında bulunan ve karbohidrat özellikte olan almaç bölgeye tutunmakta, ikinci aşamada ise faj DNA' sı hücre membranı ile ilişkili bir taşıyıcı proteine bağlanmaktadır. Bu ikinci bağlanma tutunmayı geri dönüşsüz hale getirmekte ve enjeksiyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır (Monteville *et al.* 1994, Lauridsen *et al.* 2003). Tutunma, 1/1 faj/bakteri dengesi esas alınarak hazırlanan ortamlarda en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Bu ortamlarda fajların % 98' inin 12 dakika sonunda bakteri yüzeyine tutunmayı tamamladığı belirlenmiştir. DNA' nın replikasyonu ve olgun faj partiküllerinin meydana gelmesi için gerekli olan süre; laktokok fajlarının tipine bağlı olarak, 30 °C inkübasyon sıcaklığında 3-109 dakika arasında değişme göstermektedir. Bu fajlar için ortalama litik döngü süresi 50-70 dakika olarak tanımlanmaktadır (Klaenhammer 1984, Dinsmore and Klaenhammer 1995, Coffey and Ross 2002, Micklic and Rogelj 2003). Olgun faj partiküllerinin geliştikleri konakçı bakteriyi parçalaması; faj kuşağının üretimi sonucu bakteri hücresinde meydana gelen ozmatik basınç ile hücre membranı ve duvarında porlar açma özelliğindeki faj enzimleri (lizinler) tarafından sağlanmaktadır. Bakteri başına bir enfeksiyon süresince üretilen enfektif faj sayısı (patlama büyüklüğü) 9-105 adet arasında değişme göstermektedir (Shaerman *et al.* 1989, Dinsmore and Klaenhammer 1995, Lauridsen *et al.* 2003).

Lizogeni ve pseudolizogeni, faj enfeksiyonundan sonra litik döngünün başlatılmadığı durumlarda meydana gelen konakçı-faj interaksiyonlarıdır. Lizogenik yaşam döngüsünde hücre içine giren faj, içerdiği entegraz enzimlerinin yardımı ile konakçı genomuna bir bölgeden bağlanır. Bu durumdaki fajlara profaj ya da temperent faj adı verilmektedir. Laktokoklarda birden fazla faj DNA' sına sahip polilizogenik suşların tanımlanması, bu

bakterilerde faj çevriminin modifiye olduğuna işaret etmektedir. Profaj, kromozomal DNA ile birlikte eşlenerek bakteri kuşakları boyunca sürekliliğini korur. Pseudolizogeni ise entegraz sistemi içermeyen ya da bozulmuş olan fajların; kromozoma entegre olmadan, hücre stoplazmasında bulunması halidir. Bu durumdaki faj DNA' ları her hücre bölünmesinde yalnız bir döle geçer. Faj taşıyıcı durum olarak da adlandırılan pseudolizogeni, bakteriye diğer faj enfeksiyonlarına karşı dirençlilik sağlamaktadır (Klaenhammer 1984, de Vos 1989, Allison and Klaenhammer 1998, Devlieghere *et al.* 2004, Rakonjac *et al.* 2005).

2.4. Laktokok Fajlarının Yarattığı Endüstriyel Sorunlar

Laktokoklar binlerce yıldır gıda fermentasyonlarında kullanılmakta ve sürekli fajlarla karşı karşıya gelmektedir. Fajların, bakterilere oranla daha yüksek bir genetik adaptasyon yeteneği içermesi; bakterilerin geliştirdikleri dirençlilik sistemlerini, faj enfeksiyonlarından tam anlamı ile korunmada yetersiz hale getirmektedir. Laktokok fajları; toprak, gübre, ahır havası, saman, peyniraltı suyu, fabrika alet-ekipmanı ve havasında bulunabilmektedir. Bu fajların bir diğer kontaminasyon kaynağı ise, lizogen laktokok suşlarıdır. Fermentasyon ortamında lizogeniden litik hale geçiş, enfektif faj kuşağının oluşumuna yol açmaktadır (Stadhouders 1986, McIntyre *et al.* 1991).

Özellikle laktokokların yaygın olarak kullanıldığı fermente süt endüstrisinde, fajların büyük ekonomik kayıplara yol açmasının iki ana nedeni bulunmaktadır. Bunların ilki, hammaddenin (süt) faj çoğalması için çok uygun bir kaynak teşkil etmesidir. Süt, yukarıda ifade edilen tüm kaynaklardan kontamine olabilmektedir. Süt endüstrisinde hammaddeye uygulanan pastörizasyon sıcaklıkları ya da diğer ısıl işlemler, kontaminasyon gücüne bağlı olarak, faj inaktivasyonunda yetersiz kalmaktadır. Sıcaklık uygulamalarında sütün doğası gereği kısıtlama zorunluluğu bulunduğu için, faj kontaminasyonlarından tam anlamı ile korunma çoğu durumda sağlanamamaktadır. Isıl işlem etkisinden kaçan enfektif faj sayısı ne kadar az olursa olsun, hammaddeye ilave edilen laktokok starter kültür suşları üzerinde çoğalarak, hızlı bir şekilde ortama yayılması mümkün olur. Çoğalan fajlar, peyniraltı suyu kalıntıları ve hava yolu ile hızla fabrika ortamına yayılır. Laktokok fajlarının büyük endüstriyel kayıplara yol açmasının ikinci bir nedeni, kısa bir latent dönem ve yüksek patlama büyüklüğüne sahip olmalarıdır. Bu sayede enfekte ettikleri konakçı suşlarda çok kısa sürede ve çok sayıda yeni enfektif faj oluşturabilmektedirler (Svensson and Christiansson 1991, Batt *et al.* 1995, Pedersen *et al.* 2000).

Fermentasyon ortamlarında çoğalan fajların taşıyıcı sistemler aracılığı ile hızlı bir şekilde fabrika ortamına yayılması, yeni üretim dönemlerinde de kontaminasyonu sürekli hale getirmektedir. Bu nedenle faj kontaminasyonlarından korunmak için, hammaddenin kontrolü yanında, işletme ortamının sanitasyonu da büyük önem taşımaktadır (Klaenhammer 1993, Allison and Klaenhammer 1998, Forde and Fitzgerald 2003). Fermentasyon ortamlarında laktokok fajlarının kontaminasyonunun birincil işareti, asitlik gelişiminde yavaşlama ve kontaminasyonun gücüne bağlı olarak durmadır. Özellikle asitlik gelişiminin süt ortamlarında yavaşlaması, sütün pıhtılaşmasını geciktirmektedir. Buna paralel olarak ürüne özgü yapısal ve aromatik özellikler kısmen oluşturulabilmekte ve üretim süresi uzamaktadır. Yüksek düzeyde faj kontaminasyonları ise, fermentasyonun temel etmenleri olan starter kültür suşlarını tamamen parçalamakta ve ürün oluşumundan önce fermentasyonu durdurmaktadır (O'Sullivan *et al.* 2001, Lauridsen *et al.* 2003, Domingues *et al.* 2004).

Yukarıda özetlenen karakteristiklerinden dolayı, laktik fajlar halen tüm dünyada süt endüstrisinde meydana gelen ekonomik kayıpların ana nedeni olma özelliğini sürdürmektedir. Bu nedenle süt endüstrisinde faj kontaminasyonunun kontrolüne yönelik araştırmalar artan bir önem kazanarak sürmektedir. Diğer yandan laktokok fajları, yüksek genetik elastikiyetlerinden dolayı moleküler evrim çalışmalarının vazgeçilmez materyalleri haline gelmiştir (Brüssow and Desiere 2001, Madera *et al.* 2004, Rakonjac *et al.* 2005).

2.5. Endüstriyel Fermentasyon Süreçlerinde Laktokok Fajlarının İnaktivasyonu Amacı ile Kullanılan Stratejiler

Endüstriyel fermentasyonların faj kontaminasyonlarından etkilenmesi sonucu meydana gelen büyük ekonomik kayıpların ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmalarda iki temel strateji mevcuttur. Bunlardan ilki, faj dirençli starter kültür suşlarının seçimi ve endüstriyel üretimlerde kullanılacak şekilde modifiye edilmesi, ikincisi ise fabrika ortamında faj kontaminasyonlarının ve yayılmasının sanitasyon yöntemleri kullanılmak sureti ile kontrolüdür (Everson 1991, McIntyre *et al.* 1991, Moineau *et al.* 1994).

Faj dirençlilik sistemleri içeren laktokok suşlarının seçimi ve genetik düzenlemelere tabi tutularak geliştirilmesi, özellikle son 25 yılda moleküler genetikte ve laktokok faj-konakçı ilişkilerinde sağlanan bilgi birikimi sonucu büyük ölçüde olanaklı hale gelmiştir. Ancak genetik modifiye organizmaların starter kültür suşları olarak kullanımları ile ilgili izinlerin verilmemiş olması, bu çalışmalardan elde edilen sonuçların endüstriyel uygulamalarda

kullanımına engel teşkil etmektedir. Günümüzde yalnız konjugasyon sistemlerinden yararlanılarak modifiye edilen starter kültür suşlarının fermente gıda endüstrisinde kullanımına izin verilmektedir (Alatossova and Klaenhammer 1991, Moineau *et al.* 1994). Konjugasyonel aktarım yolu ile genetik düzenleme, kendi aktarımını yapabilen plazmidler ile sınırlı olduğu için, bu çalışmalardan bugüne kadar tatmin edici bir verim alınamamıştır. Zira laktokoklarda değişik faj dirençlilik sistemlerini kodlayan çok sayıda plazmid bulunmasına rağmen, bunların pek azı konjugatif özelliktedir (Hill *et al.* 1991, Moineau *et al.* 1994). Diğer yandan laktokok fajlarının güçlü faj dirençlilik sistemleri içeren konakçı suşlara karşı bile hızlı bir şekilde litik etkinlik geliştirme yeteneği; faj dirençlilik sistemlerinin, starter kültürlerin faj kontaminasyonlarından etkilenme riskini tek başına ortadan kaldırmada yetersiz kaldığını kanıtlamaktadır. Laktokoklarda faj-konakçı interaksyonları üzerinde yürütülen çalışmalarda; değişik faj dirençlilik sistemleri aktararak güçlendirilmiş suşların, laktik fajların genetik modifikasyonunda seçici bir baskı oluşturduğu tespit edilmiştir (Bouchard and Moineau 2000, Brüssow and Desiere 2001, Lauridsen *et al.* 2003). Bu seçici baskı, değişik bakteriyel faj dirençlilik sistemlerine karşı, çoklu korunma mekanizmaları geliştiren etkin fajların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Söz konusu seçici baskı, hem faj DNA' sının kendi içinde düzenlemelerine ve hem de konakçı hücre kromozom fragmentleri ile rekombinasyonuna neden olmaktadır. Bu moleküler mekanizmalar sonucu ortaya çıkan genetik elastikiyet; fajların, direnç sistemleri içeren bakterilere karşı litik etkilerini sürdürmesini sağlamak ve faj dirençli starter kültür suşları kullanılarak faj kontaminasyonlarının engellenmesi stratejisini bir çok durumda yetersiz hale sokmaktadır (Durmaz and Klaenhammer 2000, Mahanivong *et al.* 2001, O'Sullivan *et al.* 2002, Domingues *et al.* 2004).

Fermente gıda endüstrisinde sorun yaratan fajların kontrolünde kullanılan ikinci temel strateji; fajların kontaminasyonunun engellenmesi ya da kontamine fajların fiziksel ve kimyasal mücadele ajanları ile inaktivasyonu çalışmalarını kapsamaktadır. Bu çalışmalar; iki dolmuş aşaması arasında tankların klorlanması, starter kültür hazırlama odalarının steril hava ile kontrolü, ürün odalarının, alet ve ekipmanın hipoklorit ve alkoller gibi faj yapıları üzerine etkili ajanlarla dezenfeksiyonu yanında, basınç ve sıcaklık uygulamaları başlıkları altında toplanabilir (McIntyre *et al.* 1991, Moroni *et al.* 2002, Vieira *et al.* 2005). Faj kontrolünde önerilen bir başka yöntem olan hammaddenin ultrafiltrasyonu, süt proteinlerinin de ultrafiltrasyon membranları tarafından tutulması nedeniyle, süt endüstrisi için kullanışlı değildir. Basınç uygulamaları ise, hammaddedeki fajların inaktivasyonunu belirli düzeylerde gerçekleştirmekle birlikte, yüzey yapılarından fajların arındırılmasında kullanılamamaktadır.

Bu nedenlerle bu stratejinin yaygın kullanım alanı bulan uygulamaları, sıcaklık ve biyosit uygulamalarıdır (Vieira *et al.* 2005).

2.5.1. Sıcaklık uygulamalarının laktokok fajları üzerine etkisi

Fajların sıcaklık uygulaması yolu ile inaktivasyonu üzerinde klinik ve endüstriyel esaslı araştırmalar uzun zamandır sürdürülmektedir. *Escherichia coli* T4 fajı ile başlatılan bu çalışmalar, 1940' lı yıllarda süt endüstrisinde sorun yaratmaya başlayan laktokok fajlarını da kapsayarak gelişmiştir. Bu araştırmalardan elde olunan veriler, diğer prokaryot fajlarında olduğu gibi, laktokok fajlarının da sıcaklığa yüksek düzeyde direnç gösterdiğine işaret etmiştir (Chopin 1980). Laktokok fajları ile yürütülen ilk çalışmalardan elde edilen bu sonuçlar, pastörizasyon işleminin fajların inaktivasyonunda kullanılamayacağı fikrini doğrumuş ve birkaç sınırlı çalışma dışında, bu konu üzerinde uzun süre araştırma yürütülmemiştir. Ancak sıcaklık uygulamalarının etkinliğinin; denenen faj tipine, sıcaklığın düzeyi ve süresine bağlı olarak büyük ölçüde değişkenlik gösterdiğinin tanımlanması ile, bu çalışmalar tekrar önem kazanmıştır.

Endüstriyel starter kültür suşları olarak kullanılan iki *Lactococcus* türüne özgü fajların tiplendirilmesi yapıldıktan sonra, sıcaklık direnç özellikleri incelendiğinde; *L. lactis* subsp. *lactis*' e özgü fajların *L. lactis* subsp. *cremoris*' e özgü fajlardan daha yüksek sıcaklık direnç yeteneği gösterdiği saptanmıştır. Araştırmacılar, çalışmada kullandıkları *L. lactis* subsp. *cremoris* fajlarının inaktivasyonu için 65 °C sıcaklığın, 1.25-3 dk süreyle uygulanmasının yeterli olduğunu belirlemiştir. Diğer yandan çalışılan *L. lactis* subsp. *lactis* fajlarında 65 °C uygulamasında tam inaktivasyon için gerekli süre, 45 dk olarak tespit edilmiştir. Ancak, aynı çalışmada bir *L. lactis* subsp. *lactis* fajının 72 °C' de 5 dakikada tamamen inaktive olduğu gözlenmiştir (Gallmann and Eberhard 1993, Moroni *et al.* 2002). Dört farklı *L. lactis* subsp. *lactis* fajının 63 °C ve 72 °C sıcaklık uygulamalarına verdiği yanıtın incelendiği bir diğer araştırmada; 72 °C sıcaklık uygulamasında % 99 düzeyinde faj inaktivasyonu için gerekli sürenin, tüm fajlarda 63 °C sıcaklık uygulamasındaki aynı sürelerle oranla düşük olduğu belirlenmiştir. Tüm fajların inaktivasyonu için 72 °C' de inkübasyon süresi M17 broth ortamlarında 5 dakika olarak tespit edilirken, 63 °C için bu süre 45 dakika ve üzerine çıkmıştır. Araştırmacılar ayrıca, faj saklama ortamlarına bağlı olarak da sıcaklık direncinin değişim gösterdiğini saptamıştır (Suárez and Reinheimer 2002).

Sıcaklık uygulamalarının yeni bir alanı da, sıcaklığın yüksek basınç teknolojileri ile kombine

edilerek kullanımını esas almaktadır. Özellikle sütün pastörizasyonu için kullanılan endüstriyel sıcaklık uygulamalarına direnç gösteren laktokok fajlarının inaktivasyonunda bu yöntem önerilmektedir. 25 °C ve 30 °C' de 200-350 Mpa (Mega paskal) basınç uygulaması laktokok fajlarının inaktivasyonu için yeterli olmaktadır. Pastörizasyon ile birlikte kombine edilmesi halinde ise, süt endüstrisinde sorun yaratan dominant fajların 100 Mpa basınç uygulaması sonucu inaktive edildiği tespit edilmiştir (Moroni *et al.* 2002, Avşaroğlu *et al.* 2006, Müller-Merbach *et al.* 2005a). Ancak özellikle birçok geleneksel üründe bir ön ısıtma işlemi uygulanmasına rağmen basınç uygulamasının mümkün olmayışı, bu iki yöntemin kombine edilmesini kısıtlamaktadır (Müller-Merbach *et al.* 2005a).

Bugüne kadar yürütülen sınırlı çalışmalardan elde edilen veriler sıcaklık uygulamalarının etkinliğinin, özellikle laktokok fajının tipine bağlı olarak değiştiğine işaret etmektedir. Bu nedenle değişik bölgelerde ve hatta farklı karakteristikler içeren üretim birimlerinde bile dominant faj tiplerinin belirlenmesi ve bu fajların sıcaklık duyarlılık düzeylerinin tespiti, uygulama açısından büyük önem taşımaktadır. Sıcaklık ya da sıcaklık ile kombine edilmiş diğer faj kontrol sistemlerinin, faj inaktivasyon kinetiklerinin tüm dünyadaki endüstriyel üretim birimleri için etkin bir biçimde tanımlanması, bu çalışmaların yaygınlığının artması ile mümkün olacaktır (Moroni *et al.* 2002, Oriani and Yokoya 2004, Müller-Merbach *et al.* 2005b).

Ultra Yüksek Sıcaklık (UHT) teknolojisi, süt endüstrisinde kullanılan bir başka sıcaklık uygulama yöntemidir. Pastörizasyon uygulamasında daha etkin bir inaktivasyon sağlamasına rağmen, özellikle peynir teknolojisinde tercih edilmemektedir. Zira UHT işlemi görmüş sütün peyniraltı suyu proteinlerinin % 80' i denatüre olmaktadır. Dolayısı ile laktokok suşlarının starter kültür olarak kullanıldığı ve bu nedenle faj kontaminasyonlarından kaynaklanan en yüksek ekonomik kayıpların meydana geldiği peynir üretiminde bu yöntemin kullanımını sınırlıdır (Dannenberg and Kessler 1988c, Müller-Merbach *et al.* 2005b).

2.5.2. Biosit uygulamalarının laktokok fajları üzerine etkisi

Biositler; stoplazma membranı, hücre duvarı, enzim, koenzim, protein yada diğer makromoleküller üzerinde doğrudan yapısal deformasyona yol açma ya da bu hücresel elemanların sentezini bozma, protoplazmanın koagülasyonu, elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon sistemlerinin inhibisyonu gibi çoklu etkiler sonucu aktivite gösteren antimikrobiyel ajanlar olarak tanımlanmaktadır. Biositlerin bu aktiviteleri, uygulanan

mikroorganizmanın hücre yapısı ve fizyolojisine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bir biyosit etkinliğini yukarıda ifade edilen birden çok mekanizma ile gösterebilir ve değişik tipte mikroorganizmaları inaktive edebilir (Chambers and Hadley 1998, Russell 1998, McDonnell and Russell 1999).

Biyositler, hücre ya da virüs yüzeyine adsorbsiyondan sonra yapıya nüfuz eder ve biyosisteme dahil olur. Bu aşamalardan sonra hedef bölgede biyosidal etkinlik genellikle kısa sürede ortaya çıkar. Biyosidal aktivite; etkinlik gücüne göre üç seviyeli olarak tanımlanmaktadır. Birinci seviye; bakteri sporları, virüsler, mantar ve mikobakterileri kapsayan en yüksek etki düzeyidir. İkinci seviyede (orta seviye) mikobakteri, mantar ve virüslerin; üçüncü seviyede (düşük seviye) ise sadece sporsuz bakterilerin (mikobakteriler hariç) ve zarflı virüslerin inaktivasyonu söz konusudur (Klein and Deforest 1983, Chambers and Hadley 1998, Maillard 2001, Russell 2002).

Biyosit olarak kullanılan kimyasaları; alkoller, hidrojen peroksit, sodyum hipoklorit, perasetik asit, fenoller, kuaterner amonyum bileşikleri, aldehitler, biguanitler, diamidinler, iyot ve iyodoforlar ve gümüş bileşikleri başlıkları altında toplamak mümkündür. Endüstriyel sanitasyon uygulamalarında en yaygın olarak kullanılan biyositler, alkoller ve hipoklorit ya da bunların türev bileşikleridir (Russell 1999, Estrela *et al.* 2002, Li *et al.* 2002, Russell 2003).

2.5.2.1. Alkoller

Bir çok alkol türü, etkin antimikrobiyel ajan olarak görülmekle birlikte, en yaygın kullanım alanı bulan alkoller etil alkol, izopropil alkol, ve *n*-propanol' dür. Alkoller, vejetatif bakteri formlarına, mantarlara ve virüslere karşı hızlı ve geniş spektrumlu antimikrobiyel aktivite göstermektedir. Alkoller sporisidal aktivite göstermediklerinden, sterilizasyon için uygun değildir. Ancak sert yüzey dezenfeksiyonu ve cilt antiseptisinde yaygın bir kullanım alanına sahiptirler (Yasuda-Yasuki *et al.* 1978, Morton 1983, Russell 1991). Virüslerin alkollere olan duyarlılığı, virüs lipit zarf yapısının bulunup bulunmaması ve virüsün büyüklüğü ile doğrudan ilişkilidir. Alkollerin hedefi olan başlıca viral yapılar; lipit zarf, protein kapsid ve virüs nükleik asididir. Lipit zarf yapısı içeren virüsler alkollere karşı, zarf yapısına sahip olmayan virüslerden daha duyarlıdır (Chambers and Hadley 1998, Russell 1999). Alkollerin antiviral etkinliğini belirleyen bir diğer husus, kullanılan alkolün konsantrasyonudur. Laktokoklar ve diğer laktik asit bakterilerinin fajları ile yürütülen

çalışmalarda; faj tipine bağlı olarak, % 50 yada % 75 etil alkolün % 100 etil alkolden daha düşük etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmalarda izopropanolün etkinliği etanole oranla çok düşük bulunmuş ve yine en etkin konsantrasyonun % 100 olduğu saptanmıştır (Maillard *et al.* 1996, Quiberoni *et al.* 1999, Binetti and Reinheimer 2000, Suárez and Reinheimer 2002).

