

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Streptococcus thermophilus ve *Lactobacillus bulgaricus* VİRÜLENT FAJLARININ
REPLİKASYON PARAMETRELERİ, KAPSİD PROTEİN PROFİLLERİ VE
RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ANALİZLERİ ESAS ALINARAK
TANIMLANMALARI VE SINIFLANDIRILMALARI

ESRA ACAR SOYKUT

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2007

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

Streptococcus thermophilus ve *Lactobacillus bulgaricus* VİRÜLENT FAJLARININ REPLİKASYON PARAMETRELERİ, KAPSİD PROTEİN PROFİLLERİ VE RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ANALİZLERİ ESAS ALINARAK TANIMLANMALARI VE SINIFLANDIRILMALARI

ESRA ACAR SOYKUT

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Bölümü

Danışman: Prof. Dr. Nezihe TUNAİL

Bu tez kapsamında konakçıları endüstriyel 709, 231 ve B3 *S. thermophilus* suşları olan 26 adet *S. thermophilus* fajı ile konakçıları ticari Y4, V1 ve V2 olan 24 adet *Lb. bulgaricus* fajının protein profilleri, restriksiyon endonükleaz şablonları ve faj replikasyon parametreleri belirlenmiştir. Ayrıca B3 *S. thermophilus* ve 231, V1, V2 *Lb. bulgaricus* fajlarının konakçı özgüllüklerinin belirlenmesi amacıyla; her iki türe ait fajlar, yerel ve starter *S. thermophilus* suşları ile yerel ve starter *Lb. bulgaricus* suşları ile karşılaştırılmıştır. Fajların hemen hemen aynı konakçı spektrumuna sahip oldukları görülmüştür. Yerel *S. thermophilus* suşları fajlara tam direnç gösterirken, yerel *Lb. bulgaricus* suşları hem kendi fajlarına çok duyarlı bulunmuş hem de partnerinin kimi fajlarına heterolog konakçı olarak davranmıştır. *S. thermophilus* fajlarının birbirine identik protein profili ve 30.6 ile 27.3 kDa büyüklüğünde iki adet majör protein bantına sahip olduğu tespit edilmiştir. *Lb. bulgaricus* fajları ise iki ve/veya üç minör ve majör protein bantı içermelerine göre 5 gruba ayrılmıştır. Minör protein bantlarının büyüklüğü 100.8, 65 ve 50 kDa iken, majör protein bantlarının büyüklüğü 29.6, 29.2 ve 26.2 kDa olarak belirlenmiştir. Fajlardan *S. thermophilus*' a özgül olanlar *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII*, *HindIII*, *ClaI*, *HaeII*, *HhaI*, *PstI*, *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesime alınmış, oluşan fragment dizilimlerine göre sınıflandırılmaya çalışılmış, *EcoRV*'e göre 9 grup oluşmuştur. Genom büyüklüklerinin ise 41-45 kb civarında olduğu saptanmıştır. *Lb. bulgaricus* fajları ise *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII*, *HindIII*, *HhaI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesime alınmış, *HindIII* ile kesim sonucu 8 farklı gruba ayrılmıştır. Faj genom büyüklükleri 29-32 kb olarak hesaplanmıştır. *S. thermophilus* fajlarından ΦB3-X19, Φ2B3-A, Φ231-X9, Φ231S-A ve Φ709-X5'in, *Lb. bulgaricus* fajlarından ise ΦY4-X12'nin faj gelişim parametreleri belirlenmiştir. *S. thermophilus* fajlarının latent dönem sürelerinin 15-35 dk arasında değiştiği görülürken, ΦY4-X12'nin latent dönem süresi 85 dk bulunmuştur. Fajların tamamının artış dönem süreleri hemen hemen aynıken, patlama büyüklüklerinde belirgin farklılıklar göze çarpmıştır.

2007, 176 sayfa

Anahtar Kelimeler: *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, virulent faj, konakçı özgüllüğü, protein profilleri, restriksiyon endonükleaz analizi, replikasyon parametreleri, sınıflama

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

IDENTIFICATION AND CLASSIFICATION OF VIRULENT BACTERIOPHAGES OF *Streptococcus thermophilus* AND *Lactobacillus bulgaricus* BASED ON THEIR REPLICATION PARAMETERS, CAPSID PROTEIN PROFILES AND RESTRICTION ENDONUCLEASE ANALYSIS

ESRA ACAR SOYKUT

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Nezihe TUNAİL

In this thesis, we have determined DNA restriction patterns, structural protein analysis and replication parameters of 26 *S. thermophilus* (709, 231, B3) and 24 *Lb. bulgaricus* (Y4, V1, V2) phages. Furthermore, sensitivities of natural and commercial *S. thermophilus* and *Lb. bulgaricus* strains to both of B3 *S. thermophilus* and 231 V1, V2 *Lb. bulgaricus* phages have been investigated. It has been observed that none of the phages lyse natural *S. thermophilus* strain while natural *Lb. bulgaricus* strains have shown to be sensitive to *Lb. bulgaricus* phages. Besides, some of natural *Lb. bulgaricus* strains show sensitivity to some *S. thermophilus* phages as a heterolog hosts. We have also identified that the electrophoretic profiles of the structural proteins of *S. thermophilus* phages are related, with two major bands of 30.6 and 27.3 kDa in common for all phages. *Lb. bulgaricus* phages, on the other hand, possess two and/or three major (29.6, 29.2, 26.2 kDa) and minor (100.8, 65, 50 kDa) structural proteins. We have classified these phages into five groups based on major and minor proteins. *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII*, *HindIII*, *ClaI*, *HaeII*, *HhaI*, *PstI*, and *BamHI* restriction endonucleases have been used to digest of *S. thermophilus* phages. According to the *EcoRV* digestion, *S. thermophilus* phages are differentiated into nine subgroups. The genom size (41-45 kb) of *S. thermophilus* phage is determined by summing the molecular size of restriction fragments generated by digestion. *Lb. bulgaricus* phages are also treated with restriction endonucleases (*EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII*, *HindIII*, *HhaI*, and *BamHI*). The genom size ranges from 29-32 kb. One-step growth studies show that latent periods of *S. thermophilus* phages vary from 15 to 35 minutes and latent period of Φ Y4-X12 is 85 minutes. Finally, it has been observed that all phages have similar rising time whereas they considerably differ in the size of burst.