Alkollerin laktokok fajları üzerine etkinliği, yukarıda özetlenen çalışmalar ile sınırlıdır. Özellikle laktokok fajlarında yüksek düzeyde morfoloji farklılaşmasının görülmesi, değişik laktokok fajları için, söz konusu bulguların farklılık gösterebileceğine işaret etmektedir (Russell 2003, Oriani and Yokoya 2004).

2.5.2.2. Sodyum hipoklorit

Klor periyodik cetvelde halojenler grubu içerisinde yer alan ve aktif oksitleyici özelliği nedeni ile virüsler ve hücreli form içeren tüm mikroorganizmalara karşı güçlü bir dezenfektan etkisi gösteren bir elementtir. Klorun sıvı (sodyum hipoklorit) ve toz (kalsiyum hipoklorit ve sodyum diklorisosyanurat) preparatları dezenfektan olarak kullanılmaktadır. En fazla kullanılan formu sıvı sodyum hipoklorittir (McKenna and Davies 1988, Denyer and Stewart 1998). Hipoklorit, proteinlerin amino ve tiyol gruplarına etkisi nedeniyle güçlü bir antiviral ajan olarak, tıbbi ve endüstriyel amaçlı sanitasyonlarda kullanılmaktadır. Virüs baş yapısının içerisine girdiğinde ise, öncelikle nükleik asit bazlarının klorlanmış türevlerinin oluşumuna yol açarak, replikatif ve transkriptif özellikleri bakımından inaktif bölgeler meydana getirmektedir (Hugo and Russell 1999).

Laktokok fajlarının, sodyum hipoklorit kullanılarak inaktivasyonu üzerinde yürütülen çalışmalarda, süt ya da peyniraltı suyunda hazırlanan faj süspansiyonlarının, M17 broth ortamlarında hazırlananlara oranla çok daha dirençli olduğu saptanmıştır. Süt ve peyniraltı suyu ortamlarında denenen laktokok fajlarının tamamen inaktivasyonu için 500 ppm üzerinde sodyum hipoklorit oranına gereksinim duyulduğu ve bazı *L. lactis* subsp. *lactis* fajları için bu oranın 1000-2000 ppm düzeyine çıktığı belirlenmiştir. Aynı fajların M17 broth ortamlarında inaktivasyonları için gerekli oran 100-300 ppm düzeylerine düşmüştür (Binetti and Reinheimer 2000, Parada and Fabrizio 2001). Suárez ve Reinheimer (2002) tarafından yürütülen çalışmada; Arjantin’ de endüstriyel süt fermentasyon ortamlarından izole edilen dört farklı fajın ikisinin 200 ppm, birinin 300 ppm hipoklorit konsantrasyonunda tamamen

inaktive olduğu, ancak dördüncü fajın denenen konsantrasyonlara direnç gösterdiği belirlenmiştir.

Klor kullanımı ile virüs inaktivasyonu üzerinde bilgi birikimi arttıkça, gerek gıda endüstrisinde sorun yaratan fajların ve gerekse insanlarda enfeksiyonlara yol açan virüslerin kontrolünde önemli adımlar atılacaktır (Li *et al.* 2002, Estrela *et al.* 2002, Estrela *et al.* 2003).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteriler ve Fajlar

Bu çalışmada, temel biyomateriyal olarak 10 adet faj ile bu fajların homolog konakçıları olan 5 adet *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* , 3 adet *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve 1 adet *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* suşu kullanıldı. Laktokok fajları ve homolog konakçı suşları Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Kütür Koleksiyonundan sağlandı. Çalışmada kullanılan diğer *L. lactis* alt türleri ve biyovaryetesi, Türkiye' nin değişik bölgelerinden sağlanan çiğ sütlerden izole edildi. Bu bakterilerin izole edildiği bölgeler Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Bakteriler, M17 broth ortamına % 20 oranında steril gliserol ilave edilerek -20 °C' de saklandı. Fajlar ise, M17 broth ortamına % 40 oranında steril gliserol ilave edilerek -20 °C' de muhafaza edildi. Denemeler için sürekli kullanılan bakteriler, gliserol ilave edilmemiş M17 broth ortamında + 4 °C' de haftalık pasajlar yapılarak korundu. Fajlar ise M17 broth ortamına kloroform ilave edilerek veya steril membran filtrelerden geçirilerek + 4 °C' de muhafaza edildi.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan laktokok suşlarının izolasyon materyalleri ve izolasyon materyallerinin sağlandığı bölgeler

Bakteri Kod No.	İzolasyon Materyali	Bölge
LLL1	Çiğ Süt	Ankara (Kazan)
LLL2	Çiğ Süt	Trabzon (Tonya)
LLL3	Çiğ Süt	Trabzon (Çaykara)
LLL4	Çiğ Süt	Ordu (Gölköy)
LLL5	Çiğ Süt	Ordu (Ünye)
LLL6	Çiğ Süt	Samsun (Bafra)
LLL7	Çiğ Süt	Ankara (Çubuk)
LLL8	Çiğ Süt	Nevşehir (Acıgöl)
LLL9	Çiğ Süt	Antalya (Bozova)
LLL10	Çiğ Süt	Bursa (Seydigöl)
LLL11	Çiğ Süt	Burdur (Varollar)
LLL12	Çiğ Süt	Nevşehir (Avanos)
LLL13	Çiğ Süt	Şanlıurfa (Ceylanpınar)
LLL14	Çiğ Süt	İzmir (Ödemiş)
LLL15	Çiğ Süt	Iğdır (Aralık)
LLL16	Çiğ Süt	Denizli (Çivril)
LLL17	Çiğ Süt	Kars (Susuz)
LLL18	Çiğ Süt	Sinop (Kargı)
LLL19	Çiğ Süt	Yozgat (Sorgun)
LLL20	Çiğ Süt	Kilis
LLL21	Çiğ Süt	Bilecik

Çizelge 3.1. (devam)

Bakteri Kod No.	İzolasyon Materyali	Bölge
LLD1	Çiğ Süt	Gümüşhane (Torul)
LLD2	Çiğ Süt	Balıkesir (Gönen)
LLD3	Çiğ Süt	Antalya (Bozova)
LLD4	Çiğ Süt	Nevşehir (Avanos)
LLD5	Çiğ Süt	Bilecik
LLD6	Çiğ Süt	Bursa (Seydigöl)
LLD7	Çiğ Süt	Ankara (Kazan)
LLD8	Çiğ Süt	Nevşehir (Acıgöl)
LLD9	Çiğ Süt	Ordu (Ünye)
LLD10	Çiğ Süt	Bolu (Gerede)
LLC1	Çiğ Süt	Çorum (Sungurlu)
LLC2	Çiğ Süt	Kilis
LLC3	Çiğ Süt	Uşak (Altıntaş)
LLC4	Çiğ Süt	Trabzon (Akçaabat))
LLC5	Çiğ Süt	Bursa (Seydigöl)
LLC6	Çiğ Süt	Tekirdağ (Muratlı)
LLC7	Çiğ Süt	Edirne
LLC8	Çiğ Süt	Kocaeli (Gebze)
LLC9	Çiğ Süt	Antalya (Bozova)
LLC10	Çiğ Süt	Burdur (Varollar)
LLC11	Çiğ Süt	Samsun (Bafra)
LLC12	Çiğ Süt	Nevşehir (Acıgöl)
LLC13	Çiğ Süt	Konya (Altınova)
LLC14	Çiğ Süt	Kayseri (Pınarbaşı)
LLC15	Çiğ Süt	İzmir (Ödemiş)
LLC16	Çiğ Süt	Sinop (Kargı)
LLC17	Çiğ Süt	Denizli (Çivril)
LLC18	Çiğ Süt	Afyonkarahisar

3.2. Metot

3.2.1. Laktokok suşlarının izolasyonu

Çiğ süt örneklerinin 10^{-7} düzeyine kadar hazırlanan seri dilüsyonlardan, Neutral Red Chalk Lactose Agar (NRCLA) (Harrigan and McCance 1966) ortamlarına 0.1 mL aktararak, drigalski spatülü ile yayıldı. 30 °C' de 48 saat inkübe edilen petri plaklarında tipik laktokok kolonileri; koyu kırmızı renkte ve çevrelerinde berrak zon oluşumu kriterlerine göre seçildi.

Neutral Red Chalk Lactose Agar

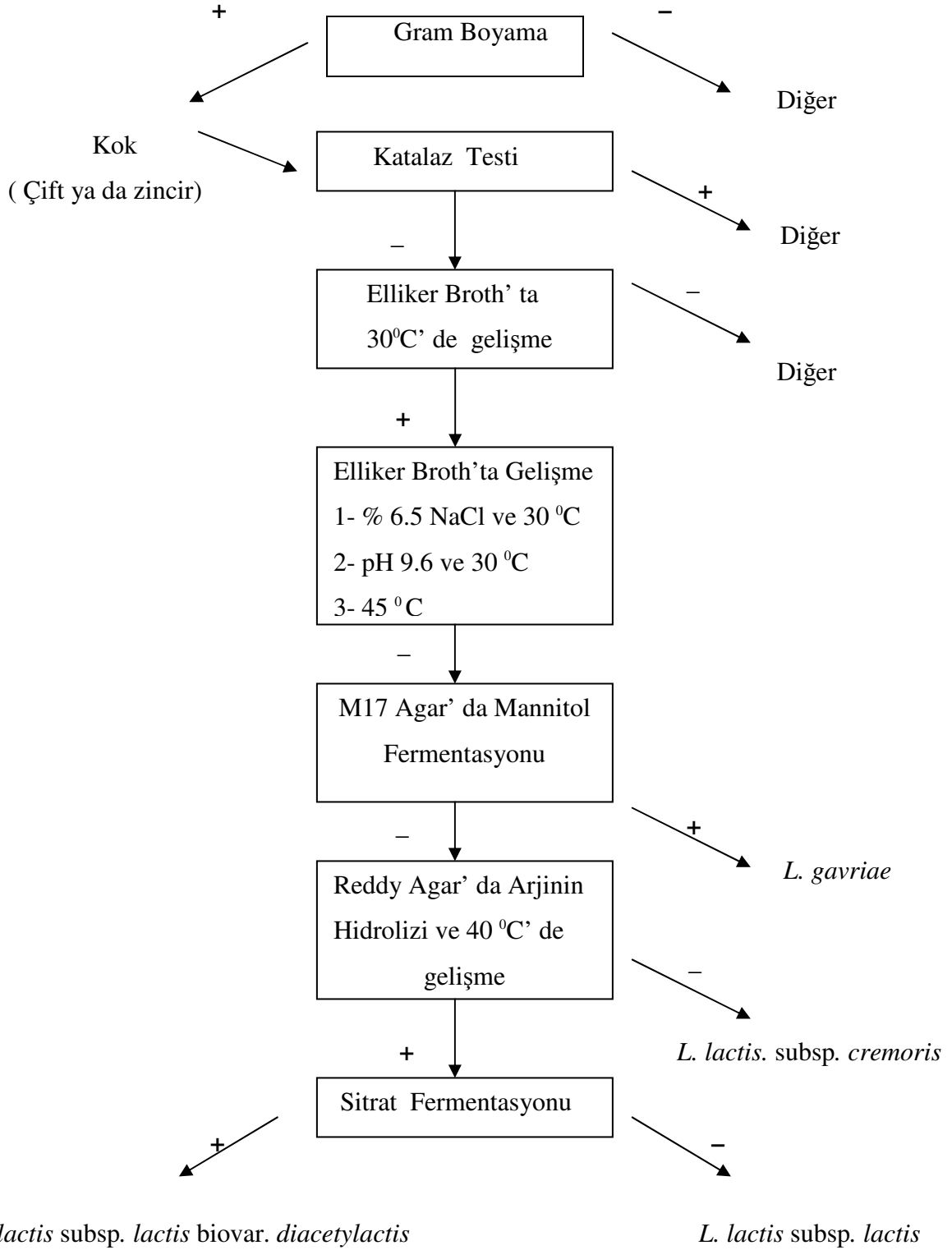
Laktoz	10	g
Pepton	3	g
Lablemco et ekstraktı	3	g
Maya ekstraktı	3	g
Agar	15	g
CaCO ₃	15	g
Neutral red (% 1' lik çözelti)	5	mL
Destile su	1000	mL

pH 6.8 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Pepton, et ekstraktı ve maya ekstraktı destile suda (buhar banyosunda) çözüldükten sonra pH 6.8 düzeyine ayarlandı. Agar ilavesinden sonra ortam 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi. Laktoz, CaCO₃ ve Neutral red ayrı ayrı 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi ve içerikler sırasıyla temel besiyerine karıştırıldı.

3.2.2. İzolatlardan laktokok suşlarının tanısı

Laktokok suşlarının tanımlanmasında Şekil 3.1.' de verilen tanı şeması, belirtilen sıra takip edilerek kullanıldı (Huggins 1984, Holt *et al.* 1994).



Şekil 3.1. *L. lactis* suşlarının tanısında kullanılan testler ve akım şeması (Huggins 1984, Holt et al. 1994)

3.2.2.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi

Bakteri morfolojileri, Gram boyama yöntemi ile hazırlanan preparatların 1500 x büyüme ile ışık mikroskobunda incelenmesi sonucunda belirlendi. Katalaz testi için, M17 agar ortamında geliştirilen bakteri kolonileri lam üzerine aktarıldıktan sonra, % 3' lük hidrojen peroksit çözeltilisinden bir damla ilave edilerek, mikroskop altında 100 x büyütmede gaz çıkışı olup olmadığı gözlemlendi. Gaz çıkışı gözlenen lamlarda test pozitif olarak değerlendirildi.

M17 Broth ve Agar

Polipepton	5	g
Fitopepton	5	g
Maya ekstraktı	2.5	g
Et ekstraktı	5	g
β - disodyum gliserofosfat	19	g
Laktoz (% 10)	50	mL
MgSO ₄ .7H ₂ O (1 M)	1	mL
Askorbik asit	0.5	g
Agar	15	g
Destile su	950	mL

pH 7.15 \pm 0.02 (sterilizasyondan önce)

Laktoz hariç tüm ortam içerikleri, 950 mL destile su içerisinde çözüldü. Sterilizasyon 121 °C' de 15 dakika süre ile yapıldı. Ortam 45 °C' ye kadar soğutulduktan sonra, ayrı sterilize edilen laktoz çözeltilisi (50 mL) ilave edildi (Terzaghi and Sandine 1975).

3.2.2.2. Arjininden amonyak oluşumu

İzolatların arjininden amonyak oluşturma özelliklerinin saptanması amacıyla Reddy agar (Reddy *et al.* 1969) ortamı kullanıldı. İzolatlar, Reddy agar ortamına inoküle edildikten sonra (her bir petri plağı için 1 mL), petri kutuları 30 °C' de 48 saat tutuldu ve süre bitiminde gelişen kolonilerdeki renk değişimlerine göre arjininden amonyak oluşumu belirlendi. Arjininden amonyak oluşturan kolonilerde, gelişen asitlik amonyak oluşumu ile nötralize edilmekte ve asitliğin neden olduğu sarı renk kaybolmaktadır. Arjininden amonyak oluşturmamayanlarda ise, asitlik indikatör boya rengini (menekşe) sarıya çevirmekte ve inkübasyon boyunca renk değiştirmemektedir (Reddy *et al.* 1969).

Reddy Agar

Tripton	5	g
Maya ekstraktı	5	g
L-Arjinin monohidroklorit	4	g
K ₂ HPO ₄	1	g
CaCO ₃	3	g
Karboksimetil selüloz	6	g
Reconstitute skim milk (% 10)	50	mL
Brom krezol purpur (% 0.1)	20	mL
Agar	15	g

pH 6.8 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Önce 430 mL destile su içeren bir erlenmayer içinde agar, 500 mL destile su içeren bir diğerinde ise karboksimetil selüloz, kaynar su banyosunda çözüldü ve birbirine karıştırıldı. Bu ortama tripton, maya ekstraktı, L-Arjinin monohidroklorit, K₂HPO₄, CaCO₃ ilave edildi ve erlenmayer alüminyum folyo ile kaplanarak 10 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. 121 °C' de 15 dakika sterilize edilen ortam, 55 °C' ye kadar soğutulduktan sonra, ayrı sterilize edilen reconstitute skim milk ve brom krezol purpur ilave edilerek petrilere döküldü.

3.2.2.3. Elliker broth besiyerinde gelişme

Bakteriler Elliker broth ortamında 30 °C' de 18 saat üretildikten sonra, % 6.5 NaCl ilavesi ve pH 9.6' ya ayarlanarak yeniden hazırlanan iki ayrı Elliker broth ortamına inoküle edildi. Ayrıca Elliker broth içinde, suşların 45 °C' de gelişme özellikleri de incelendi.

Elliker Broth (Difco Manual, 1984)

Tripton	20	g
Maya ekstraktı	5	g
Jelatin	2.5	g
Dekstroz	5	g
Laktoz	5	g
Sakkaroz	5	g
Sodyum klorür	4	g
Sodyum asetat	1.5	g
Askorbik asit	0.5	g
Destile su	1000	mL

pH 6.8 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Sterilizasyon $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 15 dk sıcaklık uygulaması ile yapıldı.

3.2.2.4. Sitrat fermentasyon testi

Sitrat fermentasyonu, Kempler ve McKay (1980) tarafından önerilen yöntemle yapıldı. Bakteriler sitrat fermentasyon ortamlarına inoküle edilerek, anaerobik koşullarda (Oxoid anaerobik sistem) $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 48 saat inkübasyona tabi tutuldu. Besiyerinde rengin maviye dönüşümü pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

Sitrat Fermentasyon Ortamı

Temel Besiyeri

Yağsız süt	10	mL
Pepton (Süt protein hidrolizatı)	2.5	g
Dekstroz	5	g
Agar	15	g
Destile su	970	mL

pH 6.6 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

Sterilizasyon $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 12 dk sıcaklık uygulaması ile yapıldı.

Cözelti A

Potasyum ferri siyanat	10	g
Destile su	1000	mL

Cözelti B

Ferrik sitrat	1 g
Sodyum sitrat	1 g
Destile su	40 mL

100 °C su banyosunda 30 dakika süre tutulan ve 55 °C' ye kadar soğutulan A ve B çözeltilerinin her birinden, sterilize edilen temel besiyeri ortamına litreye 10 mL olacak şekilde ilave edilerek karıştırıldı ve petrilere döküldü.

3.2.2.5. Mannitol fermentasyon testi

Mannitol fermentasyon testi, karbon kaynağı olarak yalnız mannitol ilave edilen (% 10, 50 mL) ve indikatör boya (% 0.004 brom krezol purpur, 10 mL) içeren M17 agar ortamında yapıldı (Terzaghi and Sandine 1975, Holt *et al.* 1994). Suşlar bu ortamlara inoküle edilerek 30 °C' de 18 saat inkübasyona tabi tutuldu. Bu süre bitiminde, gelişmeleri sonucu indikatör boya rengini sarıya çeviren koloniler mannitolü fermente etme yeteneğine sahip olarak tanımlandı.