2007, 176 pages

Key Words: *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, virulent phage, host specificity, protein profiles, restriction endonuclease analysis, replication parameters, classification

TEŞEKKÜR

Her konuda beni azimle destekleyen, bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren, birlikte zevkle çalıştığım ve çok sevdiğim Hocam, Sayın Prof. Dr. Nezihe TUNAİL'e,

Moleküler karakterizasyon çalışmalarımda bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK ve Sayın Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a,

Her türlü konuda yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Kamuran AYHAN'a,

Sık sık bilgi ve tecrübelerine başvurduğum Sayın Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI ve Sayın Prof. Dr. Kadir HALKMAN'a,

Arkadaşlığı ve bilimsel desteği ile yanımda olan Sayın Doç. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya,

Her zaman yanımda olan deneyimlerinden yararlandığım ve içten dostluğuna inandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim ÇAKIR'a ve Yrd. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ'ye,

Babalığı, ağbeyliği ve tecrübesi ile her zaman bana yardımcı olan Mustafa GAYRETLİ'ye,

Çalışmalarımda bana yardımcı olan arkadaşlarım Arş. Gör. Gökçe POLAT, Deniz KOÇAN, Şeyda ÖZYURT , Emel KAHRAMAN, Naciye YAKAR ve İrem DAMAR'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca maddi manevi destekleriyle bugüne gelmemi sağlayan ve aldığım her kararda yanımda olan canım aileme ve eşime, sevgi ve saygılarımı sunmayı bir borç bilirim.

Esra ACAR SOYKUT

Ankara, Ocak 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	Error! Bookmark not defined.
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	Error! Bookmark not defined.
2.1 Yoğurt Starter Kültürleri, Termofilik Fajlar ve Orijinleri..	Error! Bookmark not defined.
2.2 Bakteriyofajların Yaşam Şekilleri	Error! Bookmark not defined.
2.2.1 Litik yaşam döngüsü	Error! Bookmark not defined.
2.2.2 Lizogenik yaşam döngüsü	Error! Bookmark not defined.
2.3 Faj Direnç Mekanizmaları.....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Faj Replikasyon Parametreleri	Error! Bookmark not defined.
2.4.1 Tek aşamalı gelişme eğrisi	Error! Bookmark not defined.
2.5 Bakteriyofaj Sınıflama Nedenleri, Yapıları ve Taksonomik Durumları.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.1 Neden faj sınıflaması?	Error! Bookmark not defined.
2.5.2 Bakteriyofaj yapıları ve taksonomik durumları...	Error! Bookmark not defined.
2.5.3 Kuyruklu fajlar.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.3.1 Sfi21-tipi (cos-bölgeye sahip) kuyruklu fajlar ...	Error! Bookmark not defined.
2.5.3.2 Sfi11-tipi (pac-bölgeye sahip) kuyruklu fajlar...	Error! Bookmark not defined.
2.5.4 Faj taksonomisine farklı bir yaklaşım	Error! Bookmark not defined.
2.5.5 <i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Lactobacillus bulgaricus</i> fajları	Error! Bookmark not defined.
2.5.5.1 <i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Lactobacillus bulgaricus</i> fajlarının morfolojik yapıları ve konakçı dizgeleri esas alınarak sınıflandırılması	Error! Bookmark not defined.
2.5.5.2 <i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Lactobacillus bulgaricus</i> fajlarının restriksiyon endonükleaz analizleri ve protein profilleri esas alınarak sınıflandırılması	Error! Bookmark not defined.
3. MATERYAL VE YÖNTEM	Error! Bookmark not defined.
3.1 Materyal	Error! Bookmark not defined.
3.1.1 Mikroorganizmalar	Error! Bookmark not defined.
3.1.2 Bakteriyofajlar.....	Error! Bookmark not defined.

3.1.3 Besiyerleri.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.4 Enzim ve ince kimyasallar	Error! Bookmark not defined.
3.2 Yöntem.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.1 Faj izolasyonu, saflaştırma ve zenginleştirme.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.1.1 Çiğ ve pastörize süttten faj izolasyonu.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.1.2 Çift tabaka agar yöntemiyle faj varlığının belirlenmesi	Error! Bookmark not defined.
3.2.1.3 Faj saflaştırması (Tek plak izolasyonu).....	Error! Bookmark not defined.
3.2.1.4 Zenginleştirme ve titre belirlenmesi	Error! Bookmark not defined.
3.2.2 Fajların saklanması	Error! Bookmark not defined.
3.2.3 Suşların faj özgüllüklerinin belirlenmesi	Error! Bookmark not defined.
3.2.4 Faj protein profilleri.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.4.1 Fajların saflaştırılması ve konsantre edilmesi ...	Error! Bookmark not defined.
3.2.4.2 Faj protein profillerinin çıkarılması.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.5 Restriksiyon endonükleaz analizleri	Error! Bookmark not defined.
3.2.5.1 Faj DNA izolasyonu.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.5.2 Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim ...	Error! Bookmark not defined.
3.2.6 Faj replikasyon parametreleri.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.6.1 Konakçı suşların gelişme eğrilerinin çıkarılması.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.6.2 Latent dönem süresinin ve patlama büyüklüğünün belirlenmesi (Tek aşamalı gelişme testi).....	Error! Bookmark not defined.
3.2.6.3 Fajların plak etkinlikleri (EOP), % adsorbsiyon oranları ve plak morfolojileri.....	Error! Bookmark not defined.
4. BULGULAR	Error! Bookmark not defined.
4. 1 Fajların Konakçı Özgüllüklerinin Belirlenmesi (Litik Spektrum).....	Error! Bookmark not defined.
4.2 Fajların moleküler düzeyde tanımlanması	Error! Bookmark not defined.
4.2.1 Yapısal Proteinler	Error! Bookmark not defined.
4.2.1.1 <i>S. thermophilus</i> fajlarının yapısal protein profillerine göre tanımlanması.....	Error! Bookmark not defined.
4.2.1.2 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> fajlarının yapısal protein profillerine göre tanımlanması	Error! Bookmark not defined.
4. 2. 2 Restriksiyon endonükleaz kesim profilleri.....	Error! Bookmark not defined.
4. 2. 2. 1 <i>S. thermophilus</i> fajlarının restriksiyon endonükleaz kesim profillerine göre tanımlanması	Error! Bookmark not defined.
4.2.2.2 <i>Lb. bulgaricus</i> fajlarının restriksiyon endonükleaz kesim profillerine göre tanımlanması.....	Error! Bookmark not defined.
4. 3. Faj replikasyon parametreleri.....	Error! Bookmark not defined.
4. 3. 1 Konakçı suşların gelişme eğrilerinin çıkarılması.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.2 Latent dönem süresinin ve patlama büyüklüğünün belirlenmesi (Tek aşamalı gelişme testi).....	Error! Bookmark not defined.

4.3.3 Faj plak etkinlikleri (EOP), % adsorbsiyon oranları ve plak morfolojisi	Error!
Bookmark not defined.	
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	Error! Bookmark not defined.
5.1 <i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Fajlarının Konakçı Dizgeleri, Restriksiyon Endonükleaz Analizleri, Protein Profilleri ve Faj Replikasyon Parametreleri Esas Alınarak Sınıflandırılması	Error! Bookmark not defined.
5.1.1 Fajların konakçı özgüllükleri	Error! Bookmark not defined.
5.1.2 <i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Lactobacillus bulgaricus</i> fajlarının protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri	Error! Bookmark not defined.
5.1.2.1 <i>Streptococcus thermophilus</i> fajları.....	Error! Bookmark not defined.
5.1.2.2 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> fajları.....	Error! Bookmark not defined.
5.1.3 Faj replikasyon parametreleri.....	Error! Bookmark not defined.
5.1.3.1 Latent dönem süresinin ve patlama büyüklüğünün belirlenmesi (Tek aşamalı gelişme testi).....	Error! Bookmark not defined.
5.1.3.2 Faj plak etkinliği, adsorbsiyon oranı ve plak morfolojisi	Error! Bookmark not defined.
Bookmark not defined.	
6. SONUÇLARA İLİŞKİN ÖNERİLER.....	Error! Bookmark not defined.
KAYNAKLAR.....	Error! Bookmark not defined.
EK-1 ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ ve ÇÖZELTİLER.	Error!
Bookmark not defined.	
ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.

SİMGELER DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
kb	Kilobaz
kDa	KiloDalton
kob/ml	Mililitredeki koloni oluşturan birim
pfu/ml	Mililitredeki plak oluşturma birimi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	Tetra metil etilen diamin
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
SM	Faj Tamponu
FTS	Fizyolojik tuzlu su
u	unit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 λ fajının <i>EcoRI</i> ve <i>BamHI</i> enzimleri ile elde edilen restriksiyon haritası.....	16
Şekil 2.2 <i>E.coli</i> temperent λ fajının genom haritası.....	17
Şekil 2.3 Bradley Sınıflaması	26
Şekil 2.4 Bakteriyofaj familyaları.....	28
Şekil 2.5 <i>S. thermophilus</i> B3-X18 fajı.....	36
Şekil 2.6 <i>Lb. bulgaricus</i> Y4-X4 fajı.....	36
Şekil 4.1 <i>S. thermophilus</i> B3 suşlarına etkili fajların protein profilleri.....	69
Şekil 4.2 <i>S. thermophilus</i> 709 ve 231 suşlarına etkili fajların protein profilleri.....	70
Şekil 4.3 <i>S. thermophilus</i> B3, 709 ve 231 suşlarına etkili bazı fajların protein profilleri....	72
Şekil 4.4 Homolog konakçısı Y4 olan <i>Lb. bulgaricus</i> fajlarının protein profilleri.....	74
Şekil 4.5 Homolog konakçısı Y4 olan <i>Lb. bulgaricus</i> fajlarının majör proteinleri.....	75
Şekil 4.6 Homolog konakçısı V1 ve V2 olan <i>Lb. bulgaricus</i> fajlarının protein profilleri...	76
Şekil 4.7 Homolog konakçısı V1 ve V2 olan <i>Lb. bulgaricus</i> fajlarının sahip oldukları majör proteinler.....	77
Şekil 4.8 <i>S. thermophilus</i> faj DNA'larının <i>EcoRI</i> kesimi sonucu oluşan fragmentleri.....	79
Şekil 4.9 <i>S. thermophilus</i> faj DNA'larının <i>EcoRV</i> kesimi sonucu oluşan fragmentleri.....	81
Şekil 4.10 <i>EcoRV</i> kesimi sonucu oluşan fragmentlere göre fajların filogenetik uzaklıkları.....	83
Şekil 4.11 <i>S. thermophilus</i> faj DNA'larının <i>PvuII</i> kesimi sonucu oluşan fragmentleri.....	84
Şekil 4.12 <i>S. thermophilus</i> faj DNA'larının <i>ClaI</i> kesimi sonucu oluşan fragmentleri.....	86
Şekil 4.13 <i>S. thermophilus</i> faj DNA'larının <i>HindIII</i> kesimi sonucu oluşan fragmentleri (37°C'de 2 saat).....	88
Şekil 4.14 <i>S. thermophilus</i> faj DNA'larının <i>HindIII</i> kesimi sonucu oluşan fragmentleri (37°C'de 1 gece).....	89
Şekil 4.15 <i>S. thermophilus</i> faj DNA'larının <i>PstI</i> kesimi.....	91

Şekil 4.16 <i>S. thermophilus</i> faj DNA'larının <i>Bam</i> HI kesimi.....	92
Şekil 4.17 <i>S. thermophilus</i> faj DNA'larının <i>Hha</i> I kesimi.....	93
Şekil 4.18 <i>S. thermophilus</i> faj DNA'larının <i>Hha</i> I kesimi.....	94
Şekil 4.19 <i>S. thermophilus</i> faj DNA'larının <i>Hae</i> II kesimi.....	95
Şekil 4.20 <i>Lb. bulgaricus</i> faj DNA'larının <i>Eco</i> RI kesimi.....	97
Şekil 4.21 <i>Lb. bulgaricus</i> faj DNA'larının <i>Eco</i> RI kesimi.....	97
Şekil 4.22 <i>Lb. bulgaricus</i> faj DNA'larının <i>Eco</i> RI kesimi (2. ve 3. denemeler).....	99
Şekil 4.23 <i>Lb. bulgaricus</i> faj DNA'larının <i>Eco</i> RV kesimi.....	100
Şekil 4.24 <i>Lb. bulgaricus</i> V2 X21-X28 faj DNA'larının <i>Eco</i> RV kesimi.....	100
Şekil 4.25 <i>Lb. bulgaricus</i> faj DNA'larının <i>Pvu</i> II kesimi.....	102
Şekil 4.26 <i>Lb. bulgaricus</i> faj DNA'larının <i>Pvu</i> II kesimi	102
Şekil 4.27 <i>Lb. bulgaricus</i> faj DNA'larının <i>Pvu</i> II kesimi (tekrar).....	103
Şekil 4.28 <i>Lb. bulgaricus</i> faj DNA'larının <i>Hind</i> III kesimi.....	106
Şekil 4.29 <i>Lb. bulgaricus</i> suşlarına özgül faj DNA'larının <i>Hind</i> III kesim sonuçları.....	106
Şekil 4.30 <i>Lb. bulgaricus</i> suşlarına özgül faj DNA'larının <i>Hind</i> III kesim sonuçları (2. deneme).....	107
Şekil 4.31 <i>Lb. bulgaricus</i> suşlarına özgül faj DNA'larının <i>Hind</i> III kesim sonuçları (3. deneme).....	108
Şekil 4.32 <i>Lb. bulgaricus</i> faj DNA'larının <i>Bam</i> HI kesimi.....	109
Şekil 4.33 <i>Lb. bulgaricus</i> suşlarına özgül faj DNA'larının <i>Hha</i> I kesim sonuçları (2. deneme).....	110
Şekil 4.34 <i>Lb. bulgaricus</i> suşlarına özgül faj DNA'larının <i>Hha</i> I kesim sonuçları (3. deneme).....	111
Şekil 4. 35 B3 <i>S. thermophilus</i> suşunun gelişme eğrisi.....	113
Şekil 4.36 B3 <i>S. thermophilus</i> suşunun hücre sayısı.....	114
Şekil 4.37 709 <i>S. thermophilus</i> suşunun gelişme eğrisi.....	114
Şekil 4.38 709 <i>S. thermophilus</i> suşunun hücre sayısı.....	115
Şekil 4.39 Y4 <i>Lb. bulgaricus</i> suşunun gelişme eğrisi.....	116
Şekil 4.40 Y4 <i>Lb. bulgaricus</i> suşunun hücre sayısı.....	116
Şekil 4.41 V1 <i>Lb. bulgaricus</i> suşunun gelişme eğrisi.....	117
Şekil 4.42 V1 <i>Lb. bulgaricus</i> suşunun hücre sayısı.....	117
Şekil 4.43 B3-X19 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi (1. deneme).....	120
Şekil 4.44 B3-X19 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi (2. deneme).....	120
Şekil 4.45 B3-X19 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi (3. deneme).....	121
Şekil 4.46 B3-X19 fajının latent dönem süresi.....	121
Şekil 4.47 231-X9 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi.....	122
Şekil 4.48 231-X9 fajının latent dönem süresi.....	122
Şekil 4.49 2B3-A fajının tek aşamalı gelişme eğrisi.....	123
Şekil 4.50 231S-A1MÖ fajının tek aşamalı gelişme eğrisi.....	123
Şekil 4.51 231S-A1MÖ fajının latent dönem süresi.....	124
Şekil 4.52 709-X5 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi.....	124
Şekil 4.53 709-X5 fajının latent dönem süresi.....	125
Şekil 4.54 <i>Lb. bulgaricus</i> Y4-X12 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi.....	125
Şekil 4.55 <i>Lb. bulgaricus</i> Y4-X12 fajının latent dönem süresi.....	126