3.2.3. Faj Biyodenemeleri

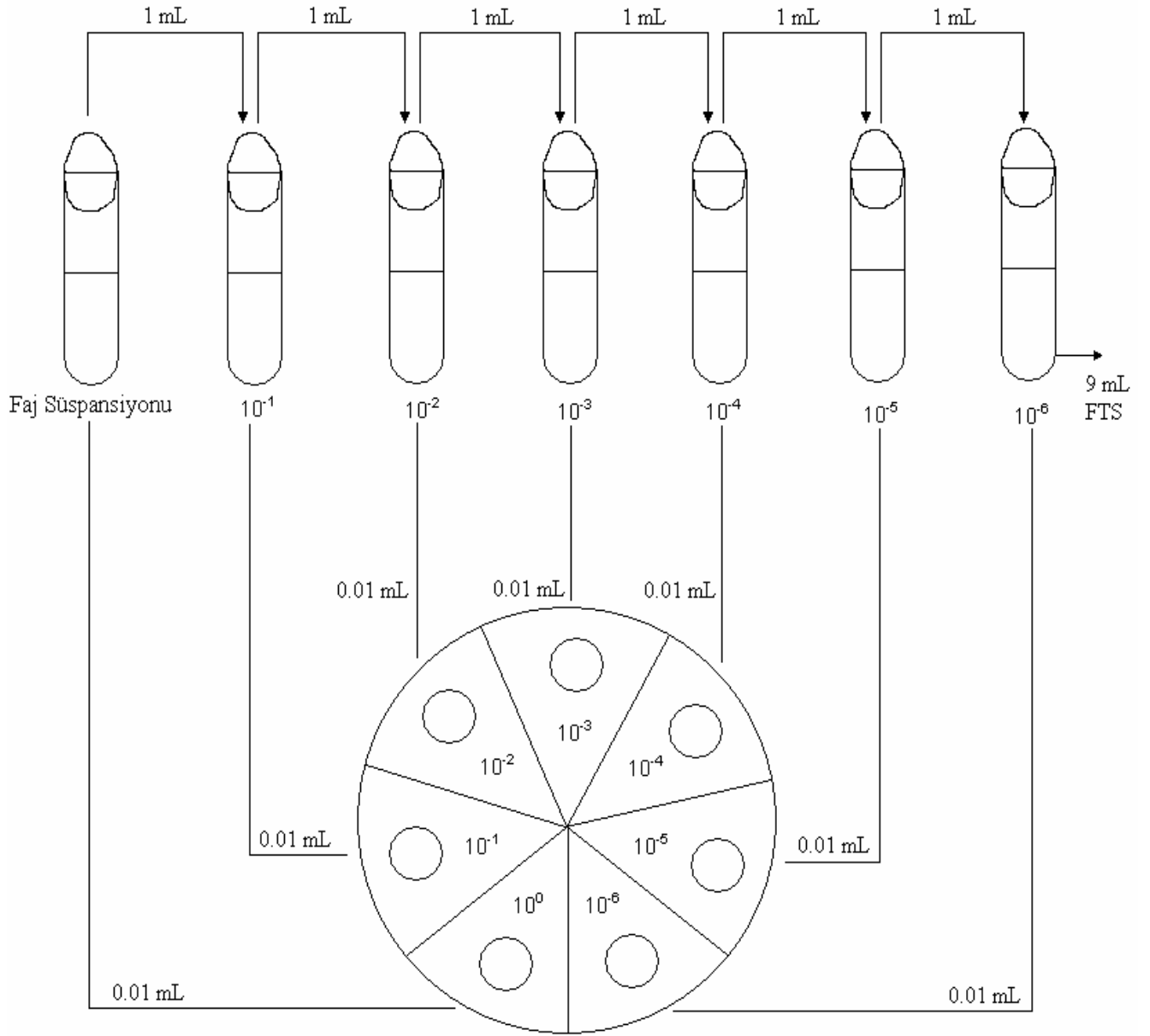
3.2.3.1. Faj titresinin belirlenmesi

Faj titresinin plak oluşturma birimi (pfu/mL) esas alınarak saptanmasında, M17 çift tabaka agar yöntemi kullanıldı (Terzaghi and Sandine 1975). Herbirinde, 9 mL steril fizyolojik tuzlu su (% 0.85 NaCl) bulunan tüplere, aseptik koşullarda, faj süspansiyonlarından 1 mL aktarıldıktan sonra bu örneklerden 10⁻⁶ düzeyine kadar seyrelti dizisi hazırlandı. Bakteriler, 10 mL M17 broth besiyerlerine 0.1 mL olacak şekilde inokülasyonlar yapılarak, 30 °C' de 3 saat inkübasyona bırakıldı. M17 broth ortamında 3 saat süreyle geliştirilen bakteri kültürlerinden 0.1 mL alınarak, 45 °C su banyosunda tutulan M17 üst tabaka agar (yumuşak agar, 3.5 mL) üzerine aktarıldı. Ortam kısa bir süre manyetik karıştırma işlemine tabi tutulduktan sonra, alt tabaka üzerine dökülüp homojen bir şekilde yayılması sağlandı. Yumuşak agarın katılaşması için 5-10 dk beklendikten sonra, camyazar kalem ile çizilerek eşit bölümlere ayrılan petri plaklarının her bir bölümüne, faj süspansiyonlarından ve hazırlanan faj seyreltilerinin herbirinden 10' ar µL damlatıldı. Petri kutuları düz bir zeminde yaklaşık 30 dk bekletildikten sonra, 30 °C' de 18 saat inkübasyona bırakıldı. Son aşamada

petri kutularında, faj uygulama bölgelerindeki lize plakları (berrak plaklar) incelenerek faj titreleri belirlendi (Şekil 3.2). Faj titreleri aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı;

$$\text{Faj Titresi} = \frac{\text{Dilüsyon Faktörü (DF) x Plak Sayısı}}{\text{Aktarılan Hacim (10}^{-2}\text{ mL)}}$$

Çift tabaka M17 Agar Ortamlarının hazırlanışı: Faj denemelerinde, M17 alt tabaka agar ortamı (% 1.5 agar) , 121 °C' de 15 dk sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Bu ortama ayrı sterilize edilen 1 M CaCl₂.6H₂O çözeltisinden 10 mL/L ilave edilerek 15-20 mL arasında olacak şekilde petrilere aktarıldı ve 22-25 °C' de 18 saat tutuldu. Üst tabaka ortamı, M17 alt tabaka içeriklerinin tümünün katılması ile hazırlandı. % 0.45 oranında agar içeren üst tabaka, 3,5 mL' lik porsiyonlar halinde tüplere aktarıldı ve alt tabaka gibi 121 °C' de 15 dk süre ile sterilize edildi (Terzaghi and Sandine 1975).



Şekil 3.2. Faj titresinin belirlenmesi

3.2.3.2. Faj titresinin yükseltilmesi

Faj biyodenemelerinde, titreleri yüksek (10^7 pfu/mL ve üstü) faj süspansiyonları kullanıldı. Faj titresinin yükseltilmesi için, steril tüplere 0.1 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1M) çözeltisi, 0.1 mL faj süspansiyonu ve 0.1 mL homolog konakçı suş kültürü (30°C ' de 3 saat süreyle geliştirildi) aktarıldı ve etkin faj adsorbsiyonunun gerçekleşmesi için 30°C ' de 12 dk tutuldu. Adsorbsiyon süresi bitiminde, 10 mL steril M17 broth besiyeri bu ortam üzerine aktararak 30°C ' de 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda ortamlar, steril koşullarda santrifüj tüplerine aktarılıp, 6000 devir/dk hızda 15 dk süreyle santrifüj işlemine tabi tutuldu. Son aşamada, tüplerde oluşan üst faz alınarak steril membran filtrelerden ($0.45\ \mu\text{m}$ por çapına sahip membran filtre, Sartorius/Germany) geçirildi. Elde edilen faj süspansiyonu ile aynı aşamalar 2 kez daha tekrarlanarak, titrenin tespit edileceği nihai konsantrasyona (10^7 pfu/mL ve üzeri) ulaşıldı. Fajların, denemelerde kullanılacak çalışma süspansiyonları $+4^\circ\text{C}$ ' de, stoklar ise % 40 oranında steril gliserol ilave edildikten sonra -20°C ' de muhafaza edildi (Terzaghi and Sandine 1975).

3.2.3.3. Bakterilerin faj duyarlılıklarının saptanması

Titreleri 10^7 pfu/mL ve yukarısında elde edilen faj lizatlarının, izole edilen laktokok suşlarına karşı etkinlikleri, çift tabaka agar yöntemi kullanılarak belirlendi (Terzaghi and Sandine 1975). 30°C inkübasyon sıcaklığında 3 saat geliştirilerek hazırlanan bakteri kültürlerinden yumuşak agar ortamına 0.1 mL aktarılıp karıştırıldıktan sonra, alt tabaka M17 agar üzerine döküldü. Yumuşak agarın homojen bir şekilde alt tabaka üzerinde yayılması sağlanıp, katılaşması için 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre bitiminde ortama, test edilecek faj lizatları $10\ \mu\text{L}$ olacak şekilde damlatıldı. Bu ortamlar 30°C ' de 18 saat inkübasyona tabi tutuldu. Faj plak oluşumu ve faj plak etkinliği düzeylerine göre, suşlar duyarlı ya da dirençli olarak tanımlandı.

3.2.3.4. Fajların sıcaklık uygulamalarına karşı duyarlılığının belirlenmesi

Tez kapsamında kullanılan fajların sıcaklık duyarlılıkları; 63°C ' de 30 dakika, 72°C ' de 15 dakika ve 90°C ' de 5 dakika uygulanmaları sonucu tespit edildi. Öncelikle, test edilecek fajların stok solüsyonlarından 1 mL alınarak kapiler tüplere aktarıldı (Kapiler tüpler, fajlar aktarılmadan önce test edilecek sıcaklık değerinde 1 saat tutuldu). Test edilecek fajları içeren kapiler tüpler, deney sıcaklıklarına ayarlanan su banyosunda, belirtilen sürelerde bekletildi.

Uygulama süresi bitiminde örnekler, daha ileri düzeyde faj inaktivasyonunun engellenmesi amacı ile buzlu su banyosunda hızlı bir şekilde soğutuldu. Oda sıcaklığına gelen faj süspansiyonlarında, M17 çift tabaka agar yöntemi kullanılarak sıcaklık uygulaması sonrası titreler saptandı. Her deneme için, sıcaklık uygulanmayan kontrol örneklerin de titreleri belirlendi. Tüm denemeler üç paralelli olarak yapıldı (Suárez and Reinheimer 2002).

3.2.3.5. Fajların etanol ve izopropanol' e karşı duyarlılığının belirlenmesi

Laktokok fajlarının, alkol uygulamaları sonucu inaktivasyonunun belirlenmesi amacı ile, izopropanol (% 10, 50, 75, 100' lük Merck) ve etanol (% 10, 50, 75, 100' lük Riedel-de Haen®) kullanıldı (Suárez and Reinheimer 2002). Yukarıda belirtilen etil alkol ve izopropanol konsantrasyonları, doğrudan faj süspansiyonları kullanılarak, M17 broth ile hazırlandı. Alkol uygulamaları için belirlenen süreler sonunda, faj ortamlarından seri dilüsyonlar yapılarak M17 çift tabaka agar yöntemi ile uygulama sonrası titreler belirlendi. % 100 alkol denemesinde doğrudan faj çökeltisi kullanıldığı için ultrasantrifüjden (Beckman Coulter-Optima™ L-100 XP) yararlanıldı. Fajların çöktürülmesi işlemi; 10 °C' de 40000 rpm' de ve 2,5 saat süre uygulanarak yapıldı. Bu süre sonunda oluşan üst sıvı, çökelti zarar görmeyecek şekilde uzaklaştırıldı. Daha sonra çökelti üzerine % 100 konsantrasyondaki etanol ve izopropanol uygulandı. % 10 alkol denemeleri için % 20, % 50 alkol denemeleri için % 100 konsantrasyondaki alkoller kullanılarak, faj süspansiyonları ile 1:1 oranda karıştırıldı. % 75 alkol uygulamasında ise, % 100 konsantrasyondaki alkol ile faj süspansiyonu 3:1 oranında karıştırıldı. Tüm denemeler 25 °C' de üç paralelli olarak yapıldı. Sonuçlar pfu/mL olarak ifade edildi ve zamana karşı değişimler belirlendi. Her deneme için, alkol uygulanmayan kontrol örneklerin de titreleri belirlenerek, sonuçlar karşılaştırıldı.

3.2.3.6. Fajların sodyum hipoklorite karşı duyarlılığının belirlenmesi

Fajların sodyum hipoklorit (Merck/Germany) ile inaktivasyon özelliklerinin tanımlanmasında; öncelikle 100, 200 ve 300 ppm (% 14 aktif klorin) düzeylerindeki konsantrasyonlar kullanıldı. Ancak bu ön denemelerde yeterli inaktivasyon düzeylerine ulaşılamadığı için, daha yüksek konsantrasyonlara (2000-5000 ppm) çıkıldı.

Nihai sodyum hipoklorit konsantrasyonları, alkol denemelerinde olduğu gibi, doğrudan faj süspansiyonları kullanılarak elde edildi. Bu şekilde hazırlanan ortamlarda faj inaktivasyon düzeyleri, farklı süreler uygulanarak tespit edildi. Tüm denemelerde hipoklorit

uygulanmayan faj süspansiyonları kontrol olarak kullanıldı. Üç paralelli yürütülen denemelerde sonuçlar pfu/mL cinsinden belirlendi (Schröder 1984, Suárez and Reinheimer 2002).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. *L. lactis* Suşlarının Tanısı

Steril örnek toplama kapları içerisinde laboratuvara getirilen çiğ sütlerden, fizyolojik tuzlu su (% 0.85 NaCl) ortamında hazırlanan dilüsyonlar, Neutral Red Chalk Lactose Agar (NRCLA) (Harrigan and McCance 1966) plaklarına 0.1 mL hacimler halinde aktarılarak yüzeye yayıldı. İnkübasyon süresi sonunda (30 °C' de 48 saat) NRCLA plaklarında üreyen koloniler içerisinde; koyu kırmızı renkte olan ve çevrelerinde berrak zon bulunan koloniler, tipik *Lactococcus* (laktokok) kolonileri olarak tanımlandı. Bu koloniler NRCLA plaklarından steril öze aracılığı ile alındı ve saflık kontrolleri yapıldıktan sonra ileri tanı testlerine geçildi.

İzolatlar ile yürütülen biyokimyasal, fizyolojik ve kültürel testler sonucunda; Gram-pozitif, katalaz negatif, kok morfolojisine sahip, Elliker Broth ortamında 30 °C inkübasyon sıcaklığında üreme gösterirken, aynı ortamda 45 °C inkübasyon sıcaklığı, % 6.5 NaCl ilavesi ve ortam pH' sının 9.6 düzeyine çıkarılması (30 °C) gibi üç bağımsız koşulda da üreyemeyenler, *Lactococcus* cinsi üyeleri olarak ayrıldı. Cins düzeyinde tanımlanan bakterilerin alt tür ve biyovaryete düzeyinde tanısı için; *L. lactis* subsp. *lactis*' in arjinin hidrolizi sonucu amonyak oluşturma ve 40 °C inkübasyon sıcaklığında gelişebilme özelliği ile *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*' in sitrat fermentasyonu yeteneğinden yararlanıldı. Bu üç testte de negatif sonuç veren izolatlar ise, *L. lactis* subsp. *cremoris* olarak tanımlandı. Bu testler sonucunda; Türkiye' nin değişik yörelerinden (Çizelge 3.1) sağlanan çiğ sütlerden izole edilen bakteriler içerisinde, 21 adet *L. lactis* subsp. *lactis*, 10 adet *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve 18 adet *L. lactis* subsp. *cremoris* suşu tespit edildi (Çizelge 4.1).

Çiğ sütlerden *L. lactis* suşlarının izolasyonunu esas alan çalışmalarda; *L. lactis* subsp. *lactis*' in bu ortamda, *L. lactis* subsp. *cremoris*' den çok daha yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir (Salminen and Von Wright 1993, Kim *et al.* 1999). Bizim araştırmamızda da 31 adet *L. lactis* subsp. *lactis*' e karşılık 18 adet *L. lactis* subsp. *cremoris*' in tanımlanması, bu bulguları doğrulamaktadır. Ancak, bizim çalışmamızda belirlenen oranlar yukarıda ifade edilen literatür verilerindeki oranlara göre, *L. lactis* subsp. *cremoris* açısından daha yüksektir. Bu durumun ekolojik bir farklılıktan ileri gelip gelmediği, Türkiye' den izole edilen ve tanımlanan örnek miktarının artışı ile mümkün olacaktır.

Çizelge 4.1. Laktokok suşlarının tanısı

Morfolojik, Biyokimyasal ve Kültürel Özellikler		Bakteri Kod No.																									
		LLL1	LLL2	LLL3	LLL4	LLL5	LLL6	LLL7	LLL8	LLL9	LLL10	LLL11	LLL12	LLL13	LLL14	LLL15	LLL16	LLL17	LLL18	LLL19	LLL20	LLL21	LDD1	LDD2	LDD3	LDD4	LDD5
Bakteri Morfolojisi		K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Gram Reaksiyonu		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz Testi		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol Fermentasyonu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arjinin Hidrolizi		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sitrat Fermentasyonu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Elliker Broth' ta Gelişme	40 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	% 6.5 NaCl - 30 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	pH 9.6 - 30 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

K: Kok

Çizelge4.1. (devam)

		Bakteri Kod No.																						
Morfolojik, Biyokimyasal ve Kültürel Özellikler		LLD6	LLD7	LLD8	LLD9	LLD10	LLC1	LLC2	LLC3	LLC4	LLC5	LLC6	LLC7	LLC8	LLC9	LLC10	LLC11	LLC12	LLC13	LLC14	LLC15	LLC16	LLC17	LLC18
Bakteri Morfolojisi		K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Gram Reaksiyonu		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz Testi		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol Fermentasyonu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arjinin Hidrolizi		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat Fermentasyonu		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Elliker Broth' ta Gelişme	40 °C	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	% 6.5 NaCl - 30 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	pH 9.6 - 30 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

K: Kok

4.2. Bakterilerin Faj Duyarlılıkları

Araştırmada kullanılan bakterilerin faj duyarlılıkları, Türkiye’ den izole edilen laktokok suşlarına karşı en yüksek konakçı etkinliğine sahip olduğu değişik çalışmalarda belirlenmiş olan (Akçelik and Tunail 1992, Akçelik 1999a ve 1999b, Akçelik *et al.* 2000, Şanlıbaba ve Akçelik 2000) 10 adet laktokok fajı kullanılarak saptandı. Çift tabaka M17 agar ortamlarında faj plak oluşturma esasına göre yürütülen testler sonucu; 31 *L. lactis* subsp. *lactis* suşunun 8 adedi (7 adedi *L. lactis* subsp. *lactis* ve 1 adedi *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) ve 18 *L. lactis* subsp. *cremoris* suşunun 9 adedi, denemede kullanılan fajların tümüne karşı dirençlilik özelliği gösterdi. Tüm bakteriler içerisinde yalnız *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LLD1 suşu, denenen fajların tümüne karşı duyarlılık fenotipine sahip bulundu. Diğer yandan, *L. lactis* subsp. *lactis* LL1, LL6 ve LL8, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LLD7 ile *L. lactis* subsp. *cremoris* LLC4 ve LLC11 yalnız bir laktokok fajına karşı duyarlılık gösterdi. Bunların dışındaki duyarlı bakterilerde, faj duyarlılık oranları % 20-50 arasında tespit edildi. *L. lactis* suşlarına karşı en yüksek litik etkinliğe sahip faj Øpll62 olarak saptandı. Øpll62, 12 *L. lactis* suşuna karşı litik aktivite yeteneği gösterdi (Çizelge 4.2).

Endüstriyel gıda fermentasyonlarında starter kültür suşları olarak kullanılan *L. lactis* suşlarında, faj dirençlilik özelliği, ürün verimi ve kalitesi bakımından büyük bir önem taşımaktadır. Bu nedenle, fermentasyon ortamlarında sorun yaratan dominant faj tiplerine karşı direnç fenotipi, diğer endüstriyel kriterler ile birlikte, starter kültür suşu seçiminde kullanılmaktadır (Daly *et al.* 1996, Allison and Klaenhammer 1998). Özellikle endüstriyel starter kültür suşu kullanımının yaygın olduğu ülkelerde, fajlarla karşılaşma olasılıklarının çok yüksek olması nedeni ile, laktokoklarda yüksek düzeyde faj duyarlılık fenotipi tespit edilmektedir (Moineau 1999, Proux *et al.* 2002, Lauridsen *et al.* 2003). Fajların, uzun süre ilişkide oldukları laktokokların direnç özelliğini kırarak mekanizmaları geliştirdiğinin moleküler kanıtlarla tanımlanması, bu yüksek duyarlılık düzeylerini açıklamaktadır.

Çizelge 4.2. Bakterilerin faj duyarlılıkları

Bakteri Kod No.	Faj Kod No.									
	Øp1162	Øp11105	Øp11356	Øp113614	Øp114721	Øp1d6434	Øp1d6636	Øp1d6737	Øp1c6154	Øp1c6158
LLL1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LLL2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
LLL3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLL4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLL5	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
LLL6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LLL7	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
LLL8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LLL9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLL10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLL11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLL12	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
LLL13	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
LLL14	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
LLL15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLL16	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
LLL17	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
LLL18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLL19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLL20	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
LLL21	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
LLD1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LLD2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
LLD3	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
LLD4	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LLD5	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-

+ : Litik faj etkinliği (faj duyarlı)

- : Faj dirençli

LLL: *L. lactis* subsp. *lactis*

LLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

Çizelge 4.2. Devam

Bakteri Kod No.	Faj Kod No.									
	Øp1162	Øp11105	Øp11356	Øp113614	Øp114721	Øp1d6434	Øp1c6636	Øp1d6737	Øp1c6154	Øp1c6158
LLD6	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
LLD7	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LLD8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLD9	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
LLD10	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
LLC1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
LLC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLC3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
LLC4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LLC5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LLC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLC7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLC8	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
LLC9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLC10	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
LLC11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LLC12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLC13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLC14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLC15	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
LLC16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LLC17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLC18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Litik faj etkinliği (faj duyarlı)

- : Faj dirençli

LLD: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*

LLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*

Türkiye kökenli laktokok suşları ile bugüne kadar yürütülen çalışmalarda, bu araştırmada da belirlendiği gibi, yüksek düzeyde faj dirençlilik özelliği tespit edilmiştir. Endüstriyel starter kültür suşları ile yerli laktokok suşlarının karşılaştırıldığı araştırmalar da, bu çalışmalar ile paralellik göstermiştir. Tüm dünyada endüstriyel ortamlarda saptanan dominant fajlara karşı dirençlilik özelliği esas alınarak seçilen starter kültür suşları, Türkiye’ den izole edilen laktokok suşlarından daha yüksek faj duyarlılık fenotipine sahip bulunmuştur (Akçelik *et al.* 2000, Şanlıbaba ve Akçelik 2000, Tuncer and Akçelik 2002, Tükel *et al.* 2004, Şanlıbaba and Akçelik 2005). Türkiye kökenli laktokok suşlarının bu yüksek faj dirençlilik özelliği, endüstriyel starter kültür suşu geliştirme çalışmaları açısından büyük değer taşımaktadır. Söz konusu özelliğin moleküler genetik ve biyokimyasal doğasının değişik suşlarda tanımlanması, genetik modifikasyonlar yapılarak çok güçlü dirençlilik özelliklerine sahip bakterilerin düzenlenmesini beraberinde getirecektir. Diğer yandan bu suşlar kullanılarak yürütülecek faj-konakçı interaksiyonlarına yönelik çalışmalar, söz konusu interaksiyonların evrimine ışık tutacaktır. Gerek ülkemizde üretilen geleneksel fermente gıdaların kendine has yapısal ve aromatik özelliklerinin korunması ve gerekse ekonomik kayıpların en aza indirilmesi nedeni ile, kendi starter kültür sistemlerimizin oluşturulması zorunludur. Bunun için ilk adım, starter kültür olarak kullanılacak özelliklere sahip yerli bakteri suşlarının izolasyonu ve tanısıdır. Araştırmamızda kullanılan biyomateryal, bu yönde değerlendirilecek niteliklere sahiptir.