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Restriksiyon enzim tipleri, izolasyon kaynakları ve özellikleri.....	14
Çizelge 2.2 Bazı <i>S. thermophilus</i> suşlarının adsorbsiyon oranları ve EOP değerleri.....	22
Çizelge 2.3 Faj temel özellikleri ve sınıflaması (Ackermann Sınıflaması).....	27
Çizelge 2.4 Kuyruklu Faj Cinsleri	30
Çizelge 2.5 Süt fajlarının taksonomik durumları.....	34
Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan <i>S. thermophilus</i> fajlarının ; kodları, endüstriyel konakçıları, izolasyon materyali ve sağlandığı kaynaklar.....	50
Çizelge 3.2 Araştırmada kullanılan <i>Lb. bulgaricus</i> fajlarının ; kodları, endüstriyel konakçıları, izolasyon materyali ve sağlandığı kaynaklar.....	51
Çizelge 4.1 Pastörize sütlerden izole edilmiş 43 adet <i>S. thermophilus</i> suşu ile 1 adet ticari suşun değişik süt ürünlerinden izole edilmiş 10 adet <i>S.</i> <i>thermophilus</i> fajına karşı dirençlilikleri.....	62
Çizelge 4.2 Pastörize sütlerden izole edilmiş 43 adet <i>S. thermophilus</i> suşu ile 1 adet ticari suşun değişik süt ürünlerinden izole edilmiş 13 adet <i>Lb.</i> <i>bulgaricus</i> fajına karşı dirençlilikleri.....	64
Çizelge 4.3 1 adet endüstriyel, diğerleri pastörize sütlerden izole edilmiş toplam 13 adet <i>Lb. bulgaricus</i> suşunun çeşitli süt ürünlerinden izole edilmiş 13 adet <i>Lb. bulgaricus</i> fajına karşı dirençlilikleri.....	66
Çizelge 4.4 1 adet endüstriyel, diğerleri pastörize sütlerden izole edilmiş toplam 13 adet <i>Lb. bulgaricus</i> suşunun çeşitli süt ürünlerinden izole edilmiş 10 adet <i>S. thermophilus</i> fajına karşı dirençlilikleri.....	67
Çizelge 4.5 <i>S. thermophilus</i> ve <i>Lb. bulgaricus</i> suşlarına özgül fajların plak etkinlikleri (EOP).....	127
Çizelge 4.6 <i>S. thermophilus</i> ve <i>Lb. bulgaricus</i> suşlarına özgül fajların homolog ve heterolog konakçılarına adsorbe olma oranları.....	128

Çizelge 5.1 <i>S. thermophilus</i> ve <i>Lb. bulgaricus</i> fajlarının latent ve artış dönem süreleri ile patlama büyüklükleri.....	151
---	-----

1. GİRİŞ

Değişik fermente ürünlerin üretiminde olduğu gibi yoğurt sanayiinde de starter kültür kullanımı modern teknolojide vazgeçilmez bir uygulamadır. Standart tat, aroma ve kıvamda hijyenik ürün elde edilmesinde, teknolojik proses parametreleri ne denli önemli ise üreme yetenekleri ve fizyolojik verimlilikleri yüksek, bakteriyofajlara dirençli, lizogen olmayan aktif kültürlerin belirlenerek kullanılması da o kadar önemlidir. Ne var ki, bu bakteriler faj infeksiyonlarına karşı çok duyarlıdır. Faj infeksiyonları, yoğurt fabrikalarında ve termofilik kültürlerin kullanıldığı peynir işletmelerinde özellikle de bulk kültür üretim aşamasında, şiddetli faj atakları şeklinde ortaya çıkmakta, ürün ve zaman kaybına neden olmaktadır.

Faj sorunu ile sıklıkla karşılaşılması, bu fajların kontaminasyon kaynaklarının lizogen suşlar mı yoksa çiğ süt mü olduğunun araştırılmasına neden olmuştur ve bu konu hala tartışılmaktadır. Doğal ortamlarının çiğ süt olduğu düşünülen fajların, çeşitli pastörizasyon normlarında aktif kalabildiği görülmektedir. Diğer yandan, moleküler çalışmalar sayesinde temperent ve virulent fajlar arasında sadece lizogeni modüllerinden kaynaklanan farklılıklar olduğu ve genomların birbirlerine çok benzer olduğu tespit edilmektedir.

Starter kültür kullanımı standart kalitede ürün eldesini sağlamış, ancak faj problemini de beraberinde getirmiştir. Çalışılan fajlardan çoğunun kullanılan ticari kültürlerle virulent etkiye bulunması, bu şekilde düşünülmesine neden olmuştur. Starter kültür üreten firmalar bu problemi yaşayan süt işletmeleri için, kendi ürettikleri kültürlerden oluşan bir rotasyon programı sunmaktadır. Ancak firma tarafından önerilen rotasyon programı, kuvvetli faj ataklarında sorunu çözememektedir. Bunun başlıca iki önemli nedeni vardır: Eğer işletmede uzun süredir faj sorunu yaşıyorsa ve sıklıkla değişik yoğurt kültürleri rotasyona sokulmuşsa, işletme ortamında fajlar çeşitlenmiş ve

ortamdan tamamen çekilmeden belli faj titrelerinde varlıklarını sürdürmüşlerdir. Faj popülasyonu, farklı konak hücrelere özgül, çok sayıda dominant fajın oluşturduğu bir kokteyl haline dönüşmüştür. Bu durumda, hangi kültür devreye sokulursa sokulsun, kendisine özgül bir faj bulma olasılığı yüksektir. İkinci neden olarak starter kültür üreten firmaların kendi ülkelerindeki işletmelerden izole ettikleri faj koleksiyonu esas alınarak dirençli buldukları kültürleri veya ellerindeki fajlara karşı saptadıkları faj akrabalığı bulunmayan kültürleri rotasyon için önermeleridir. Starter ithal eden ülkelerdeki işletmelerin, yerel faj popülasyonu bilinmediği sürece bu öneriler fazla bir anlam taşımamaktadır. Çünkü faj-konakçı özgüllüğünde fajların ekolojilerinin de rol oynadığı düşünülmektedir. İşletme ortamında dominant hale geçen fajların izole edilmesi, kullanılan ve önerilen yoğurt kültürlerine karşı konakçı özgüllüklerinin belirlenmesi ve işletmenin kendisinin planlayacağı bir rotasyon sistemi ile kültürlerin kullanılması gerekmektedir. Bu işlemlerin işletmelerde rutin olarak ve sürekli yapılması sonucunda faj problemi kolaylıkla aşılabılır. Rotasyon programlarına ek olarak temizlik, dezenfeksiyon, direkt set kültürler ve faj inhibitör ortamlarının kullanımı da faja karşı önlem alınmasını sağlamaktadır.

Ülkemizde yoğurt işletmelerinde karşılaşılan fajların karakterizasyonlarına dair bilgilere, hem fabrika ortamlarında hem de bilimsel çalışmalarda rastlanmazken son yıllarda diğer ülkelerde termofilik fajların moleküler düzeyde tanımlanması ve sınıflamalarına ilişkin çalışmalar yoğunlaşmıştır. İlk olarak fajlar, konakçı dizgelerine, morfolojik yapılarına ve serolojik özelliklerine göre karakterize edilmiş, ancak bunlar tanımlama için yeterli kriterleri oluşturamadıklarından moleküler düzeyde çalışmalara ağırlık verilmiştir. Bu açığın kapatılması ve işletmelerin faj problemlerini kolayca atlatması amacıyla izole edilmiş yerel fajların karakterize edilmesi ve özellikleri bilinen bir koleksiyon oluşturulması büyük önem taşımaktadır.

Bu nedenle, TÜBİTAK-TARP-2106 no'lu "Yoğurt Fabrikalarında Faj Probleminin Çözümüne Yönelik Araştırmalar" konulu projede oluşturulan koleksiyondaki yerel fajlar ile Ankara Üniv. Biyoteknoloji Enstitüsü-67 no'lu "Yerel (doğal) *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* ile özgül fajlarının endüstriyel öneme sahip özellikler açısından

tanımlanarak alternatif starterlerin belirlenmesi” adlı proje kapsamında koleksiyona eklenen diğ er yerel fajların, konakçı dizgelerinin saptanması, protein profillerinin çıkarılması farklı restriksiyon enzimleri ile kesim şablonlarının belirlenmesi ve replikasyon parametrelerinin incelenmesi, doktora tezi olarak seçilen bu araştırmanın konusunu oluşturmaktadır. Bu şekilde yerel fajların hem moleküler karakterizasyonu hedeflenmiş, hem de olası faj sınıflandırması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Yoğurt Starter Kültürleri, Termofilik Fajlar ve Orijinleri

Laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) ve *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*), yoğurt üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Tamime and Robinson 1999). Termofilik karakterde olan bu bakterilerin en önemli teknolojik özellikleri, laktik asit üretim yetenekleridir (Suarez *et al.* 2002). Bunun yanı sıra, starter kültür olarak kullanıldıkları üründe standart kalitenin eldesi için, proteolitik ve antimikrobiyal aktiviteleri, asetaldehit üretim yetenekleri belirlenmelidir (Tamime and Robinson 1989). Bu özellikleri bilinen *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşları arasında oluşan simbiyotik ilişki sayesinde, yoğurda özgül koku, tat, aroma ve yoğunluk oluşmaktadır (Riemelt *et al.* 1996). Ayrıca, istenen kalitede ürün eldesi için kültürlerin bakteriyofajlara (faj) karşı duyarlı olup olmadığının da kontrol edilmesi gerekir. Aksi takdirde starter kültürlerden birinin bile ortamda bulunabilecek faj veya fajlara duyarlı olması durumunda, hücreler lize olacağından fermentasyon yavaşlayacak veya durma noktasına gelecek, ürün kaybı söz konusu olacak ve dolayısıyla kültürün sahip olduğu diğer özelliklerin bir anlamı olmayacaktır (Benbadis *et al.* 1990, Suarez *et al.* 2002, Quiberoni *et al.* 2003a, Lamothe *et al.* 2005).

Yoğurt ve diğer süt ürünlerinin üretiminde Chr. Hansen, Danisco, Ezal gibi özel laboratuvarlardan sağlanan starter kültürlerin kullanımı, beraberinde faj problemini getirmektedir (Yaygın and Kılıç 1993, Tunail vd. 2000). Böyle düşünülmesinin sebebi, ticari *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarından neredeyse hepsinin, çalışmalarda kullanılan yerel fajlara duyarlılık gösteriyor olmasıdır (Kaleli 2001, Suarez *et al.* 2002, Tunail vd. 2002, Quiberoni *et al.* 2003a, Özyurt 2005, Kahraman 2006).

Süt endüstrisinde fermentasyonların başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olan bu virulent fajların kaynağının, çiğ süt mü yoksa lizogenik starter kültürler mi olduğu,