4.3. Biositlerin Laktokok Fajları Üzerine Etkisi

4.3.1. Etanol uygulaması

Laktokok fajlarının etanole duyarlılık düzeyleri; % 10, % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonda etanol uygulamaları sonucunda tespit edildi. % 10 etanol uygulamasında; 15, 30, 45 ve 60 dakika olmak üzere dört farklı inkübasyon süresi kullanıldı. Bu uygulama sürelerinin hiçbirinde, kontrol faj titrelerine göre anlamlı bir farklılık doğuracak faj inaktivasyonu meydana gelmedi. Uygulama süreleri sonunda tespit edilen faj titrelerinin kontrol faj titrelerine göre logaritmik değişimi (Log_{10}) (-) 0,19 ile (+) 0,40 arasında bulundu (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1). Etanol konsantrasyonu % 50 düzeyine çıkarıldığında, Øpll6636 ve Øplc6154 fajlarının, 1. dakika sonunda tamamen inaktif hale geldiği belirlendi. Bu konsantrasyonda devam edilen etil alkol uygulamasının 2. dakikası sonunda Øpll4721, Øplc6158 ve Øpll356, 3. dakikası sonunda Øpll105 ve Øpll3614 ve 4. dakikası sonunda ise Øpld6434 fajları, homolog konakçılara karşı litik aktivitelerini tamamen kaybetti.

Øpld6737 ve Øpll62 fajlarının titrelerinde, sırasıyla 4,60 ve 6,42 düzeyinde logaritmik azalmalar (Log_{10}) saptanmasına rağmen, bu konsantrasyondaki en yüksek uygulama süresi olan 5. dakika sonunda da homolog konakçılara karşı tam bir litik aktivite kaybı meydana gelmedi (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2). % 75 etanol uygulamasının 1. dakikası sonunda, denemede kullanılan 10 laktokok fajının tümünde homolog konakçılara karşı litik etkinlik tamamen kayboldu (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.3). Etanol uygulama konsantrasyonu % 100 oranına çıkarıldığında ise, yalnız Øpld6636 fajı 60 dakika sonunda tamamen inaktivasyona uğradı. Diğer laktokok fajlarının homolog konakçılara karşı belirlenen titrelerinde, inkübasyon sürelerine bağlı olarak, 2,99 ile 6,00 arasında logaritmik azalmalar (Log_{10}) tespit edildi (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.4).

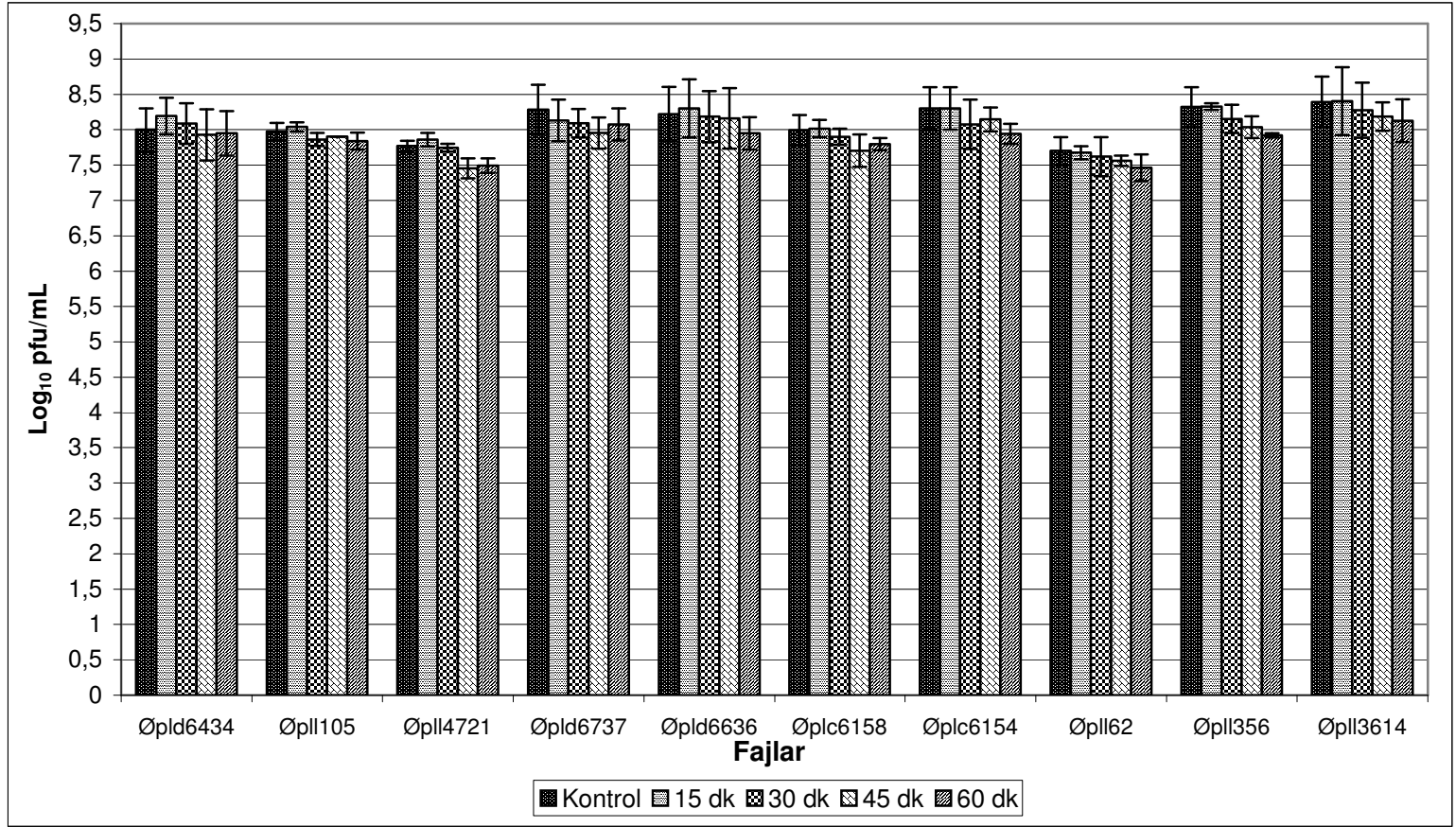
Klinik ve endüstriyel uygulamalarda, canlı ve alet-ekipman yüzeylerinin dezenfeksiyonu amacı ile kullanılan biyositler; geniş aktivite spektrumuna sahip olmaları, kısa zamanda ve düşük konsantrasyonda hedef biyosistemi ya da organizmayı inaktif hale getirmeleri, kolaylıkla nötralize edilebilmeleri, toksik etki içermemeleri, biyoyıkımlarının gerçekleşebilmesi, uygulanan ürün ya da yüzeylere düşük düzeyde zarar vermeleri, ucuz ve kolay bulunabilir olmaları gibi temel kriterler esas alınarak seçilmektedir (Quiberoni *et al.* 1999, Gilbert and McBain 2003, Capra *et al.* 2004). Bu temel seçim kriterleri doğrultusunda, endüstriyel gıda üretim birimlerinde yüzey dezenfeksiyonu amacı ile en geniş kullanım alanı bulan biyositler; etanol, izopropanol ve sodyum hipoklorittir. Kullanım amacı ve hedef organizmaya göre söz konusu biyositler tek tek ya da değişik konsantrasyonlarda hazırlanan kombinasyonları halinde uygulama alanı bulabilmektedir (Maillard 2001, Madera *et al.* 2004).

Alkollerin virüsler üzerinde etkilerinin araştırıldığı değişik çalışmalarda; zarflı virüslerin, lipit içeriklerinden dolayı, zarfsız virüslere göre bu organik çözücülere karşı daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Alkollerin antiviral etkinliğinde, kullanılan alkolün tipi ve konsantrasyonunun en önemli kriterler olduğu saptanmıştır (Gilbert and McBain 2003, Madera *et al.* 2004). Laktokoklar ve diğer laktik asit bakterilerinin fajları üzerinde yürütülen çalışmalarda etanolün, söz konusu fajlara karşı en yüksek etkinlik gösteren alkol olduğu belirlenmiştir. Ancak etanolün etkin uygulama konsantrasyonu, faj tipine göre farklılık göstermiştir. En etkin etanol konsantrasyonu, bazı faj tiplerinde % 75, bazı faj tiplerinde ise % 100 olarak tespit edilmiştir (Quiberoni *et al.* 1999, Maillard 2001, Suárez and Reinheimer 2002, Quiberoni *et al.* 2003, Capra *et al.* 2004, Maillard 2005).

Bu araştırmada, denenen 10 laktokok fajı için de en etkin etanol konsantrasyonu % 75 olarak saptandı. Yukarıda ifade edilen bazı literatür verilerinden farklı olarak % 100 etanol konsantrasyonunun Türkiye kökenli fajlara karşı etkinliğinde % 75 etanol konsantrasyonuna göre belirgin bir azalma meydana geldi. Laktokok fajlarının etanol ya da diğerk alkollerin uygulanması sonucu inaktivasyonu, zarf yapısı içermediklerinden dolayı, bu biyositlerin kapsit yapı üzerindeki etkinliklerinden kaynaklanmaktadır (Maillard 2005). Bu bilgi ışığında, etanol uygulama konsantrasyonlarına laktokok fajlarının farklı yanıt vermesinin, kapsit yapıyı oluşturan proteinlerin farklılığından ileri geldiğini söylemek olasıdır. Bu protein farklılıklarının tespiti ve söz konusu ilişkinin biyolojik esasının detaylı bir şekilde tanımlanması; fabrika ortamında sorun yaratan fajların inaktivasyonunda, yeni ve etkin çözümlerin bulunmasını beraberinde getirecektir.

Çizelge 4.3. % 10 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

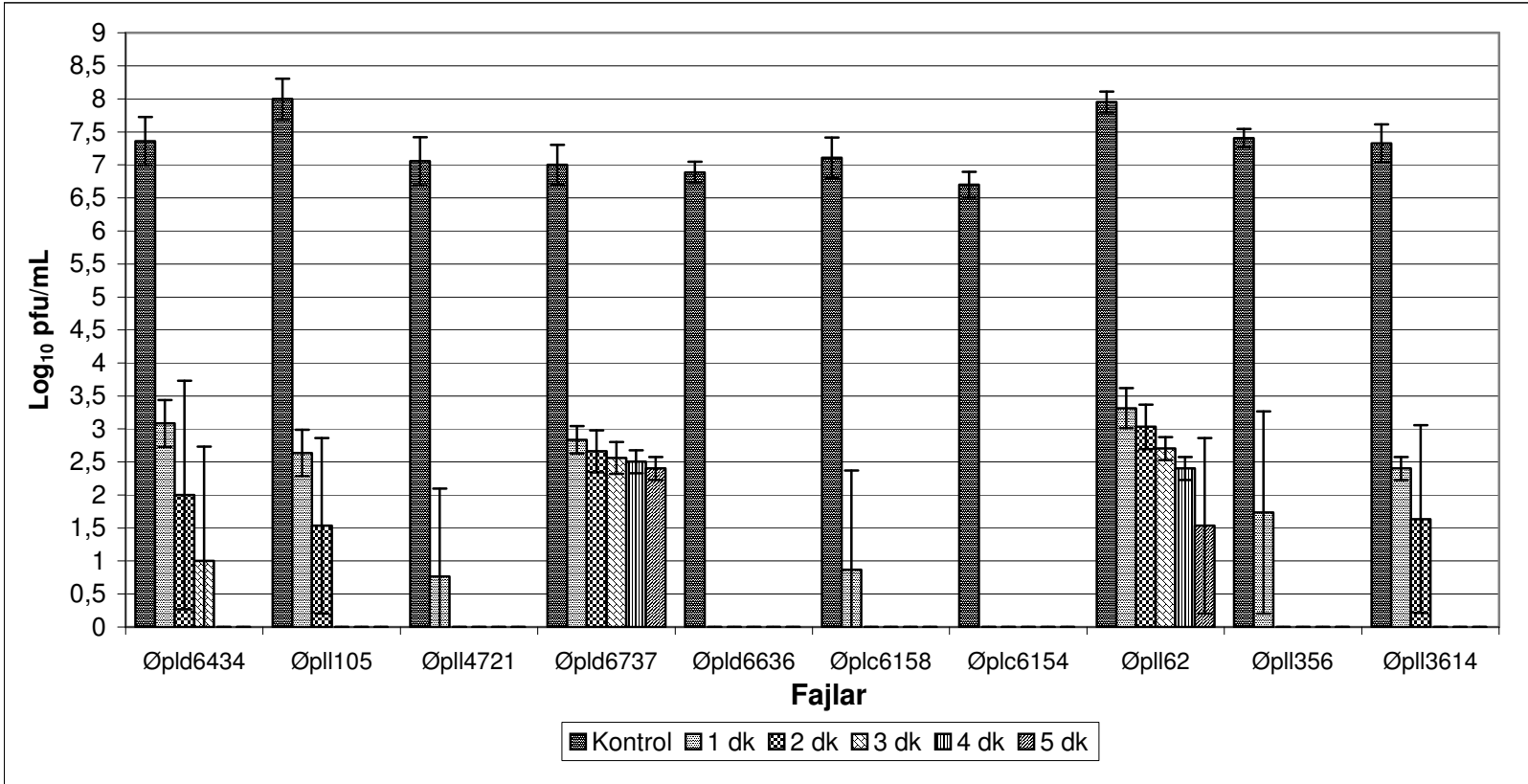
Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		% 10 Etanol (Log ₁₀ pfu/mL)							
			15 dk		30 dk		45 dk		60 dk	
Øpld6434	8,00	(±0,30)	8,19	(±0,26)	8,09	(±0,29)	7,93	(±0,36)	7,95	(±0,31)
Øpll105	7,97	(±0,12)	8,04	(±0,07)	7,86	(±0,09)	7,90	(±0,00)	7,84	(±0,12)
Øpll4721	7,77	(±0,07)	7,86	(±0,10)	7,75	(±0,06)	7,45	(±0,14)	7,49	(±0,10)
Øpld6737	8,28	(±0,35)	8,13	(±0,29)	8,09	(±0,20)	7,95	(±0,22)	8,08	(±0,23)
Øpld6636	8,22	(±0,38)	8,30	(±0,41)	8,19	(±0,36)	8,16	(±0,43)	7,95	(±0,23)
Øplc6158	7,99	(±0,21)	8,02	(±0,12)	7,90	(±0,11)	7,70	(±0,23)	7,80	(±0,08)
Øplc6154	8,30	(±0,30)	8,30	(±0,30)	8,08	(±0,35)	8,15	(±0,17)	7,94	(±0,14)
Øpll62	7,70	(±0,20)	7,67	(±0,09)	7,62	(±0,28)	7,56	(±0,07)	7,46	(±0,19)
Øpll356	8,32	(±0,28)	8,33	(±0,05)	8,15	(±0,20)	8,04	(±0,15)	7,92	(±0,03)
Øpll3614	8,39	(±0,36)	8,40	(±0,48)	8,28	(±0,39)	8,19	(±0,20)	8,13	(±0,30)



Şekil 4.1. % 10 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

Çizelge 4.4. % 50 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

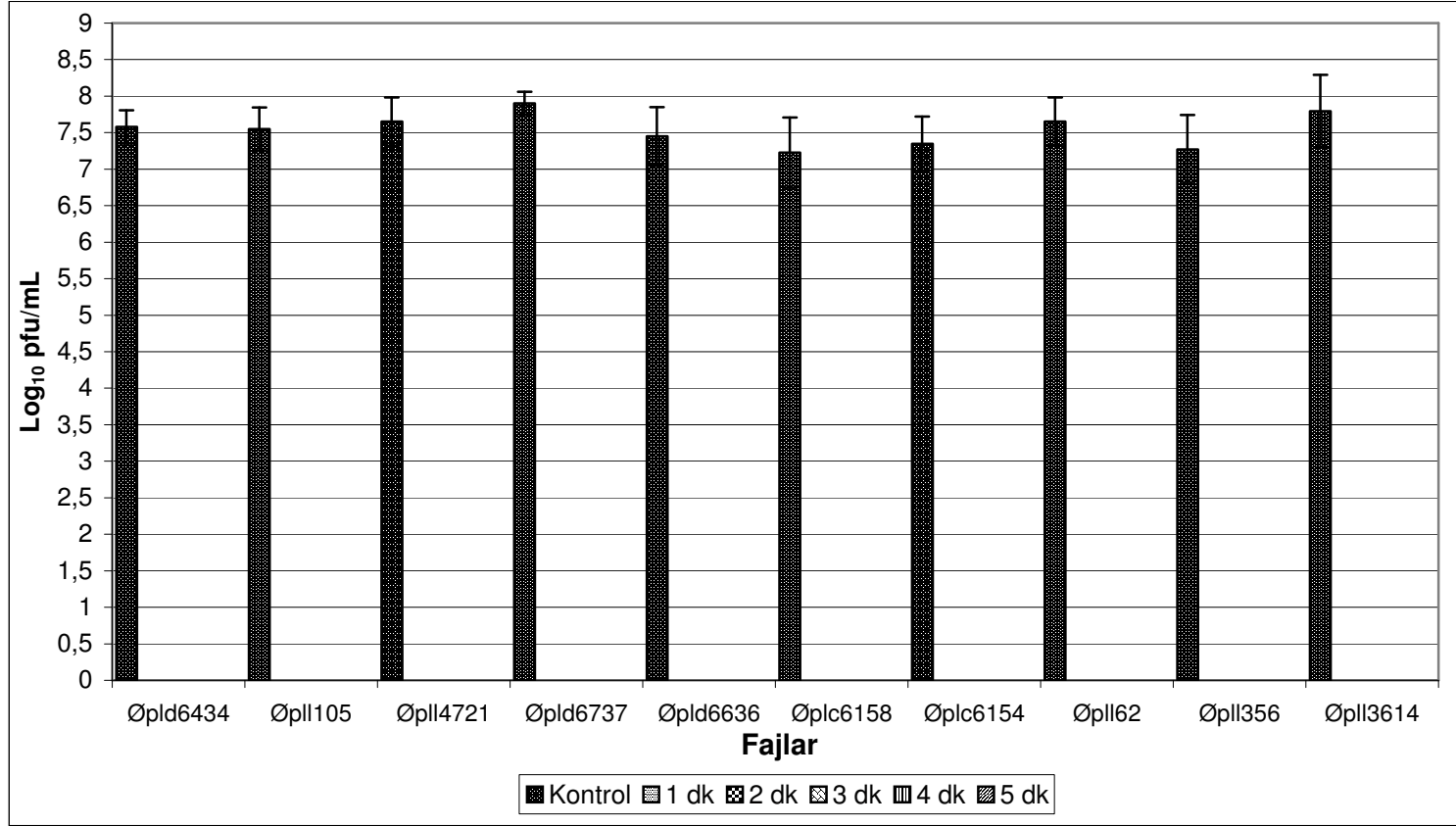
Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		% 50 Etanol (Log ₁₀ pfu/mL)									
			1 dk		2 dk		3 dk		4 dk		5 dk	
Øpld6434	7.36	(±0,37)	3,09	(±0,36)	2,00	(±1,73)	1,00	(±1,73)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll105	8,00	(±0,31)	2,63	(±0,35)	1,53	(±1,33)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll4721	7,06	(±0,36)	0,77	(±1,33)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpld6737	7,00	(±0,30)	2,84	(±0,21)	2,66	(±0,32)	2,56	(±0,24)	2,50	(±0,17)	2,40	(±0,17)
Øpld6636	6,88	(±0,16)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øplc6158	7,11	(±0,31)	0,87	(±1,50)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øplc6154	6,70	(±0,20)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll62	7,95	(±0,16)	3,32	(±0,31)	3,03	(±0,34)	2,70	(±0,17)	2,40	(±0,17)	1,53	(±1,33)
Øpll356	7,41	(±0,14)	1,73	(±1,53)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll3614	7,33	(±0,28)	2,40	(±0,17)	1,63	(±1,42)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)



Şekil 4.2. % 50 etanol uygulamasının laktokok fajlariinin inaktivasyonu üzerine etkisi

Çizelge 4.5. % 75 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

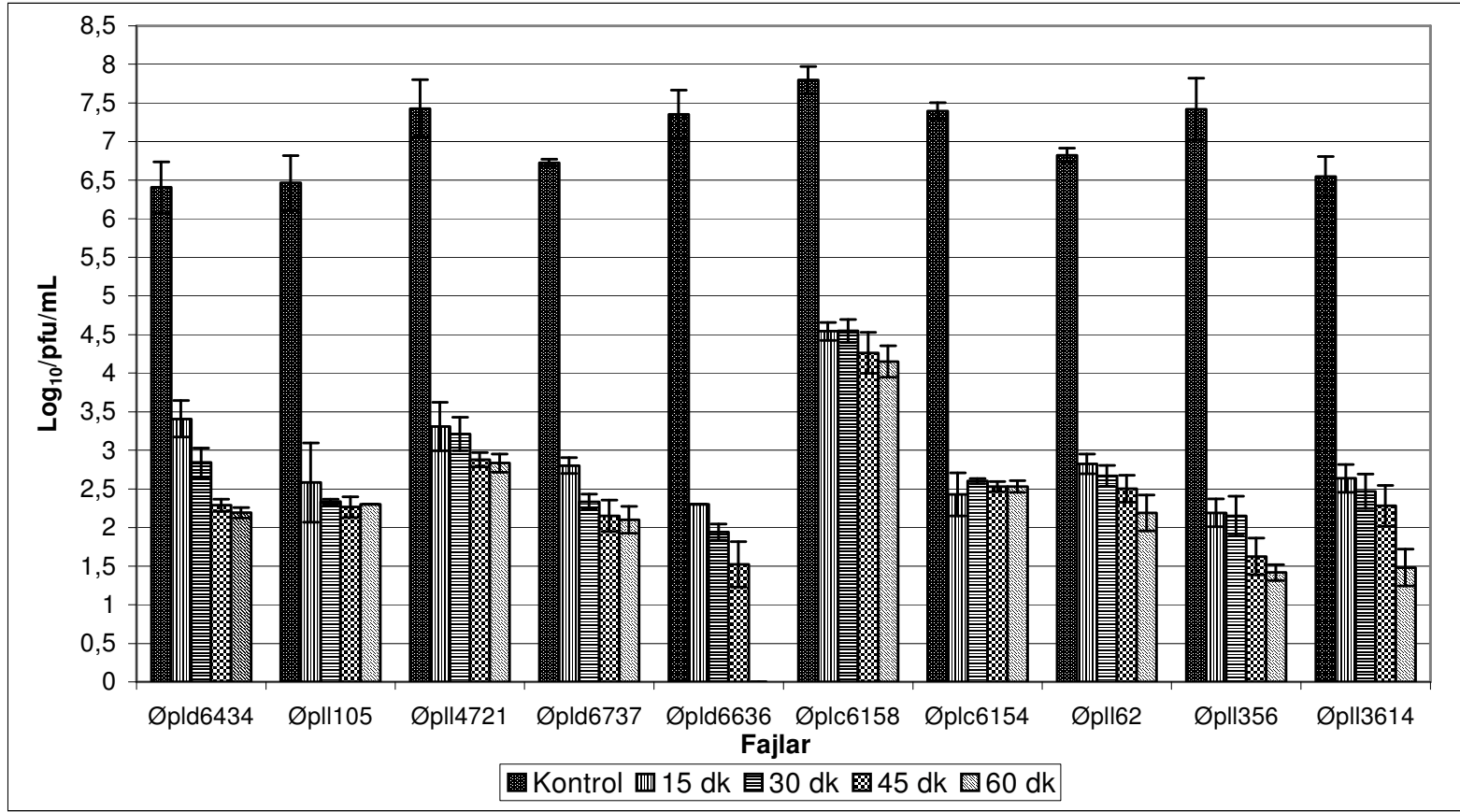
Faj Kod No.	Kontrol (Log₁₀ pfu/mL)		% 75 Etanol (Log₁₀ pfu/mL)	
			1 dk	
Øpld6434	7,58	(±0,23)	0,00	(±0,00)
Øpll105	7,55	(±0,29)	0,00	(±0,00)
Øpll4721	7,65	(±0,33)	0,00	(±0,00)
Øpld6737	7,90	(±0,16)	0,00	(±0,00)
Øpld6636	7,45	(±0,40)	0,00	(±0,00)
Øplc6158	7,23	(±0,48)	0,00	(±0,00)
Øplc6154	7,35	(±0,37)	0,00	(±0,00)
Øpll62	7,65	(±0,33)	0,00	(±0,00)
Øpll356	7,27	(±0,47)	0,00	(±0,00)
Øpll3614	7,79	(±0,50)	0,00	(±0,00)