günümüzde hala tartışılmaktadır. *Lactococcus* fajları söz konusu olduğunda; temperent ve virulent fajlar arasında homoloji saptanmadığından sorunun lizogenik suşlardan kaynaklandığı söylenemez. Ancak *Lactobacillus* ve *S. thermophilus* virulent ve temperent fajları arasında var olan homoloji, kaynağın lizogenik suşlar olduğunu düşündürmektedir (Mata *et al.* 1986, Lahbib-Mansais *et al.* 1988, Mikkonen *et al.* 1996, Tremblay and Moineau 1999). *Lactobacillus lactis* (*Lb. lactis*) virulent LL-H fajı ile *Lb. bulgaricus* temperent mv4 fajının majör kapsid proteinlerini kodlayan genler, nükleotit seviyesinde incelendiğinde % 92 (Desiere *et al.* 2002), amino asit seviyesinde incelendiğinde ise % 96 oranında benzer bulunmuştur. Aynı şekilde geç genlere ait sekanslarda da yüksek oranda benzerlik saptanmıştır. Tüm bunların aksine, integrasyon elementlerini kodlayan genler arasında çok büyük farklılıklar vardır ki; bu da LL-H fajının, başka bir faja ait integras ve faj almaç bölgelerinin kalıntılarını taşıdığını ve temperent bir fajdan oluştuğunu düşündürmektedir. Ancak, LL-H fajının mv4'den oluştuğunu söylemek mümkün görünmemektedir. Bununla birlikte her iki fajın yine de ortak temperent bir atadan geldikleri olasılığından söz edilmektedir. Litik ve/veya temperent iki faj genomu arasında veya bir faj ile konakçı genomu arasında gerçekleşebilen rekombinasyonlar sonucunda küçük ilaveler ve ayrılmaların, virulent LL-H fajının şu anki genom yapısının oluşmasına ve mv4 fajı ile yüksek benzerlik göstermesine neden olabileceği düşünülmektedir. Mata ve arkadaşlarının yaptıkları sınıflandırmada, LL-H ve mv4 dahil 'a' grubunda bulunan fajların tamamı *Lb. lactis* suşunda gelişebilmektedir. Dolayısıyla faj genomunda, rekombinasyonların ve yeniden düzenlenmelerin rahatlıkla gerçekleşebileceği anlaşılmaktadır (Mikkonen *et al.* 1996, Brüssow 2001, Brüssow and Suarez 2006). *S. thermophilus* fajlarından Sfi21 temperent fajının da, 6.6 kb büyüklüğündeki lizogeni modülünde bulunan 2.4 kb'lık bir bölgeyi kaybederek virulent faja dönüştüğü ve bu fajın Sfi19 litik fajından sadece % 10 oranında farklı olduğu rapor edilmiştir (Bruttin *et al.* 1997).

Genel olarak incelendiğinde lizogeninin kuyruklu fajların etkili olduğu bakterilerde (Ackermann 2006) ve dolayısıyla laktik asit bakterilerinde yaygın olduğu görülmektedir (Neve 1996). Bununla beraber laktokoklara ve laktobasillere oranla *S. thermophilus* suşlarında lizogeniye daha ender rastlanmaktadır (Cluzel *et al.* 1987, Sechaud *et al.* 1988, Davidson *et al.* 1990, Brüssow *et al.* 1994a, Neve 1996, Le Marrec

et al. 1997). Sechaud *et al.* (1988), 148 adet laktobasil suşunda % 27, 105 adet *Lb. bulgaricus* suşunda da % 9,5 oranında lizogeni saptamıştır. Fayard *et al.* (1993)'nin belirttiğine göre; Smaczny 1983'te 24 adet *S. thermophilus* suşundan 6 adedinin lizogenik olduğunu (% 25), Neve *et al.* de 17 adet *S. thermophilus* suşundan 2'sinin (% 12), lizogenik karakter gösterdiğini saptamışlar, ancak Carminatti ve Giraffa 1992'de 45 *S. thermophilus* suşunda lizogeni oranını % 2 olarak belirlemişler, yani yalnızca bir suşu indükleyerek temperent faj elde etmişlerdir. Aynı şekilde Brüssow *et al.* (1994a), 100 adet *S. thermophilus* suşundan sadece 2 adedinin (% 2), yine 196 adet *S. thermophilus* suşunda indüksiyon denemeleri yürüten Brüssow ve Bruttin (1995), suşlardan sadece 3 adedinin (% 1.53) lizogenik olduğunu göstermişlerdir ve bu çalışmaların sonucunda faj varlığını starter kültürlerle bağlamanın doğru olmayacağını belirtmişlerdir. Kaleli ve Tunail (2001), 30 adet doğal (yerel) *S. thermophilus* suşu ile ticari starter kökenli 9 adet *S. thermophilus* suşundan hiçbirinin mitomisin C ile, Kahraman (2006) ise toplam 127 adet yerel *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşlarından bir tanesinin bile mitomisin C yanında inkübasyon sıcaklığında artış ve ultra viyole ışığa maruz bırakma sonucunda indüklenmediğini, dolayısıyla lizogeniye rastlanmadığını belirtmişlerdir.

Bazı araştırmacıların faj kaynağının çiğ süt olduğunu düşünmelerinin nedeni, doğal ortamlarında bulunan laktik fajların, o bölgeye özgül yerel suşlar sayesinde çoğalabilmeleri ve pastörizasyon normlarında bile aktif kalabilmeleridir (Mikkonen *et al.* 1996, Moineau 1999, Binetti and Reinhammer 2000, Quiberoni *et al.* 2003b, Capra *et al.* 2004). Virüslerin inaktivasyonu, genel olarak 50–60° C civarında başlamakta, 32° C gibi çok düşük veya 70° C gibi yüksek sıcaklıklarda da gerçekleşebilmektedir (Luria and Darnell 1967). Binetti ve Reinhammer (2000), çalıştıkları *S. thermophilus* fajlarından bazılarının ancak 90° C'de 5 dk. tutulmaları durumunda inaktive olduklarını, Sozzi ve Maret tarafından çalışılan *S. thermophilus* fajlarından bir adedinin de, bir saat boyunca 65° C'ye tabi tutulması sonucu bile aktivitesini kaybetmediği, 72° C'de bir saat veya 90° C'de yirmi saniye tutulması durumunda ancak inaktive olduğunu belirtmişlerdir. Capra vd. (2004) tarafından çalışılan fajlar arasında ancak 90° C'de beş dakikalık ısıl işlemle inaktive olabilen (*Lb. delbrueckii* fajlarından biri olan lb3 fajı) fajlar olduğu gibi, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (*Lb. paracasei*) ve

Lactobacillus casei subsp. *casei* (*Lb. casei*) suşlarına özgül fajlardan, 63-72 °C’de 5 dakikadan az bir sürede aktivitesini tamamen kaybeden fajların da bulunduğu görülmüştür.

Faj probleminin önüne geçmek için, starter kültürlerin hazırlanmasında faj inhibitör ortamların kullanımı, yeni bir fabrika dizaynı, kültür hazırlama bölümünün tamamen fabrika ortamından ayrılması, DVI (direct vat inoculation) ve DVS (direct vat set) kullanımı, sanitasyon prosedürlerinin iyileştirilmesi, peynir üretiminde; peynir yapımı için kapalı düzeneklerin kullanılması, hijyenik çalışılması ve peynir altı suyunun boşaltımı sırasında dikkatli olunması gibi pek çok önlem alınabilmektedir. Ancak bu önlemler faj çoğalmasını sadece sınırlandırabilmekte, elimine edememektedir. Bu yüzden, ortamda baskın bulunan faj/fajlara dirençli starter kültürlerin rotasyona sokulması tercih edilmektedir (Moineau 1999, Yaygın ve Toklu 2000, Coffey and Ross 2002).