Şekil 4.3. % 75 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

Çizelge 4.6. % 100 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		% 100 Etanol (Log ₁₀ pfu/mL)							
			15 dk		30 dk		45 dk		60 dk	
Øpld6434	6,41	(±0,33)	3,41	(±0,24)	2,84	(±0,19)	2,29	(±0,08)	2,19	(±0,07)
Øpll105	6,46	(±0,35)	2,58	(±0,51)	2,34	(±0,03)	2,27	(±0,13)	2,30	(±0,00)
Øpll4721	7,43	(±0,37)	3,31	(±0,31)	3,21	(±0,22)	2,88	(±0,09)	2,84	(±0,12)
Øpld6737	6,73	(±0,05)	2,80	(±0,10)	2,33	(±0,10)	2,15	(±0,20)	2,10	(±0,17)
Øpld6636	7,35	(±0,32)	2,30	(±0,00)	1,94	(±0,10)	1,52	(±0,29)	0,00	(±0,00)
Øplc6158	7,80	(±0,17)	4,54	(±0,12)	4,55	(±0,15)	4,26	(±0,27)	4,15	(±0,20)
Øplc6154	7,39	(±0,11)	2,43	(±0,28)	2,60	(±0,03)	2,53	(±0,07)	2,53	(±0,08)
Øpll62	6,82	(±0,09)	2,82	(±0,13)	2,67	(±0,14)	2,50	(±0,17)	2,19	(±0,23)
Øpll356	7,42	(±0,40)	2,19	(±0,18)	2,15	(±0,26)	1,63	(±0,24)	1,42	(±0,10)
Øpll3614	6,55	(±0,26)	2,64	(±0,18)	2,47	(±0,22)	2,28	(±0,27)	1,48	(±0,24)



Şekil 4.4. % 100 etanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

4.3.2. İzopropanol uygulaması

İzopropanol uygulamasında da, etanol uygulamasında olduğu gibi, dört farklı biyosit konsantrasyonunun (% 10, % 50, % 75 ve % 100) laktokok fajlarına karşı etkinliği tespit edildi. Denemede kullanılan ilk konsantrasyonda (% 10); 15, 30, 45 ve 60 dakika uygulama süreleri sonunda, kontrol faj titreleri ile, uygulamaya tabi tutulan fajların titreleri arasında (-) 0,15 ile (+) 0,19 düzeylerinde logaritmik değişimler (Log_{10}) saptandı. Bu küçük farklılıklar, biyosit konsantrasyonundan bağımsız rastgele farklılıklardır (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.5). İzopropanol konsantrasyonu % 50 düzeyine çıkarıldığında; uygulamanın 15. dakikası sonunda Øplc6158 ve Øpll3614, 20. dakikası sonunda da Øpld6737 ve Øplc6154 fajlarının tamamen inaktive olduğu saptandı. Diğer 6 laktokok fajında, uygulama süresine bağlı olarak, kontrol faj titrelerine oranla 1,76-7,10 arasında logaritmik azalmalar (Log_{10}) meydana geldi (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.6). % 75 izopropanol uygulamasında, deneme sürelerine bağlı olarak (1 dk, 5 dk ve 10 dk) laktokok fajlarının titrelerinde giderek artan oranlarda düşmeler meydana geldi ve 15. dakika sonunda Øpld6434 ile Øpll356 fajları dışında kalan 8 faj tamamen inaktive oldu. Bu süre sonunda da litik aktivitesini sürdüren Øpld6434 fajı için 6,63 ve Øpll356 fajı için de 6,98 düzeyinde titre azalması (Log_{10}) tespit edildi (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.7). Son izopropanol konsantrasyonunda (% 100), yine uygulama süresine bağlı olarak, artan oranlarda faj titresini düşmeleri (1,50-3,54, Log_{10}) meydana geldi. Bu konsantrasyonda uygulanan inkübasyon sürelerinde (15, 30, 45 ve 60 dk), hiçbir laktokok fajı homolog konakçısına karşı tam aktivite kaybına uğramadı (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.8).

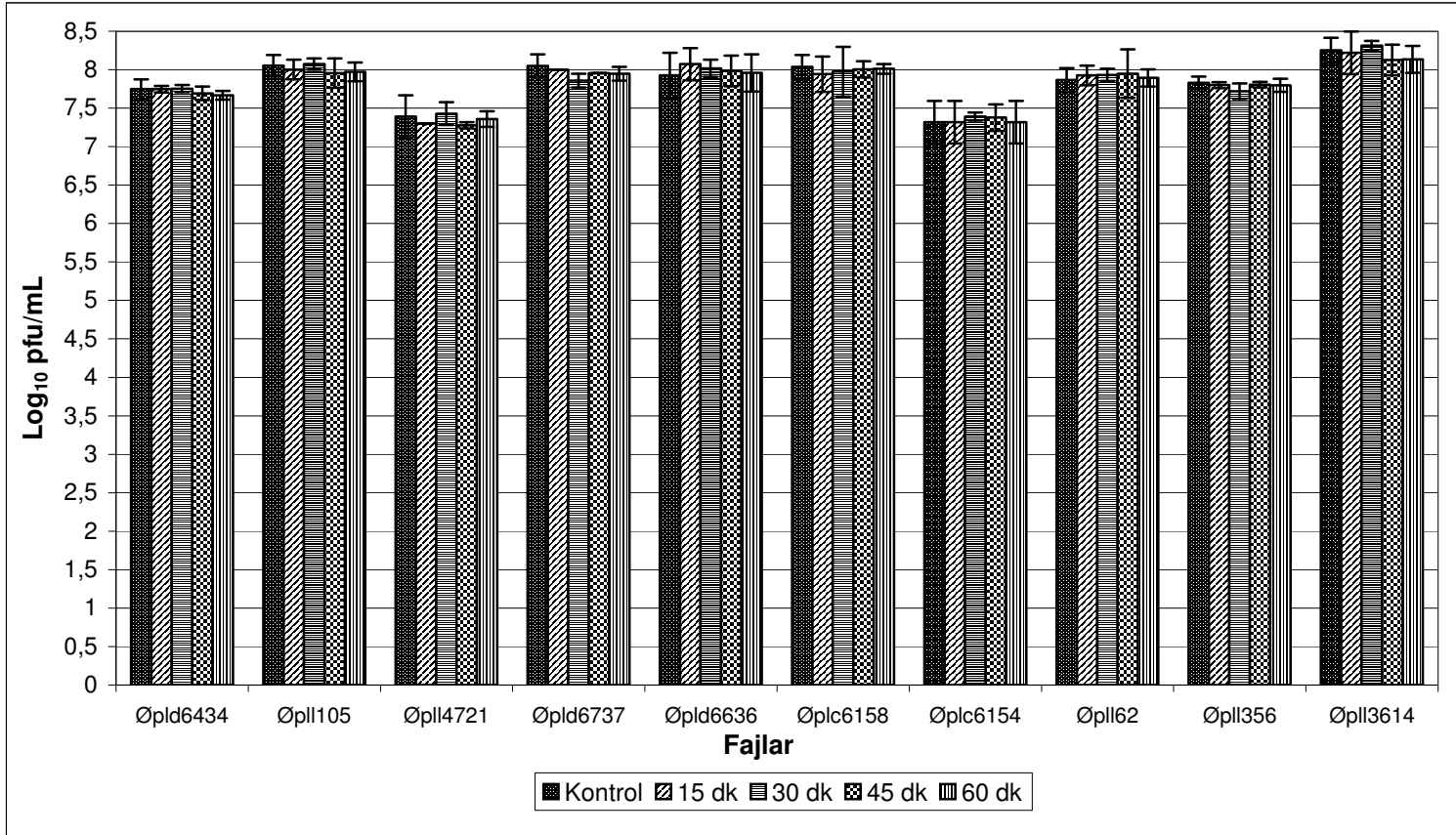
Biyositlerin antiviral ve antibakteriyel aktiviteleri üzerinde yürütülen araştırmalarda; izopropanolün bakterilere karşı, etanolün ise virüslere karşı daha etkin ajanlar olduğu belirlenmiştir. Bunun; izopropanolün, etanolden daha yüksek lipofilik etki içermesinden kaynaklandığı, izopropanolün zarf yapısı içeren belirli virüs gruplarına karşı yüksek antiviral aktivitesi tanımlanarak, doğrulanmıştır. Etanol ise, hidrofilik özellikte ve zarf içermeyen virüslere karşı daima izopropanolden daha yüksek etkinlikte bulunmuştur. Özetle, izopropanol lipid yapılara, etanol de protein yapılara karşı yüksek aktivite gösteren biyositlerdir (McDonnell and Russell 1999, Thompson and Yates 1999, Gilbert and McBain 2003). Laktik asit bakterilerinin fajları ile yürütülen faj inaktivasyon çalışmalarının tümünde izopropanol, etanolden çok daha düşük etkinlikte tespit edilmiştir. Genellikle izopropanol çok yüksek konsantrasyonlarda bile laktokok fajlarını inaktive edememektedir (Quiberoni *et al.* 1999, Suárez and Reinheimer 2002, Quiberoni *et al.* 2003, Capra *et al.* 2004). Bu araştırmadan elde edilen veriler de, literatür verileri ile paralel bir şekilde, izopropanolün

laktokok fajlarının inaktivasyonunda kullanılabilecek etkin bir biyosit olmadığına işaret etmektedir. Laktokok fajlarının lipit içeriği yüksek zarf yapısı içermemesi (Vegge *et al.* 2005) izopropanole dirençliliğin temel nedenidir.

Etanolün yüksek antiviral ve izopropanolün de yüksek antibakteriyel aktiviteleri nedeni ile, gıda üretim birimlerinde yüzey dezenfeksiyonunda etanol/izopropanol karışımlarının kullanımı önerilmektedir (Quiberoni *et al.* 2003, Vieira *et al.* 2005). Böyle bir uygulama tercih edilmesi durumunda, ülkemiz koşulları için bu çalışmada belirlenen etkin antifaj etanol konsantrasyonu (% 75) ile uyumlu antibakteriyel etkinliği yüksek izopropanol oranının tespit edilmesi gerekmektedir.

Çizelge 4.7. % 10 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

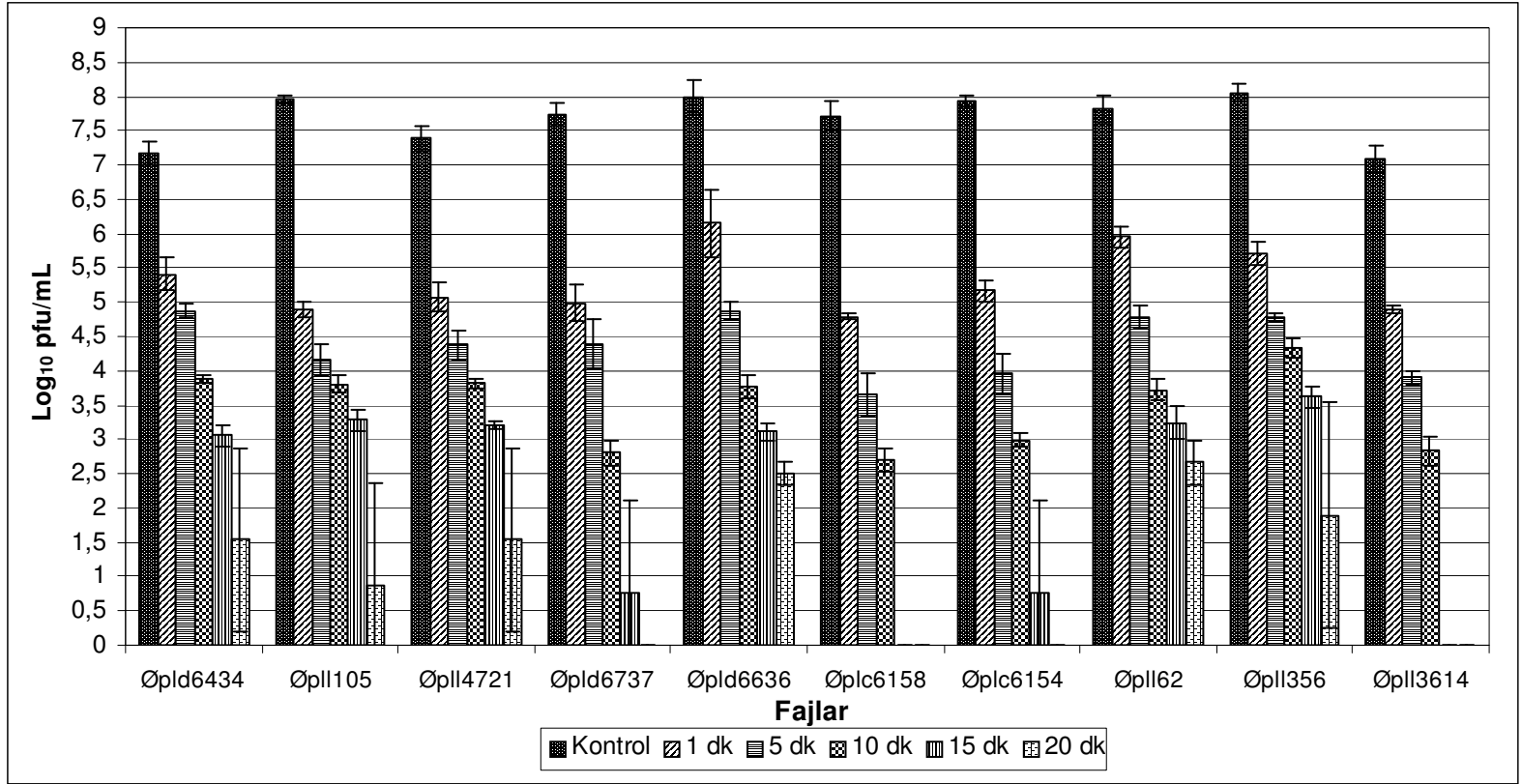
Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		% 10 İzopropanol (Log ₁₀ pfu/mL)							
			15 dk		30 dk		45 dk		60 dk	
Øpld6434	7,75	(±0,13)	7,75	(±0,04)	7,75	(±0,05)	7,69	(±0,09)	7,67	(±0,06)
Øpll105	8,05	(±0,14)	8,00	(±0,13)	8,08	(±0,07)	7,96	(±0,19)	7,97	(±0,12)
Øpll4721	7,39	(±0,27)	7,30	(±0,00)	7,43	(±0,15)	7,28	(±0,04)	7,36	(±0,10)
Øpld6737	8,05	(±0,15)	8,00	(±0,00)	7,86	(±0,09)	7,95	(±0,00)	7,95	(±0,09)
Øpld6636	7,93	(±0,29)	8,07	(±0,21)	8,02	(±0,11)	7,98	(±0,20)	7,96	(±0,24)
Øplc6158	8,04	(±0,15)	7,94	(±0,23)	7,97	(±0,32)	8,01	(±0,11)	8,01	(±0,06)
Øplc6154	7,32	(±0,28)	7,32	(±0,28)	7,39	(±0,05)	7,38	(±0,17)	7,32	(±0,28)
Øpll62	7,87	(±0,15)	7,93	(±0,13)	7,93	(±0,08)	7,95	(±0,31)	7,89	(±0,11)
Øpll356	7,83	(±0,08)	7,80	(±0,04)	7,72	(±0,10)	7,81	(±0,04)	7,80	(±0,08)
Øpll3614	8,25	(±0,16)	8,22	(±0,28)	8,31	(±0,06)	8,13	(±0,20)	8,13	(±0,17)



Şekil 4.5. % 10 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

Çizelge 4.8. % 50 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

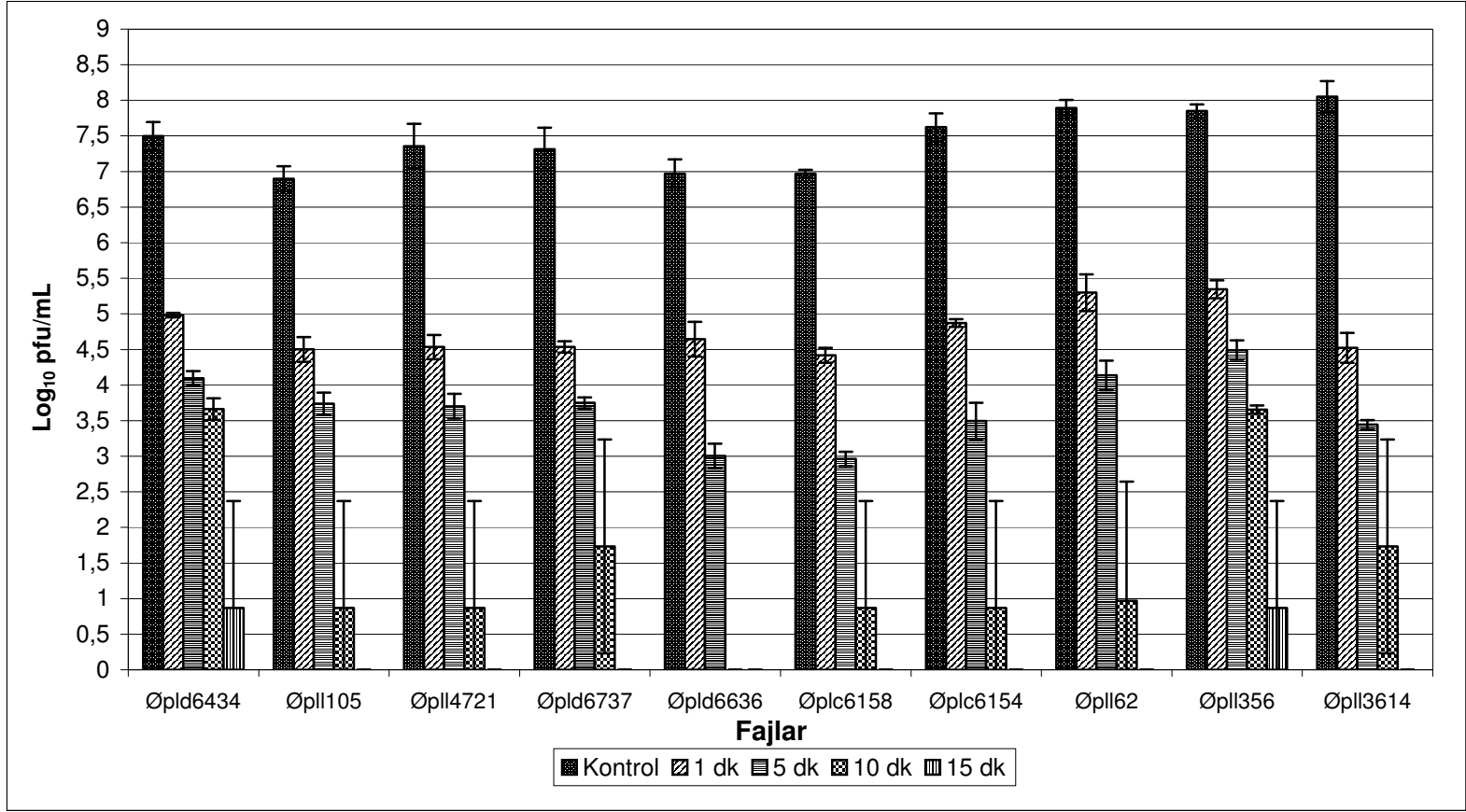
Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		% 50 İzopropanol (Log ₁₀ pfu/mL)									
			1 dk		5 dk		10 dk		15 dk		20 dk	
Øpld6434	7,17	(±0,16)	5,41	(±0,24)	4,88	(±0,09)	3,89	(±0,05)	3,06	(±0,15)	1,53	(±1,33)
Øpll105	7,97	(±0,06)	4,90	(±0,10)	4,16	(±0,22)	3,81	(±0,14)	3,28	(±0,15)	0,87	(±1,50)
Øpll4721	7,39	(±0,18)	5,08	(±0,20)	4,37	(±0,20)	3,81	(±0,07)	3,20	(±0,05)	1,53	(±1,33)
Øpld6737	7,74	(±0,17)	4,99	(±0,27)	4,38	(±0,37)	2,80	(±0,17)	0,77	(±1,33)	0,00	(±0,00)
Øpld6636	8,00	(±0,26)	6,15	(±0,48)	4,88	(±0,14)	3,77	(±0,18)	3,11	(±0,13)	2,50	(±0,17)
Øplc6158	7,72	(±0,22)	4,79	(±0,05)	3,66	(±0,32)	2,70	(±0,17)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øplc6154	7,92	(±0,08)	5,17	(±0,15)	3,96	(±0,29)	2,99	(±0,09)	0,77	(±1,33)	0,00	(±0,00)
Øpll62	7,81	(±0,20)	5,95	(±0,16)	4,79	(±0,17)	3,73	(±0,15)	3,24	(±0,24)	2,66	(±0,32)
Øpll356	8,05	(±0,13)	5,71	(±0,16)	4,79	(±0,06)	4,33	(±0,14)	3,62	(±0,15)	1,89	(±1,64)
Øpll3614	7,09	(±0,19)	4,90	(±0,05)	3,90	(±0,10)	2,84	(±0,21)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)



Şekil 4.6. % 50 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

Cizelge 4.9. % 75 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

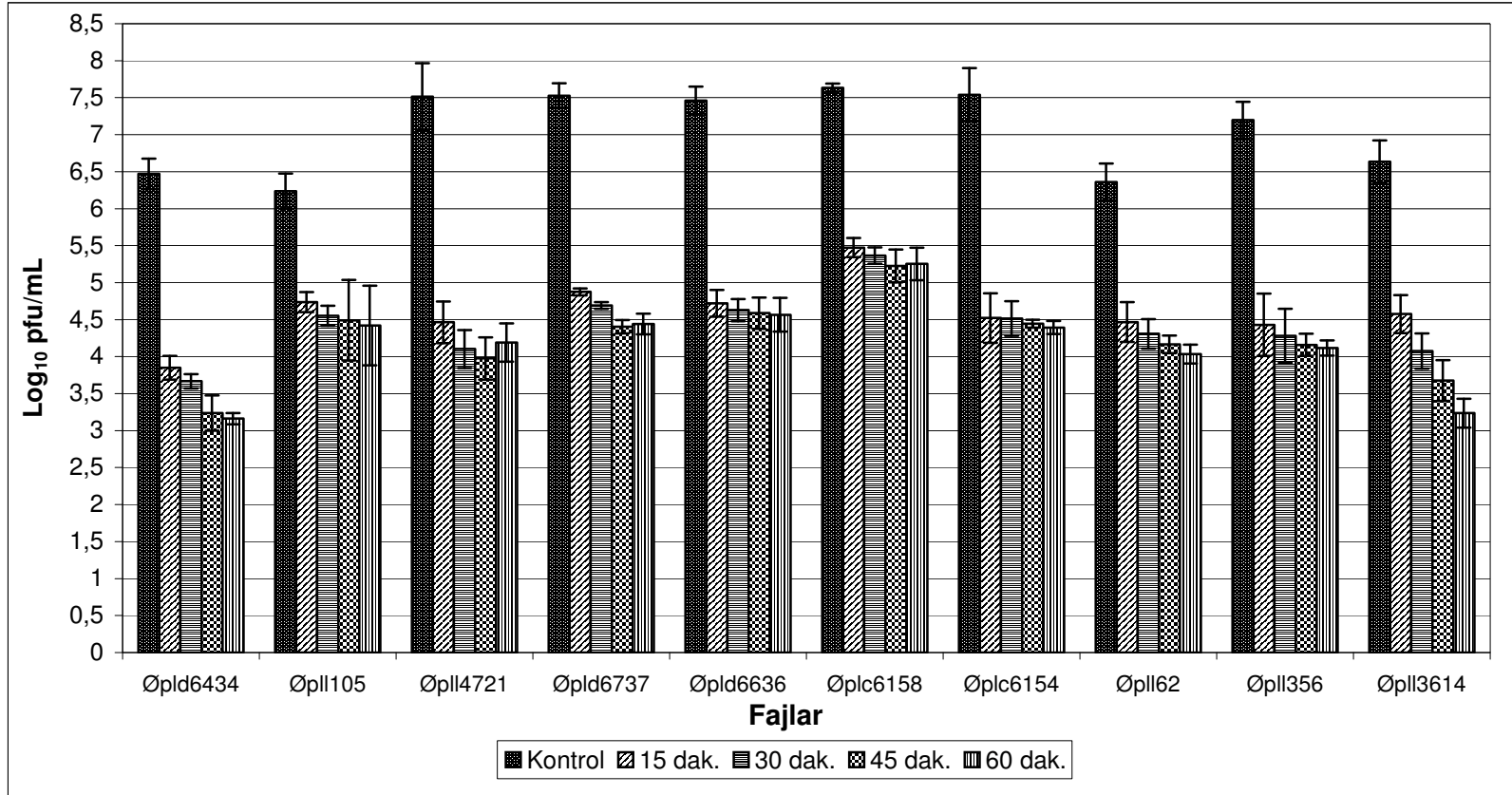
Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		% 75 İzopropanol (Log ₁₀ pfu/mL)							
			1 dk		5 dk		10 dk		15 dk	
Øpld6434	7,50	(±0,20)	4,98	(±0,03)	4,09	(±0,10)	3,66	(±0,15)	0,87	(±1,50)
Øpll105	6,90	(±0,17)	4,50	(±0,17)	3,74	(±0,15)	0,87	(±1,50)	0,00	(±0,00)
Øpll4721	7,35	(±0,32)	4,53	(±0,17)	3,70	(±0,17)	0,87	(±1,50)	0,00	(±0,00)
Øpld6737	7,31	(±0,30)	4,54	(±0,08)	3,75	(±0,08)	1,73	(±1,50)	0,00	(±0,00)
Øpld6636	6,97	(±0,20)	4,65	(±0,24)	3,00	(±0,17)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øplc6158	6,97	(±0,06)	4,42	(±0,11)	2,96	(±0,10)	0,87	(±1,50)	0,00	(±0,00)
Øplc6154	7,62	(±0,20)	4,87	(±0,06)	3,50	(±0,26)	0,87	(±1,50)	0,00	(±0,00)
Øpll62	7,89	(±0,11)	5,30	(±0,26)	4,14	(±0,21)	0,97	(±1,68)	0,00	(±0,00)
Øpll356	7,85	(±0,09)	5,34	(±0,13)	4,49	(±0,14)	3,65	(±0,06)	0,87	(±1,50)
Øpll3614	8,05	(±0,22)	4,52	(±0,21)	3,44	(±0,06)	1,73	(±1,50)	0,00	(±0,00)



Şekil 4.7. % 75 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

Çizelge 4.10. % 100 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		% 100 İzopropanol (Log ₁₀ pfu/mL)							
			15 dk.		30 dk.		45 dk.		60 dk.	
Øpld6434	6,47	(±0,20)	3,85	(±0,16)	3,67	(±0,10)	3,24	(±0,24)	3,16	(±0,08)
Øpll105	6,24	(±0,24)	4,74	(±0,14)	4,55	(±0,14)	4,49	(±0,54)	4,42	(±0,54)
Øpll4721	7,51	(±0,45)	4,46	(±0,28)	4,10	(±0,26)	3,97	(±0,28)	4,19	(±0,26)
Øpld6737	7,53	(±0,17)	4,88	(±0,05)	4,69	(±0,04)	4,40	(±0,09)	4,44	(±0,14)
Øpld6636	7,46	(±0,19)	4,72	(±0,18)	4,63	(±0,15)	4,59	(±0,21)	4,57	(±0,23)
Øplc6158	7,63	(±0,06)	5,47	(±0,13)	5,36	(±0,11)	5,23	(±0,22)	5,25	(±0,22)
Øplc6154	7,54	(±0,36)	4,52	(±0,34)	4,51	(±0,23)	4,44	(±0,05)	4,39	(±0,09)
Øpll62	6,36	(±0,25)	4,47	(±0,27)	4,31	(±0,20)	4,16	(±0,12)	4,04	(±0,13)
Øpll356	7,20	(±0,25)	4,43	(±0,42)	4,28	(±0,37)	4,16	(±0,15)	4,12	(±0,10)
Øpll3614	6,63	(±0,29)	4,58	(±0,26)	4,07	(±0,24)	3,68	(±0,28)	3,24	(±0,19)



Şekil 4.8. % 100 izopropanol uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

4.3.3. Sodyum hipoklorit uygulaması

Laktokok fajlarına karşı etkinliği denenmiş son biyosit olan sodyum hipoklorit için; 2000, 3000, 4000, 5000 ppm olmak üzere, 4 farklı uygulama konsantrasyonu kullanıldı. En düşük hipoklorit konsantrasyonu (2000 ppm); 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45 dakika sürelerle laktokok fajlarına denendi. Bu testte, Øplc6154 fajı en kısa sürede (15 dk) inaktivasyonu gerçekleşen faj olarak belirlendi. Uygulamanın 20. dakikası sonunda Øpll356, 25. dakikası sonunda Øpll6434 ve Øpld6636, 30. dakikası sonunda Øpll62 ve Øpll3614, 40. dakikası sonunda Øpll4721, Øpll6737 ve Øplc6158 ve 45. dakikası sonunda da Øpll105 fajının, homolog konakçı suşlarına karşı litik aktivitelerini tamamen kaybettiği tespit edildi (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.9). 3000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasında da, diğer etkin biyosit uygulamalarında olduğu gibi, zamanın artışı ile doğru orantılı olarak faj titrelerindeki düşmeler artmıştır. Bu konsantrasyonda; 15. dakika sonunda Øpld6434 ve Øplc6154, 20. dakika sonunda Øpll62, Øpll356 ve Øpll3614, 25. dakika sonunda Øpll105, Øpld6636 ve Øplc6158, 30. dakika sonunda da Øpll4721 ve Øpld6737 fajlarının homolog konakçı suşlarına karşı litik etkinliklerini tamamen kaybettiği belirlendi (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.10). 4000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasında, ilk tam faj inaktivasyonunun meydana geldiği süre 10 dakika olarak tespit edildi. Bu süre sonunda Øpld6434, Øplc6154, Øpll62, Øpll356 ve Øpll3614 fajlarının litik etkinliklerinin tamamen ortadan kalktığı saptandı. Kalan beş laktokok fajından Øpll6636'nın 15 dakika sonunda ve Øpll105, Øpll4721, Øpld6737 ve Øplc6158'in de 20. dakika sonunda tamamen inaktive olduğu belirlendi (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.11). Denemede kullanılan son sodyum hipoklorit konsantrasyonunda ise (5000 ppm); 5. dakika sonunda Øplc6158, Øplc6154, Øpll356 ve Øpll3614, 10. dakika sonunda Øpld6434, Øpld6636 ve Øpll62, 15. dakika sonunda da Øpll105, Øpll4721 ve Øpld6737 fajlarının tam inaktivasyonları gerçekleşti (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.12).

Sodyum hipoklorit gibi klorlu bileşikler; su, atık su ve gıda üretim birimlerinde yüzeylerin sanitasyonunda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sodyum hipokloritin antimikrobiyel etkinliğinin esası; organik çözücü olarak davranması, amino asitleri nötralize ederek protein yapısını bozması ve nihayet nükleik asitler üzerinde geri dönüşsüz bozulmalara neden olmasından kaynaklanmaktadır. Farklı mikroorganizma grupları yanında, farklı virüslere karşı da sodyum hipokloritin etkin konsantrasyonunun sabit olmadığı saptanmıştır. Biyosit uygulamasının hedef dışı etkinliğini en az düzeye indirmek için, hedefe karşı en yüksek aktiviteyi gösteren kritik konsantrasyonun tespiti esastır (Estrela *et al.* 2002, Li *et al.* 2002, Durán *et al.* 2003, Estrela *et al.* 2003, Virto *et al.* 2004).

Laktik asit bakterilerinin fajları üzerinde yürütülen çalışmalarda; *Streptococcus thermophilus* fajlarının inhibisyonu için ideal sodyum hipoklorit konsantrasyonu 200-300 ppm olarak tespit edilirken, bu düzey *L. lactis* fajları için bazı istisnalara rağmen 100-300 ppm, *Lactobacillus delbrueckii* fajları için ise 1200 ppm düzeyinde belirlenmiştir (Binetti and Reinheimer 2000, Suárez and Reinheimer 2002, Capra *et al.* 2004, Maillard 2005). Bu literatür verileri ile kıyaslandığında, Türkiye kökenli laktokok fajlarının, sodyum hipoklorite karşı oldukça yüksek düzeyde direnç özelliğine sahip olduğu (tüm fajların tam inaktivasyonu için minimum düzey 2000 ppm, 45 dk) ortaya çıkmaktadır.

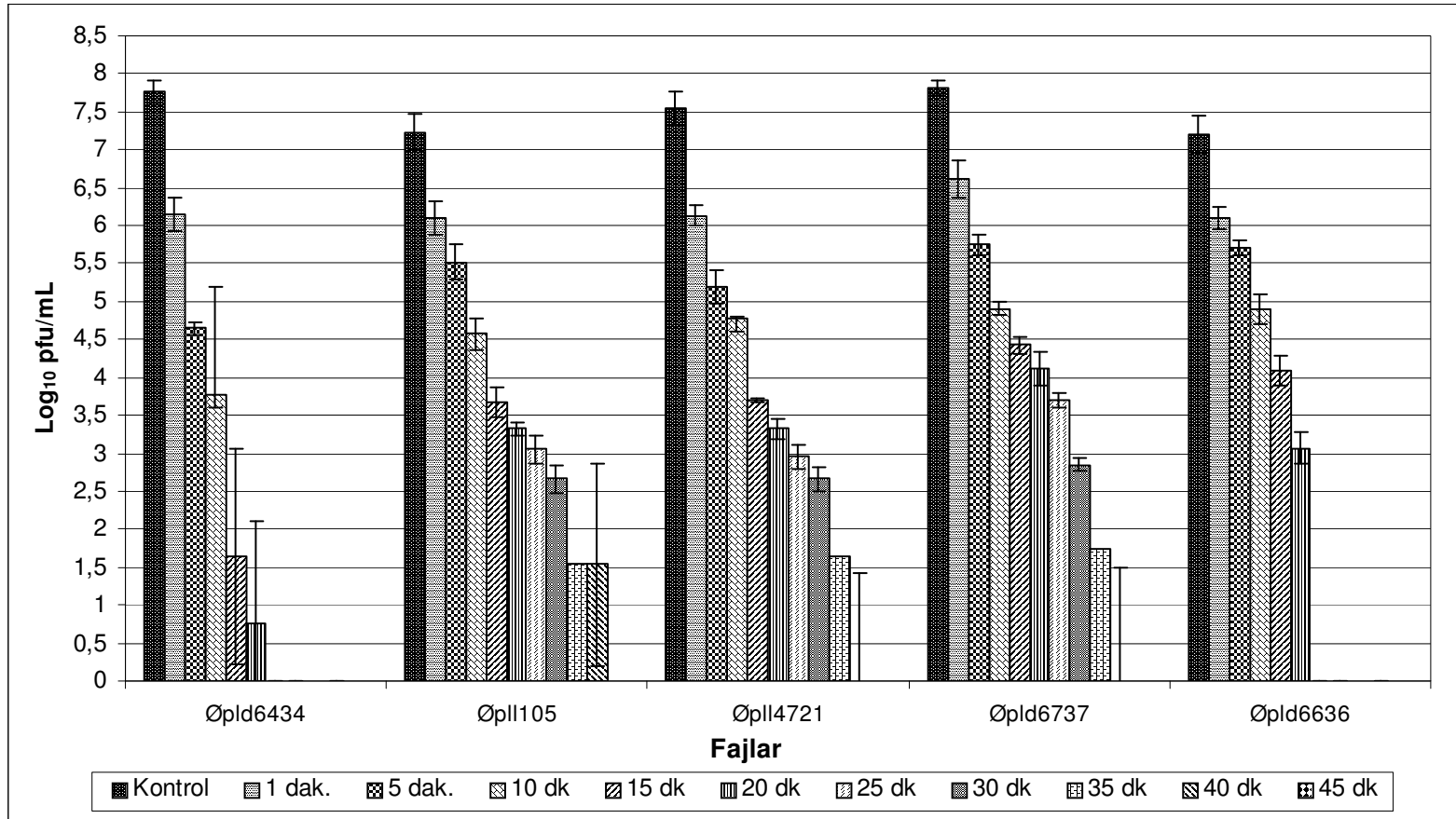
Tam faj inaktivasyonu için yüksek düzeyde sodyum hipoklorit kullanım zorunluluğu yanında, uygulama süresinin de oldukça uzun olması gerekmektedir. Bu durumda, söz konusu biyositin ortamda kalıcılığı ve yüzeylere zarar verme olasılığı artacaktır. Bu sakıncalar nedeniyle sodyum hipokloriti, özellikle laktokok fajları için endüstriyel bir mücadele ajanı olarak önermemekteyiz.

Çizelge 4.11. 2000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

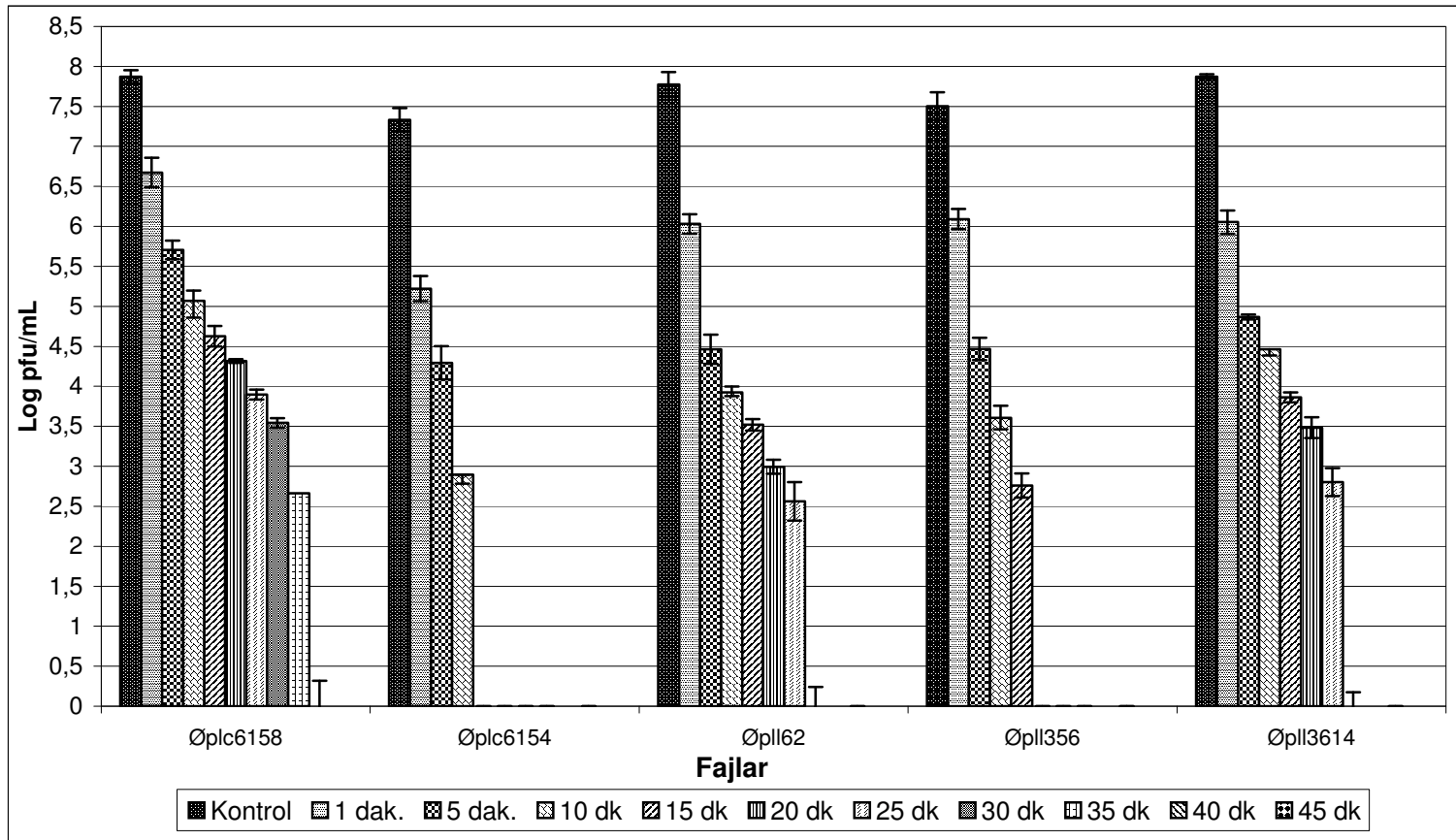
Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		2000 ppm Sodyum Hipoklorit (Log ₁₀ pfu/mL)							
			1 dk.		5 dk.		10 dk		15 dk	
Øpld6434	7,76	(±0,15)	6,14	(±0,22)	4,65	(±0,09)	3,76	(±0,15)	1,63	(±1,42)
Øpll105	7,24	(±0,24)	6,11	(±0,22)	5,52	(±0,23)	4,57	(±0,20)	3,68	(±0,20)
Øpll4721	7,54	(±0,21)	6,13	(±0,13)	5,20	(±0,23)	4,77	(±0,17)	3,70	(±0,03)
Øpld6737	7,81	(±0,10)	6,61	(±0,24)	5,75	(±0,13)	4,89	(±0,07)	4,43	(±0,11)
Øpld6636	7,21	(±0,24)	6,11	(±0,15)	5,71	(±0,10)	4,89	(±0,19)	4,09	(±0,20)
Øplc6158	7,87	(±0,08)	6,67	(±0,19)	5,71	(±0,12)	5,07	(±0,21)	4,63	(±0,13)
Øplc6154	7,33	(±0,15)	5,22	(±0,16)	4,29	(±0,21)	2,89	(±0,11)	0,00	(±0,00)
Øpll62	7,77	(±0,16)	6,03	(±0,12)	4,46	(±0,18)	3,93	(±0,05)	3,52	(±0,07)
Øpll356	7,50	(±0,17)	6,09	(±0,13)	4,47	(±0,14)	3,61	(±0,15)	2,76	(±0,15)
Øpll3614	7,87	(±0,03)	6,05	(±0,15)	4,87	(±0,03)	4,46	(±0,08)	3,86	(±0,06)