Termofilik fajlar hakkındaki bilgilerimiz, laktokok fajları ile kıyaslandığında sınırlıdır (Chow *et al.* 1988, Prevots *et al.* 1989, Benbadis *et al.* 1990). Çünkü laktokok fajları White ve Cox tarafından izole edildikleri 1935 yılından itibaren yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Termofilik fajlar ise daha az faj ataklarına sebep olduklarından, *S. thermophilus* fajı 1952-1953 yıllarında (Rasic and Kurmann 1978), *Lb. bulgaricus* fajı ise 1974 yılında (Reinbold *et al.* 1982) izole edilebilmiştir. Dolayısıyla çalışılmaya geç başlanmış ve daha az bilgi toplanabilmiştir (Tunail vd. 2000). Buna ek olarak, bu fajların izolasyonlarının ve plaklarının görülmesinin güç olduğu bilinmektedir (Reinbold and Reddy 1973).

Ülkemizde de starter kültür kullanımının artışıyla, diğer ülkelerde olduğu gibi öncelikle laktokok fajları üzerinde yoğunlaşmış (Öner 1986, Akçelik 1991, Durlu and Tunail 1991, Tunail ve Aşkın 1991, Akçelik and Tunail 1992, Aydar and Tunail 1995, Şanlıbaba 1999, Tuncer 2000), ancak asıl faj atağı 1996 yılında termofilik kültürlerin kullanıldığı yoğurt işletmelerinde görülmüş ve 16 adet *S. thermophilus* fajı izole edilmiştir. Bu araştırma, Türkiye’de *S. thermophilus* fajlarının izolasyonları, konakçı

özgüllüklerinin belirlenmesi ve dolayısıyla rotasyona girecek suşların tespiti üzerine yapılan ve çözüm getiren ilk çalışma olmuştur (Durlu-Özkaya vd. 1999).

2.2 Bakteriyofajların Yaşam Şekilleri

Çift zincirli DNA'ya sahip fajların, konakçıları üzerinde litik ve lizogenik olmak üzere iki tip yaşam şekli vardır. Litik yaşam şeklini seçen fajlar virulent faj, lizogenik yaşam şeklini seçenler ise temperent (ılımlı) faj olarak adlandırılır (Guttman *et al.* 2005). Fajın hangi yaşam döngüsüne gireceği *cro* ve *CI* proteinleri arasındaki yarışa bağlıdır. Çünkü ikisi de aynı operatör (O_L ve O_R) bölgesine bağlanabilmektedir. *Cro* ve *CI*, operatörde bulunan 3 adet bağlanma bölgesine ters yönlerden tutunabilmektedir. *CI* proteini, lizogenik döngünün; *cro* proteini ise litik döngünün başlaması ve devamı için gereklidir. Proteinlerden hangisi operatörün öncelik verdiği bölgeye bağlanırsa, kendi sentezini stimüle ederken diğer proteinin sentezini bloke eder. Buna göre de lizogenik veya litik yaşam başlamış olur. T4 fajı, virulent fajların; λ fajı ise temperent fajların prototip örneği olarak kabul edilmektedir (Hendrix 2002b, Lerner ve Lerner 2003).

Her iki yaşam tipinde de, fajın konakçısına adsorbsiyonu ve DNA'sını enjekte etme aşamaları ortaktır (Birge 2000, Guttman *et al.* 2005). Kuyruklu fajlarda fibril, kuyruk plağı gibi özel adsorbsiyon yapıları, konakçı üzerindeki belirli moleküllere bağlanır. Gram negatif bakterilerde proteinler, oligosakkaritler, lipopolisakkaritler faj reseptörleri olarak görev yaparlarken; Gram pozitif bakterilerde daha kompleks olan murein tabakası, daha farklı bağlanma bölgelerini gerektirir. Birçok fajın konakçıya adsorbe olması, adsorbe olma hızı ve etkinliği, bazı maddelerin ortamda yüksek konsantrasyonda bulunmasına ve konakçının fizyolojik durumuna bağlıdır. Örneğin, T4 tipi fajlar iki ayrı aşamada ve farklı iki reseptöre bağlanarak konakçılarına adsorbe olabilmektedirler. T4 fajı, ortamda L-triptofan olması durumunda konakçısına daha etkin şekilde bağlanabilirken; λ fajı reseptörü, ancak maltoz varlığında aktive olmaktadır. *S. thermophilus* (Le Marrec *et al.* 1997), *Lb. bulgaricus* (Yoon *et al.* 2001) ve T1-T7 grubu fajlarının da konakçılarına adsorbe olabilmeleri için gereken Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} gibi iyonların, optimum konsantrasyonları belirlenmiştir. Fajın

dönüşümsüz olarak hücre yüzeyine bağlanmasından sonra, faj DNA'sı kuyruk içerisinden geçerek konakçı hücre sitoplazmasına bırakılır. Kuyruk ucu, hücre membranında bulunan peptidoglikan tabakayı delici bir enzim sistemine sahiptir. Hücre yüzeyine bağlı olan kuyruk, DNA'nın, konakçıya uygun bir şekilde bağlanana kadar, kapsidde kalmasını sağlamaktadır (Garen and Kozloff 1959, Luria and Darnell 1967, Guttman *et al.* 2005).

2.2.1 Litik yaşam döngüsü

Litik döngü, lizogenik döngüden 'Latent Dönem' olarak adlandırılan periyodun başlaması ile ayrılır. Çünkü faj DNA'sının hücre içine alınmasıyla, konakçı RNA polimeraz enzimi devreye girer ve erken genlerin transkripsiyonu başlar. Bu gen ürünleri, faj genomunu konakçı tarafından sentezlenen endonükleazlara karşı korumakta ve fajın ihtiyacına göre konakçıda tekrar yapılanmayı sağlayabilmektedir. Ayrıca, konakçı proteazlarını ve diğer bazı proteinleri inaktive edebilmektedir. Daha sonra, orta (middle) genlerin transkripsiyonu ile yeni faj DNA'sının sentezi gerçekleşmektedir. Son olarak, geç genlerin kodlanması ile faj partikülünün kapsid, kuyruk, kuyruk fibrilleri gibi parçalarının üretimi, dolayısıyla faja özgül şekil oluşumu (morphogenesis) başlamaktadır (Hendrix 2002b). Prokapsid olarak adlandırılan tam yapılanmamış ikosahedral protein kılıf içerisinde, faj DNA'sı paketlenmekte ve kuyruk ile kapsid birleştirilmektedir (Klug and Cummings 2000). Litik döngünün son aşaması, konakçı hücrenin lizize uğratılmasıdır. Kuyruklu fajlar, lizizin gerçekleşmesi için iki bileşen kullanmaktadır. Bunlardan, 'lisin' enzimi peptidoglikan matriks içerisinde kesim yaparken; 'holin' adlı ikinci enzim de, iç membranda porlar açarak lisin enziminin peptidoglikan tabakaya ulaşmasını ve hücre lizisinin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (Guttman *et al.* 2005).