Çizelge 4.11. devam

Faj Kod No.	2000 ppm Sodyum Hipoklorit (Log ₁₀ pfu/mL)											
	20 dk		25 dk		30 dk		35 dk		40 dk		45 dk	
Øpld6434	0,77	(+1,33)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll105	3,32	(±0,08)	3,05	(±0,18)	2,66	(±0,10)	1,53	(±1,33)	1,53	(±1,33)	0,00	(±0,00)
Øpll4721	3,33	(+0,14)	2,95	(±0,16)	2,66	(±0,32)	1,63	(±1,42)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpld6737	4,11	(+0,22)	3,70	(±0,09)	2,85	(±0,22)	1,73	(±1,50)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpld6636	3,07	(+0,21)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øplc6158	4,31	(±0,02)	3,90	(±0,06)	3,54	(±0,14)	2,66	(±0,32)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øplc6154	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll62	2,99	(±0,09)	2,56	(±0,24)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll356	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll3614	3,48	(±0,13)	2,80	(±0,17)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)



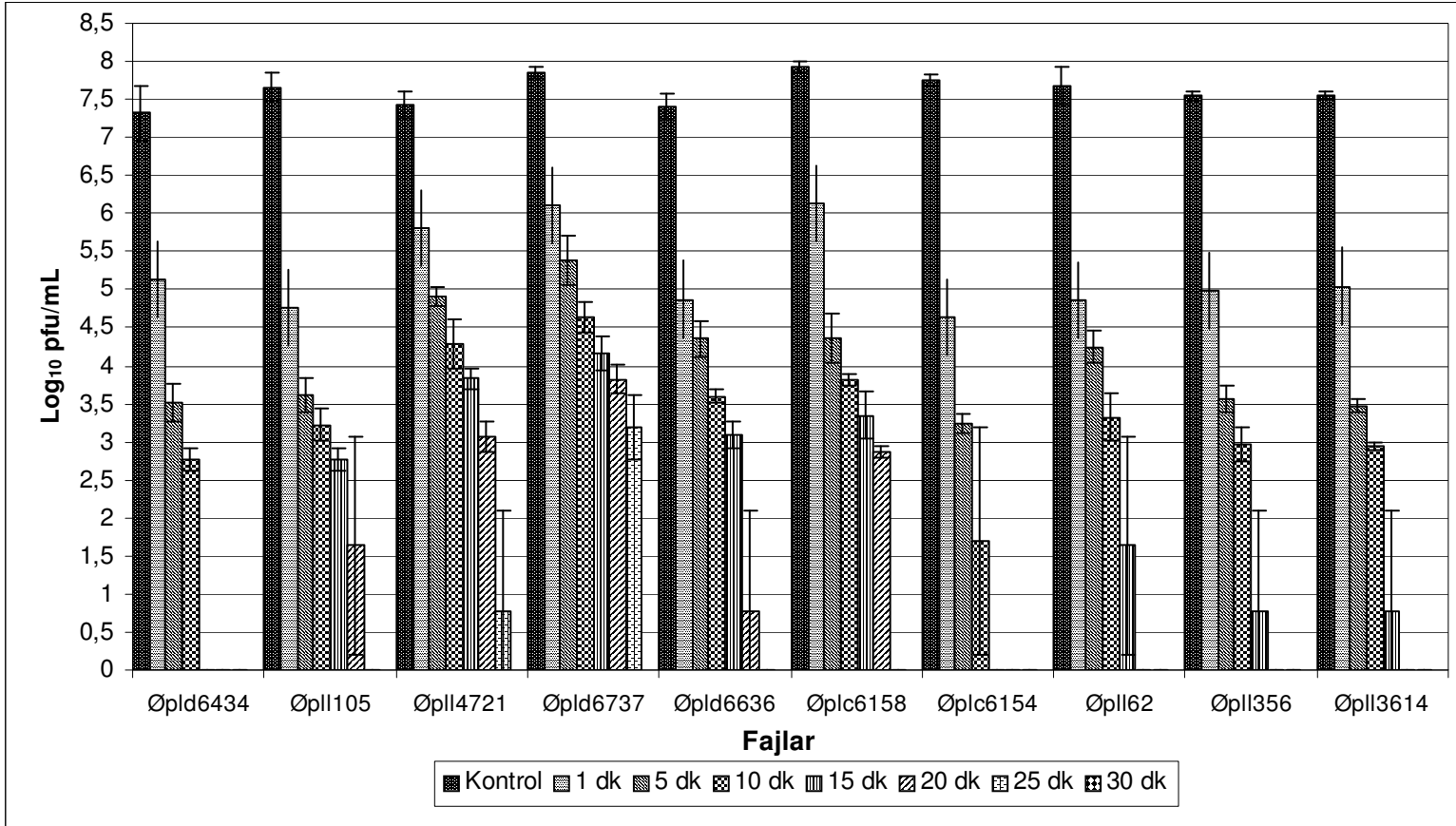
Şekil 4.9. 2000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi



Şekil 4.9. (devam)

Çizelge 4.12. 3000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

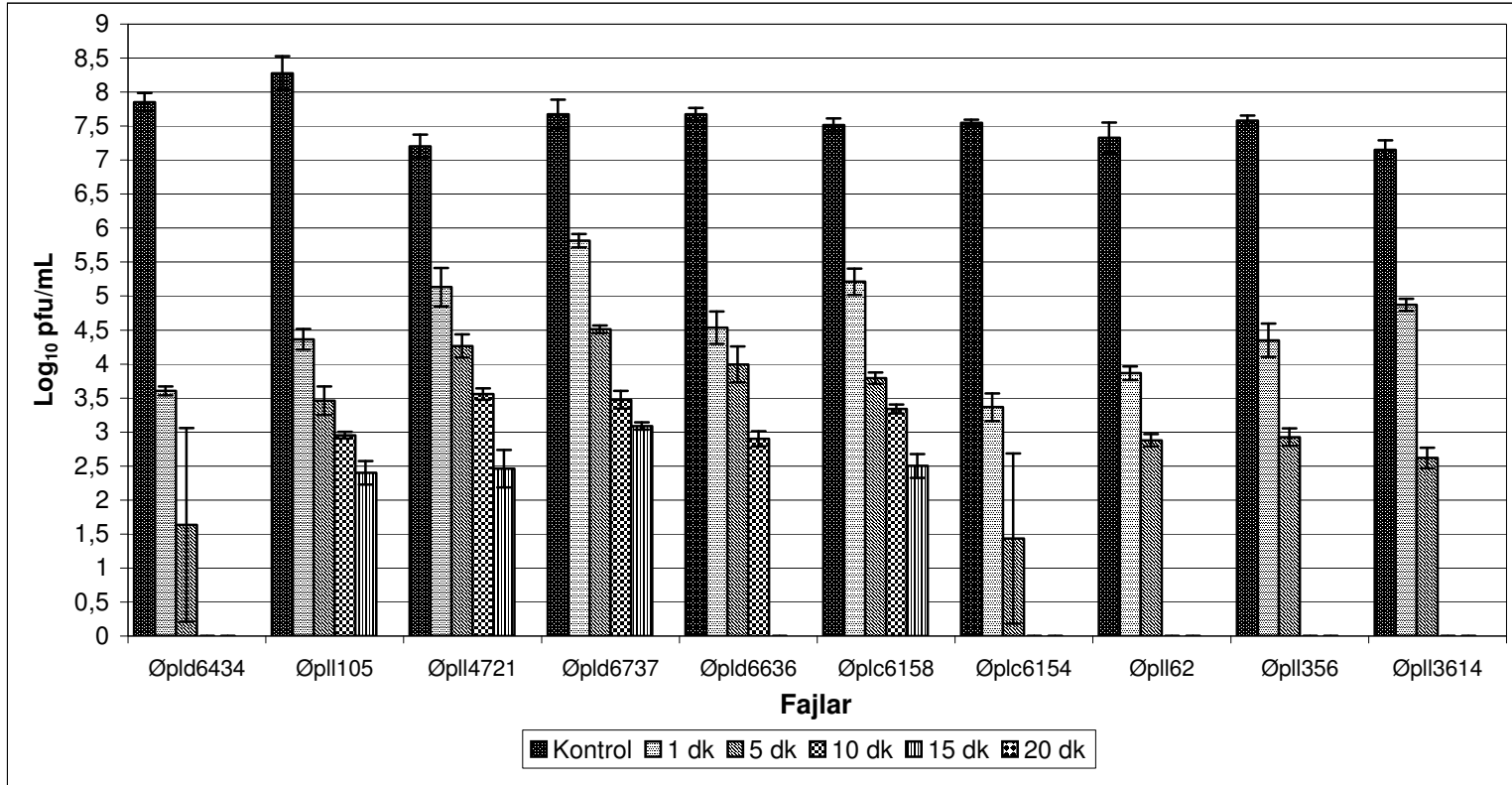
Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		3000 ppm Sodyum Hipoklorit (Log ₁₀ pfu/mL)													
			1 dk		5 dk		10 dk		15 dk		20 dk		25 dk		30 dk	
Øpld6434	7,32	±0,35	5,13	±0,16	3,52	±0,24	2,76	±0,15	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00
Øpll105	7,66	±0,18	4,76	±0,26	3,62	±0,23	3,22	±0,21	2,76	±0,15	1,63	±1,42	0,00	±0,00	0,00	±0,00
Øpll4721	7,42	±0,17	5,80	±0,09	4,91	±0,12	4,28	±0,33	3,83	±0,13	3,07	±0,21	0,77	±1,33	0,00	±0,00
Øpld6737	7,85	±0,06	6,11	±0,20	5,38	±0,33	4,64	±0,20	4,16	±0,22	3,82	±0,19	3,20	±0,42	0,00	±0,00
Øpld6636	7,40	±0,17	4,87	±0,14	4,35	±0,24	3,60	±0,09	3,10	±0,17	0,77	±1,33	0,00	±0,00	0,00	±0,00
Øplc6158	7,92	±0,08	6,13	±0,22	4,37	±0,33	3,81	±0,08	3,35	±0,31	2,86	±0,07	0,00	±0,00	0,00	±0,00
Øplc6154	7,75	±0,08	4,64	±0,13	3,23	±0,13	1,69	±1,49	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00
Øpll62	7,68	±0,25	4,87	±0,12	4,24	±0,21	3,32	±0,31	1,63	±1,42	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00
Øpll356	7,54	±0,06	4,99	±0,09	3,57	±0,18	2,96	±0,22	0,77	±1,33	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00
Øpll3614	7,55	±0,05	5,05	±0,12	3,47	±0,09	2,94	±0,06	0,77	±1,33	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00



Şekil 4.10. 3000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

Çizelge 4.13. 4000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

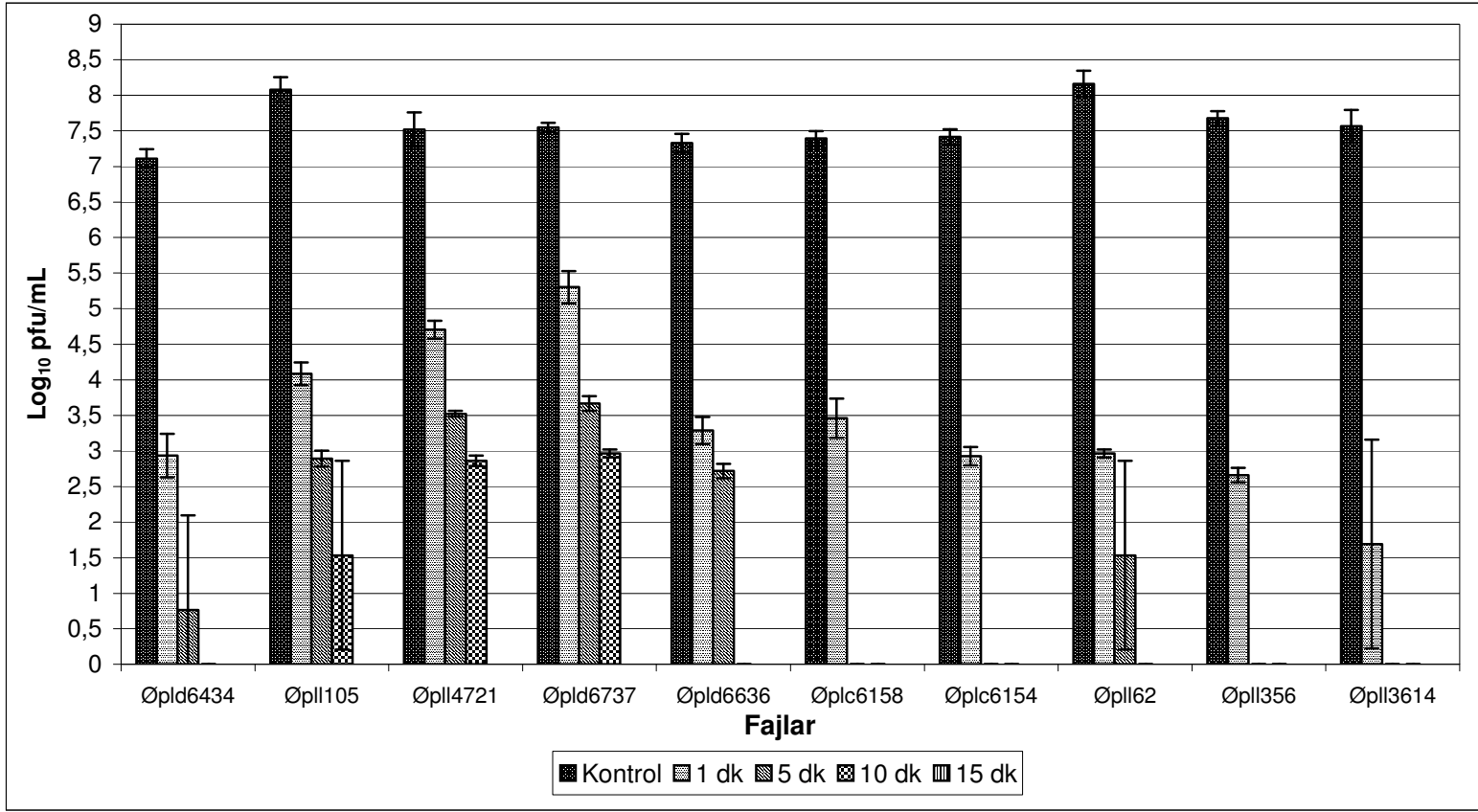
Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		4000 ppm Sodyum Hipoklorit (Log ₁₀ pfu/mL)									
			1 dk		5 dk		10 dk		15 dk		20 dk	
Øpld6434	7,85	(±0,14)	3,61	(±0,07)	1,63	(±1,42)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll105	8,28	(±0,25)	4,36	(±0,15)	3,46	(±0,21)	2,95	(±0,05)	2,40	(±0,17)	0,00	(±0,00)
Øpll4721	7,20	(±0,17)	5,13	(±0,28)	4,27	(±0,17)	3,56	(±0,08)	2,46	(±0,28)	0,00	(±0,00)
Øpld6737	7,67	(±0,22)	5,81	(±0,10)	4,51	(±0,06)	3,47	(±0,13)	3,09	(±0,05)	0,00	(±0,00)
Øpld6636	7,67	(±0,09)	4,54	(±0,24)	3,99	(±0,26)	2,90	(±0,11)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øplc6158	7,52	(±0,09)	5,21	(±0,19)	3,79	(±0,08)	3,34	(±0,07)	2,50	(±0,17)	0,00	(±0,00)
Øplc6154	7,55	(±0,05)	3,37	(±0,20)	1,43	(±1,25)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll62	7,33	(±0,23)	3,87	(±0,10)	2,88	(±0,09)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll356	7,58	(±0,08)	4,35	(±0,25)	2,93	(±0,13)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll3614	7,15	(±0,14)	4,87	(±0,09)	2,62	(±0,15)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)



Şekil 4.11. 4000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

Çizelge 4.14. 5000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		5000 ppm Sodyum Hipoklorit (Log ₁₀ pfu/mL)							
			1 dk		5 dk		10 dk		15 dk	
Øpld6434	7,11	(±0,13)	2,94	(±0,31)	0,77	(±1,33)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll105	8,08	(±0,18)	4,08	(±0,16)	2,89	(±0,11)	1,53	(±1,33)	0,00	(±0,00)
Øpll4721	7,52	(±0,24)	4,70	(±0,13)	3,52	(±0,04)	2,86	(±0,07)	0,00	(±0,00)
Øpld6737	7,55	(±0,06)	5,30	(±0,23)	3,67	(±0,10)	2,97	(±0,06)	0,00	(±0,00)
Øpld6636	7,33	(±0,13)	3,29	(±0,19)	2,72	(±0,10)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øplc6158	7,40	(±0,10)	3,46	(±0,28)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øplc6154	7,42	(±0,11)	2,93	(±0,13)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll62	8,16	(±0,18)	2,97	(±0,06)	1,53	(±1,33)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll356	7,68	(±0,10)	2,66	(±0,10)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)
Øpll3614	7,57	(±0,23)	1,69	(±1,47)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)



Şekil 4.12. 5000 ppm sodyum hipoklorit uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

4.4. Sıcaklık Uygulaması

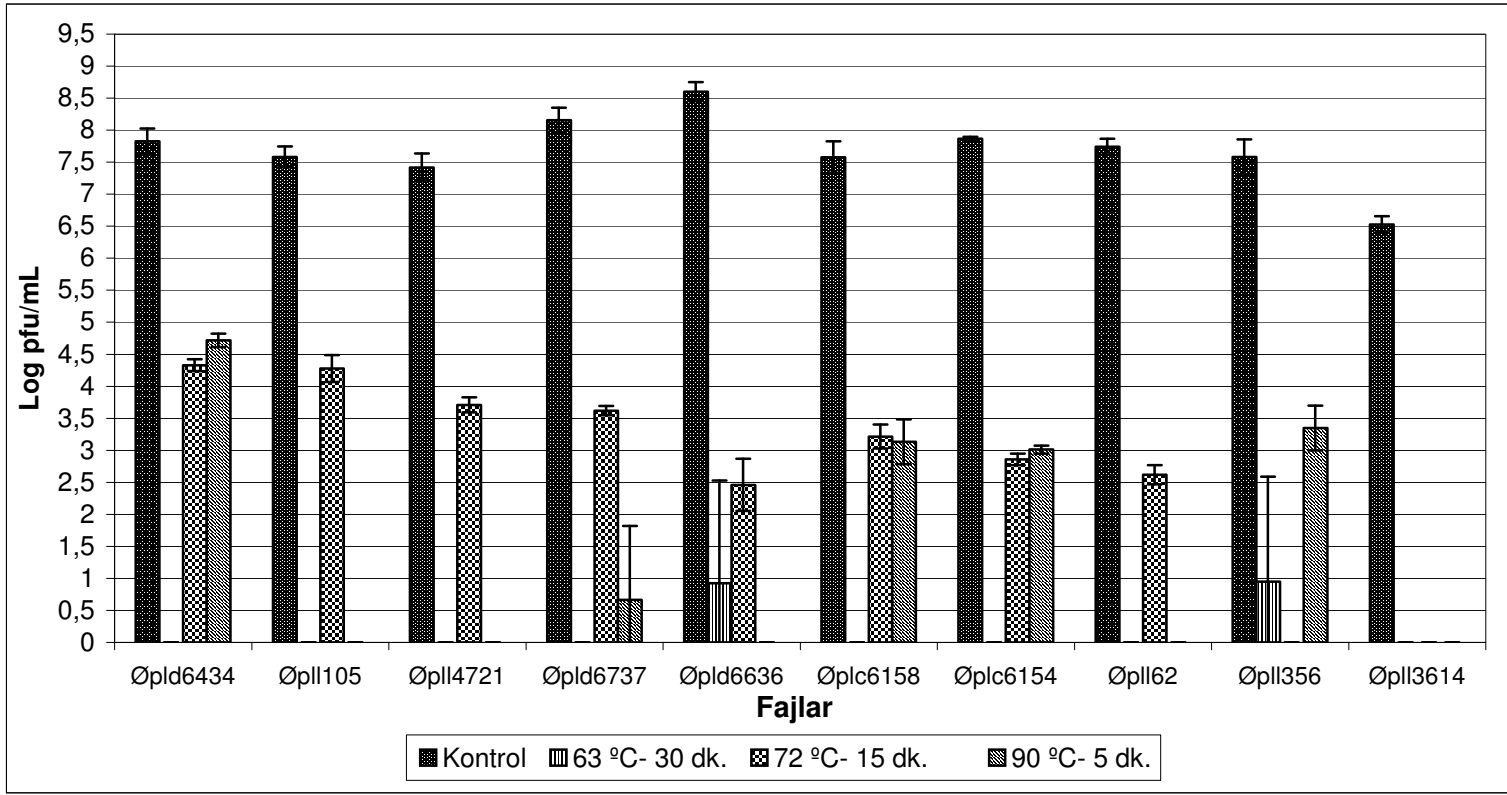
Laktokok fajlarının litik aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi, fermente süt endüstrisinde en fazla başvurulan üç farklı pastörizasyon uygulaması seçilerek tespit edildi. 63 °C' de 30 dk sıcaklık uygulamasına tabi tutulan laktokok fajlarından sekiz adedi, homolog konakçı suşlarına karşı litik etkinliklerini tamamen kaybederken; Øpll356 ve Øpll6636 fajlarında, sırasıyla 6,63 ve 7,68 gibi yüksek düzeylerde logaritmik azalmalar (Log_{10}) gerçekleşti. 72 °C' de 15 dk sıcaklık uygulaması sonunda, yalnız Øpll356 ve Øpll3614 fajları tam aktivite kaybına uğradı. Diğer fajlarda da 3.31-6.14 düzeylerinde logaritmik azalmalar (Log_{10}) saptandı. Araştırmada kullanılan son sıcaklık uygulamasında ise (90 °C' de 5 dk), beş fajın (Øpll105, Øpll4721, Øpld6636, Øpll62, Øpll3614) homolog konakçılarına karşı litik etkinliklerini tamamen kaybettiği belirlendi. Diğer beş laktokok fajı için de, 3,11-6,16 arasında değişen oranlarda titre kaybı (Log_{10}) tespit edildi (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.13).

Virüsler, yapısal özelliklerinden dolayı genellikle yüksek sıcaklık direncine sahiptir. Ancak, biyosit uygulamaları ve faj inhibitör ortamların etkisinden kaçan fajların, gıda üretim süreçlerinde inaktivasyonunda kullanılabilecek yardımcı kriter olarak sıcaklık uygulaması kaçınılmazdır. Özellikle süt fermentasyonunda, hammaddenin doğası gereği sadece pastörizasyonun mümkün oluşu, laktokok fajlarının inaktivasyonunda sıcaklık kriterinin kullanımını bu uygulamalar ile sınırlandırmaktadır (Suárez and Reinheimer 2002, Quiberoni *et al.* 2003). Laktik asit bakterilerinin fajları içerisinde en düşük sıcaklığa direnç özelliği gösteren fajlar, laktokok fajları olarak tanımlanmıştır. *Streptococcus* ve *Lactobacillus* fajları 63 °C, 72 °C ve 90 °C' de sırasıyla 30 dk, 15 dk ve 5 dk süreyle yapılan sıcaklık uygulamalarına genellikle yüksek düzeyde direnç gösterirken, *Lactococcus* cinsine ait türlere özgü fajların 55 °C–80 °C arasında, faj tipine bağlı farklılık göstermekle birlikte, önemli ölçüde inaktive olduğu saptanmıştır. Basınç ve sıcaklık uygulamalarının birlikte yapılması ise, faj inaktivasyon etkinliğini arttırmaktadır (Moroni *et al.* 2002, Capra *et al.* 2004, Müller-Merbach *et al.* 2005a, Müller-Merbach *et al.* 2005b). Laktokok fajları ile yürütülen çalışmalarda en etkin pastörizasyon uygulamasının 63 °C' de 30 dk olduğu belirlenmiştir (Suárez and Reinheimer 2002, Quiberoni *et al.* 2003, Müller-Merbach *et al.* 2005a). Bu araştırmada da, denenen tüm fajların inaktivasyonunu gerçekleştirmek için yeterli olmamakla birlikte, en etkin sıcaklık uygulaması ve süresi 63 °C' de 30 dk olarak tespit edildi. Bu benzer bulgular, faj enfeksiyonunda etkin yüzey proteinlerinin, dünyada fermente süt endüstrisinde dominant olan laktik fajlar ile ortak olduğuna işaret etmektedir. Bu öngörü, özellikle Türkiye kökenli laktokok fajları ile endüstriyel starter kültür suşları arasındaki faj-konakçı

interaksiyonlarının tanımlanması ile kesinlik kazanacaktır.

Çizelge 4.15. Sıcaklık uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

Faj Kod No.	Kontrol (Log ₁₀ pfu/mL)		Sıcaklık Uygulaması (Log ₁₀ pfu/mL)					
			63 °C- 30 dk.		72 °C- 15 dk.		90 °C- 5 dk.	
Øpld6434	7,83	(±0,20)	0,00	(±0,00)	4,33	(±0,09)	4,72	(±0,11)
Øpll105	7,58	(±0,16)	0,00	(±0,00)	4,28	(±0,21)	0,00	(±0,00)
Øpll4721	7,42	(±0,22)	0,00	(±0,00)	3,71	(±0,12)	0,00	(±0,00)
Øpld6737	8,16	(±0,19)	0,00	(±0,00)	3,62	(±0,07)	0,67	(±1,15)
Øpld6636	8,60	(±0,15)	0,93	(±1,60)	2,46	(±0,41)	0,00	(±0,00)
Øplc6158	7,58	(±0,25)	0,00	(±0,00)	3,21	(±0,19)	3,13	(±0,35)
Øplc6154	7,86	(±0,03)	0,00	(±0,00)	2,86	(±0,09)	3,01	(±0,06)
Øpll62	7,74	(±0,13)	0,00	(±0,00)	2,62	(±0,15)	0,00	(±0,00)
Øpll356	7,58	(±0,27)	0,95	(±1,64)	0,00	(±0,00)	3,35	(±0,35)
Øpll3614	6,53	(±0,13)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,00	(±0,00)



Şekil 4.13. Sıcaklık uygulamasının laktokok fajlarının inaktivasyonu üzerine etkisi

KAYNAKLAR

- Ackermann, H. W. 1999. Tailed bacteriophages: the order *Caudovirales*. *Adv. Virus Res.*, 51; 135–201.
- Akçelik, M. and 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; 215-217.
- Akçelik, M. 1999a. The conjugal plasmid pLL10236 encodes lactose fermentation ability, restriction modification activity and bacteriocin production and immunity in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL102. *Food Microbiol.*, 16; 487-494.
- Akçelik, M. 1999b. Plasmid mediated industrial traits in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL140. *Milchwissenschaft*, 54; 603-606.
- Akçelik, M., Şanlıbaba, P. and Tükel, Ç. 2000. Phage resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from traditional fermented milk products in Turkey. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 35; 473-481.
- Alatossava, T. and Klaenhammer, T. R. 1991. Molecular characterization of three small isometric-headed bacteriophages which vary in their sensitivity to the lactococcal phage resistance plasmid pTR2030. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57; 1346-1353.
- Allison, G. E. and Klaenhammer, T. R. 1998. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 8; 207–226.
- Avşaroglu, D., Buzrul S., Alpas H., Akçelik M. and Bozoğlu F. 2006. Use of the Weibull model for lactococcal bacteriophage inactivation by high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.*, 108; 78-83.
- Batt, C. A., Erlandson, K. and Bsat, N. 1995. Design and implementation of a strategy to reduce bacteriophage infection of dairy starter cultures. *Int. Dairy Journal*, 5; 949-962.
- Binetti, A. G. and Reinheimer, J. A. 2000. Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *J. Food Protection*, 63; 509–515.
- Bouchard, J. D. and Moineau, S. 2000. Homologous recombination between a lactococcal bacteriophage and the chromosome of its host strain. *Virology*, 270; 65-75.

- Boumerdassi, H., Monnet, C., Desmazeaud, M. and Corrieu, G. 1997. Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CNRZ 483 mutants producing diacetyl and acetoin from glucose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63; 2293-2299.
- Brüssow, H. and Desiere, F. 2001. Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages. *Mol. Microbiol.*, 39; 213-222.
- Capra, M. L., Quiberoni, A. and Reinheimer, J. A. 2004. Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. *Letters in Applied Microbiol.*, 38; 499-504.
- Chambers, H. F. and Hadley, W. K. 1998. Miscellaneous antimicrobial agents; disinfectants, antiseptics & sterilants. In: Katzung BG (ed). *Basic & Clinical Pharmacology*, Connecticut, Appleton & Lange, Seventh Edition, 803-811.
- Chopin, M. C. 1980. Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and to spray-drying. *J. Dairy Res.*, 47; 131-139.
- Coffey, A. and Ross, P. 2002. Bacteriophage resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82; 303-321.
- Daly, D., Fitzgerald, G. F. and Davis, R. 1996. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70; 99-110.
- Dannenberg, F. and Kessler, H. G. 1988c. Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. *J. Food Sci.* 53, 258-63.
- De Vos, W. M. 1989. On the carrier state of bacteriophages in starter lactococci. *Neth. Milk Dairy J.*, 43; 221-228.
- Denyer, S. P. and Stewart, G. S. A. B. 1998. Mechanisms of action of disinfectants. *Int. Biodeterioration and Biodegradation*, 41; 261-268.
- Desiere, F., Lucchini, S., Canchaya, C., Ventura, M. and Brussow, H. 2002. Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82; 73-91.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. and Debevere, J. 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int. Dairy J.*, 14; 273-285.
- Difco Manual. 1984. Difco Laboratories, Detroit-Michigan, USA, 333 s.
- Dinsmore, P. K. and Klaenhammer, T. R. 1995. Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. *Mol. Biotechnol.*, 4; 297-314.

- Domingues, S., Chopin, A., Ehrlich, S. D. and Chopin, M. C. 2004. The lactococcal abortive phage infection system AbiP prevents both phage DNA replication and temporal transcription switch. *J. Bacteriol.*, 186; 713-721.
- Durán, A. E., Muniesa, M., Mocé-Llivina, L., Campos, C., Jofre, J. and Lucena, F. 2003. Usefulness of different groups of bacteriophages as model microorganisms for evaluating chlorination. *J. Appl. Microbiol.*, 95; 29-37.
- Durmaz, E. and Klaenhammer, T. R. 2000. Genetic analysis of chromosomal regions of *Lactococcus lactis* acquired by recombinant lytic phages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66; 895-903.
- Estrela, C., Estrela, C. R., Barbin, E. L., Spano, J., Marchesan, M. A. and Pécora, J. D. 2002. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz. Dent. J.*, 13; 113-117.
- Estrela, C., Ribeiro, R. G., Estrela, C. R. A. , Pécora, J. D., Sousa-Neto, M. D. 2003. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J.*, 14; 58-62.
- Everson, T. C. 1991. Control of phages in the dairy plant. *FIL-IDF Bull.*, 263; 4-11.
- Forde, A. and Fitzgerald, G. F. 2003. Molecular organization of exopolysaccharide encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658. *Plasmid*, 49; 130-142.
- Gallmann, P. V. and Eberhard, P. 1993. Alternative methods for heating milk and milk products. *Int. Dairy Federation (FIL)*, 284; 24.
- Gilbert, P. and McBain, J. A. 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiol. Rev.*, 16; 189-208.
- Harrigan, F. W. and McCance, E. M. 1966. *Laboratory methods in microbiology*. Academic Press London, New York, p. 285.
- Hill, C., Miller, L. A. and Klaenhammer, T. R. 1991. In vivo genetic exchange of a functional domain from a type IIA methylase between lactococcal plasmid pTR2030 and a virulent bacteriophage. *J. Bacteriol.*, 173; 4363-4370.
- Hill, C., and R. P. Ross. 1998. Starter cultures for the dairy industry,. *In* S. Roller, and S. Harlander (ed.), *Genetic modification in the food industry*. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom. p. 174-192.

- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams. S. T. 1994. Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins Baltimore, Ninth Edition, p. 1–787.
- Huggins, R. A. 1984. Progress in dairy starter culture technology. Food Technology, 38; 41-50.
- Hugo, W. B. and Russell, A. D. 1999. Types of antimicrobial agents. In principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, (Russell, A. D., Hugo, W. B. & Ayliffe, G. A. J., Eds), Third Edition, pp. 5–94.
- Jarvis, A. W. and Meyer, J. 1986. Electron microscopic heteroduplex study and restriction endonuclease cleavage analysis of the DNA genomes of three lactic streptococcal phages. Appl. Environ. Microbiol., 51; 566-573.
- Jarvis, A. W., Fitzgerald, G. F., Mata, M., Mercenier, A., Neve, H., Powell, I. B., Ronda, C., Saxelin, M. and Teuber, M. 1991. Species and type phages of lactococcal bacteriophages. Intervirology, 32; 2-9.
- Kempler, G. M. and McKay, L. L. 1980. Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Appl. Environ. Microbiol., 39; 926-927.
- Kim, W. S., Ren, Y. and Dunn, N. W. 1999. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stress. FEMS Microbiol. Letters, 171; 57-65.
- Klaenhammer, T. R. 1984. Interactions of bacteriophages with lactic streptococci. Adv. Appl. Microbiol., 30; 1-29.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12; 39-86.
- Kleerebezem, M., Boels, I. C., Groot, M. N., Mierau, I., Sybesma, W. and Hugenholtz, J. 2002. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling. J. Bacteriol., 98; 199-213.
- Klein, M. and Deforest, A. 1983. Principles of viral inactivation. In S. S. Block (Ed.), Third Edition. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa., p. 422–434.
- Kraus, J. and Geller, B. L. 1998. Membrane receptor for prolate phages is not required for infection of *Lactococcus lactis* by small or large isometric phages. J. Dairy Sci., 81; 2329-2335.
- Lauridsen, B. S., Jansen, T., Schnabl, J. and Johansen, E. 2003. Identification of the host determinant of two prolate-headed phages infecting *Lactococcus lactis*. Virology, 309; 10-17.

- Lawrence, J. G., Hatfull, G. F. and Hendrix, R. W. 2002. Imbroglios of viral taxonomy: exchange and failings of phenetic approaches. *J. Bacteriol.*, 184; 4891-4905.
- Li J. W., Xin Z. T., Wang X. W., Zheng J. L. and Chao F. H. 2002. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68; 4951-4955.
- Madera, C., Monjardin, C. and Suarez, J. E. 2004. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70; 7365-7371.
- Madsen, S. M., Mills, D., Djordjevic, G., Israelsen, H. and Klaenhammer, T. R. 2001. Analysis of the genetic switch and replication region of a P335-type bacteriophage with an obligate lytic lifestyle on *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67; 1128-1139.
- Mahanivong, C., Boyce, J. D., Davidson, B. E. and Hiller, A. 2001. Sequence analysis and molecular characterization of the *Lactococcus lactis* temperate bacteriophage BK5-T. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67; 3564-3576.
- Maillard, J. Y., Beggs, T. S., Day, M. J., Hudson, R. A. and Russell A. D. 1996. Damage to *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacteriophage F116 DNA by biocides. *J. Appl. Bacteriol.*, 80; 540-544.
- Maillard, J. Y. 2001. Virus susceptibility to biocides: an understanding. *Reviews in Medical Microbiol.* 12; 63-74.
- Maillard, J. Y. 2005. Biocides; healt care application. *The Pharmeceutial Journal.*, 275; 639-642.
- McDonnell, G. and Russell, A. D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiol. Rev.*, 12; 147-179.
- McIntyre, K., Heap, H. A., Davey, G. P. and Limsowtin, G. K. Y. 1991. The distribution of lactococcal bacteriophage in the environment of a cheese manufacturing plant. *Int. Dairy J.*, 1; 183-197.
- McKenna, S. M. and Davies, K. J. A. 1988. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. *Biochemical Journal*, 254; 685-92.
- Micklic, A. and Rogelj, I. 2003. Characterization of lactococcal bacteriophages isolated from Slovenian dairies. *Int. J. Food Sci.Tech.*, 38; 305-311.

- Mills, S., Coffey, A., O'Sullivan, L., Stokes, D., Hill, C., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. 2002. Use of Lacticin 481 to facilitate delivery of the bacteriophage resistance plasmid, pCBG104 to cheese starters. *J. Appl. Microbiol.*, 92; 238-246.
- Moineau, S., Sithian, P., Klaenhammer, T. R. and Pandian, S. 1994. Evolution of a lytic bacteriophage via DNA acquisition from the *Lactococcus lactis* chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 1832-1841.
- Moineau, S., Borkaev, M., Holler, B. J., Walker, S. A., Kondo, J. K., Vedamuthu, E. R. and Vandenberg, P. A. 1996. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. *J. Dairy Sci.*, 79; 2104-2111.
- Moineau, S. 1999. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76; 377-382.
- Moineau, S., Tremblay, D. and Labrie, S. 2002. Phages of lactic acid bacteria: from genomics to industrial applications. *ASM News*, 68; 388-393.
- Monteville, M. R., Ardestani, B. and Geller B. L. 1994. Lactococcal bacteriophages require a host cell wall carbohydrate and a plasma membrane protein for adsorption and enjection of DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 3204- 3211.
- Moroni, O., Jean, J., Autret, J. and Fliss, I. 2002. Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *Int. Dairy Journal*, 12; 907-913.
- Morton, H. E. 1983. Alcohols. Disinfection, sterilization, and preservation, In S. S. Bloch (ed.), *Lea & Febiger*, Philadelphia, Pa. Third Edition, p. 225-239.
- Müller-Merbach, M., Rauscher, T. and Hinrichs, J. 2005a. Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *Int. Dairy Journal*, 15; 777-784.
- Müller-Merbach, M., Neve, H. and Hinrichs, J. 2005b. Kinetics of the thermal inactivation of the *Lactococcus lactis* bacteriophage P008. *J. Dairy Research*, 72; 281-286.
- Oriani, M. G. and Yokoya, F. 2004. *Lactococcus* bacteriophages isolated from whey and their effects on commercial lactic starters. *Braz. arch. biol. technol.*, 47; 559-568.
- O'Sullivan, D., Ross, R. P., Twomey, D. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C. and Coffey, A. 2001. Naturally occurring lactococcal plasmid pAH90 links bacteriophage resistance and mobility functions to a food-grade selectable marker. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67; 929-937.

- O'Sullivan, L., Morgan, S. M., Ross, R. P., Hill, C. 2002. Elevated enzyme release from lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic lacticin 481, produced by *Lactococcus lactis* DPC5552. J. Dairy Sci., 85; 2130-2140.
- Parada, J. L. and Fabrizio, S. V. 2001. Stability of *Lactococcus lactis* phages treated with sodium hypochlorite and during storage. Rev. Argent Microbiol., 33; 89-95.
- Pedersen, Janice, C., Donald, L., Reynolds, and A. Ali. 2000. The sensitivity and specificity of a RT-PCR assay for the avian pneumovirus (Colorado Strain). Avian Diseases, 44; 681-685.
- Pot, B., Vandamme, P. and Kersters, K. 1994. Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints. In M. Goodfellow and A. O'Donnell (Eds.), Chemical Methods in Prokaryotic Systematics. J. Wiley and sons, Chichester, p. 493-521.
- Proux, C., Van Sinderen, D., Suarez, J., Garcia, P., Ladero, V., Fitzgerald, G. F., Desiere, F. and Brüßow, H. 2002. The dilemma of phage taxonomy illustrated by comparative genomics of Sfi21-like *Siphoviridae* in lactic acid bacteria. J. Bacteriol., 184; 6026-6036.
- Quiberoni, A., Suárez, V. B. and Reinheimer J. A. 1999. Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. J. Food Protection, 62; 894–898.
- Quiberoni, A., Guglielmotti, D. M. and Reinheimer, J. A. 2003. Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. Int. J. Food Microbiol., 84; 51–62.
- Rakonjac, J., O'Toole, P. W. and Lubbers, M. 2005. Isolation of lactococcal prolate phage-phage recombinants by an enrichment strategy reveals two novel host range determinants. J. Bacteriol., 187; 3110-3121.
- Reddy, M. S., Vedamuthu, E. R., Washam, C. J. and Reinbold, G. W. 1969. Differential agar medium for separating *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. Appl. Microbiol., 18; 755-759.
- Rohwer, F. and Edwards, R. 2002. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. J. Bacteriol., 184 ; 4529-4535.
- Russell, A. D. 1998. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics and biocides. Progress in Medicinal Chemistry, 35; 133–97.
- Russell, A. D. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. J. Appl. Bacteriol., 71; 191–201.
- Russell, A. D. 1999. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. J. Hospital Infection, 43; 57–68.

- Russell, A. D. 2002. Introduction of biocides into clinical practice and impact on antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.*, 92; 121–35.
- Russell, A. D. 2003. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52; 750–63.
- Salminen, S. and Von Wright, A. 1993. *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker Ltd., New York, 442 p.
- Sanders, M. E. 1988. Phage resistance in lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70; 411-421.
- Sandine, W. E. 1979. *Lactic starter culture technology*. Pfizer Inc., New York, 97.
- Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D. and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. Nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6; 183-195.
- Schröder, W. 1984. Peracetic acid: disinfectant for the foodstuff industry. *Brauwelt International*, 1; 115–120.
- Shaerman, C., Underwood, H. M., Jury, K. and Gasson, M. 1989. Cloning and DNA sequence analysis of *Lactococcus* bacteriophage lysin gene. *Molecular General Genetics*, 218; 214-221.
- Smid, E. J., Van Enkevort, F. J. H., Wegkamp, A., Boekhorst, J., Molenaar, D., Hugenholtz, J., Siezen, R. J. and Teusink, B. 2005. Metabolic models for rational improvement of lactic acid bacteria as cell factories. *J. Appl. Microbiol.*, 98; 1326-1331.
- Stadhouders, J. 1986. The control of cheese starter activity. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40; 155-173.
- Suárez, V. B. and Reinheimer, J. A. 2002. Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages. *J. Food Prot.* 65; 1756–1759.
- Svensson, U. and Christiansson, A. 1991. Methods for phage monitoring. *FIL-IDF Bulletin* 263; 29–39.
- Şanlıbaba, P. ve Akçelik, M. 2000. Çiğ süt ve peyniraltı sularından izole edilen laktokokların faj duyarlılıkları. *Tr. J. Biol.*, 24; 425-435.
- Şanlıbaba, P. and Akçelik, M. 2005. Classification of virulent lactococcal bacteriophages based on protein composition and restriction endonuclease analysis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 29; 865-871.
- Terzaghi, B. E. and Sandine W. E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29; 807-813.

- Thompson, S. and Yates, M. V. 1999. Bacteriophage inactivation at the air-water solid interface in dynamic batch systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65; 1186-1190.
- Williams, A. M., Fryer, J. L. and Collins, M. D. 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish . *FEMS Microbiol. Lett.*, 68; 109-114.
- Tuncer, Y. and Akçelik, M. 2002. A protein which masks galactose receptor mediated phage susceptibility in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MPL 56. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37; 139-144.
- Tükel, Ç., Akçelik, M. and Tunail, N. 2004. Analysis of resistance mechanism of bacteriophage adsorption inhibition type in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* MR27a and St76. *Milchwissenschaft* , 59; 138-140.
- Vegge, C. S., Brondsted, L., Neve, H., McGrath, S., van Sinderen, D. and Vogensen, F. K. 2005. Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J. Bacteriol.*, 187; 4187-4197.
- Vereecken, K. M. and Van Impe, J. F. 2002. Analysis and practical implementation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 73; 239-250.
- Vieira, C. D., Farias, L., Diniz, C. G., Alvarez-Leite, M. E., Camargo, E. R. and Carvalho, M. A. 2005. New methods in the evaluation of chemical disinfectants used in health care services. *American Journal of Infection Control*, 33; 162-169.
- Virto, R., Sanz, D., Álvarez, I., Condon, S. and Raso, J. 2004. Relationship between inactivation kinetics of a *Listeria monocytogenes* suspension by chlorine and its chlorine demand. *J. Appl. Microbiol.*, 97; 1281-1288.
- Yasuda-Yasuki, Y., Namiki-Kanie, S. and Hachisaka, Y. 1978. Inhibition of germination of *Bacillus subtilis* spores by alcohols. In G. Chambliss and J. C. Vary (eds.), *Spores VII*. American Society for Microbiology, p. 113–116.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Ankara' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara' da tamamladı. 1999 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü' nden 2003 yılında mezun oldu. Aynı yıl, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü' nde yüksek lisans öğrenimine başladı.