2.2.2 Lizogenik yaşam döngüsü

Lizogenik durum, CI, CII ve CIII kodlu üç viral proteinin varlığına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Viral DNA'nın hücreye girişiyle birlikte, CI proteininin üretimi başlamakta ve bu protein sayesinde yeni faj partiküllerinin üretimi için gereken bilginin genom üzerinden okunması engellenmektedir. Dolayısıyla, litik döngüye geçiş mümkün olamamaktadır. Sitoplazmada dairesel formda bulunan viral DNA; ya plazmid formunda kalmaya devam eder, ya da konakçı genomuna entegre olmaya başlar. İntegrasyon, *attP* ve *attB* bölgeleri arasında gerçekleşmektedir. CI proteininden sonra üretilmeye başlanan CII proteini, konakçı transkripsiyon organellerini kullanarak CI üretiminin devamını sağlarken; CIII proteini de, CII'nin konakçı enzimleri tarafından parçalanmasına engel olmaktadır. CI proteininin *cro* proteinine oranla daha fazla üretilmesi, viral genomun konakçı genomuna entegre olmasını indüklemektedir. İntegrasyon tamamlandığında ise, sadece CI'in üretimi söz konusudur. Buradan, lizogenik durumun oluşumunun ve devamının, CI, CII ve CIII proteinlerinin varlığına bağlı olduğu açık bir şekilde anlaşılmaktadır. (Hendrix 2002b, Lerner and Lerner 2003). Bakteri genomuna entegre olmuş faj DNA'sına 'profaj', profajı taşıyan bakteriye de 'lizogen bakteri' adı verilmektedir. Artık viral DNA, konakçı DNA'sı ile aynı hızda replike olmakta ve kardeş hücrelere geçmektedir. Konakçı hücre viral DNA'yı taşıdığından, enfeksiyon durumu da devam etmekte ve dolayısıyla aynı karakterdeki başka bir faj ile enfeksiyonu söz konusu olamamaktadır. Bu duruma 'süperenfeksiyon' denilmekte ve faj direnç sistemlerinden biri olarak da kabul edilmektedir. Profajın; UV, mitomisin C, mutajenik maddeler ve inkübasyon sıcaklığındaki değişim ile indüklenemediği bilinmektedir (Sanders 1988, Davidson *et al.* 1990, Lahbib-Mansais *et al.* 1992, Arendt *et al.* 1993, Brüssow *et al.* 1994a, Neve 1996, Birge 2000, Hendrix 2002b, Lerner and Lerner 2003).

2.3 Faj Direnç Mekanizmaları

Faj adsorbsiyonunun ve DNA injeksiyonunun engellenmesi, abortif enfeksiyon ve restriksiyon/modifikasyon sistemleri olmak üzere; bilinen 4 adet faj direnç mekanizması bulunmaktadır (Moineau 1999). Adsorbsiyonun engellenmesi şeklindeki direnç mekanizmasının genetik işleyişi tam anlaşılamamıştır. Fiziksel mekanizması ise,

hücre yüzeyindeki faj reseptör bölgelerinin değişmiş olması veya konakçı tarafından üretilen bir madde ile bloke edilmesi şeklinde açıklanmıştır. Diğer bir mekanizma olan faj DNA injeksiyonunun engellenmesi de, yine hücre yüzeyinden kaynaklanmaktadır. Abortif infeksiyonda ise, faj DNA'sı hücre içine kabul edilmekte, ancak daha sonra faj DNA replikasyonuna, RNA transkripsiyonuna, translasyona, yapısal proteinlerin sentezlenmesine veya DNA paketleme sistemine müdahale edilmektedir. (Hill 1993, Garvey *et al.* 1995, Forde and Fitzgerald 1999, Coffey and Ross 2002, McGrath *et al.* 2002). Virulent ve temperent fajlara karşı *Lb. lactis* ve *Lb. bulgaricus* lizogen ve profajları indüklenmiş suşların duyarlılığının tespit edildiği bir çalışmada, fajların tamamının *Lb. bulgaricus* LT4 suşu dahil profajını yitirmiş tüm suşlarda geliştiği; lizogenik tüm suşların ise, fajların tamamına direnç gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda, LT4 lizogen suşundan izole edilen mv4 temperent fajının, bu suşlarda adsorbsiyonunun % 85-% 95 olarak bulunması, suşların dirençlilik mekanizmalarının adsorbsiyon aşamaları ile ilgili olmadığını göstermiştir (Lahbib-Mansais *et al.* 1992).

Diğer bir faj direnç mekanizması olan restriksiyon/modifikasyon sistemi, iki enzim aktivitesinden oluşan bir sistemdir ve aynı veya farklı protein moleküllerini kodlayan DNA bölgeleri üzerinde etkili olabilmektedir. Bir enzim, aktivite gösterebilmek için tanıma dizisinin varlığına gereksinim duyar. Bu sekanslar, az veya çok spesifik baz dizilerinden oluşur ve enzim aktivite gösterdiğinde her iki tarafta birbirine benzer uçlar oluşur (Birge 2000, Blumenthal and Cheng 2002).

Modifikasyon enzimi, DNA molekülü üzerindeki tanıma dizisinde bulunan belirli bölge ya da bölgelere genellikle metil grubu ekleyerek, kimyasal bir değişimin gerçekleşmesini sağlar. Böylece, konakçı kendi DNA'sını yabancı DNA'ya karşı korur. Restriksiyon enzimi ise, modifiye olmuş tanıma bölgesinin oluşumu ile uyarılır. Konakçı, kendi metabolizmasını yabancı bakteriyel veya viral DNA'ya karşı korumak amacıyla, aktif hale geçen endonükleaz enziminin bu DNA'lar üzerinde kesim yapmasını sağlar (Birge 2000, Lerner and Lerner 2003). Bu sistemin varlığına bağlı olarak, fajların plak oluşturma etkinliklerinde (EOP) düşüş olduğu tespit edilmiştir

(Garvey *et al.* 1995, Forde and Fitzgerald 1999, Coffey and Ross 2002, Blumenthal and Cheng 2002).

Restriksiyon/modifikasyon sistemleri, enzimlerin alt ünitelerinin kompozisyonlarına ve kofaktör ihtiyaçlarına göre sınıflara ayrılmıştır (Blumenthal and Cheng 2002). Bazı literatürde bu enzimler 3 tip olarak gruplandırılmışken (Sambrook *et al.* 1989, Solow and Somkuti 2001, Öztürk vd. 2002, Lerner and Lerner 2003, Simmer and Secko 2003), bazılarında 4 tip oldukları veya dördüncü grubun eklenmesi gerektiği belirtilmiştir (Birge 2000, Blumenthal and Cheng 2002).

Tip I enzimleri, sadece enterik bakteriler tarafından üretilmekte ve tanıma bölgelerinin 1000 bp ötesinde özgül olmayan bölgelerden kesim yapmaktadırlar (Solow and Somkuti 2001). *EcoBI* ve *EcoKI* enzimleri, bu grup içinde en çok çalışılan ve bilinen enzimlerdir. Bu enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için ATP, magnezyum iyonları ve S-adenozilmetionin (SAM)'a ihtiyaçları vardır (Birge 2000, Lerner and Lerner 2003).

Tip II enzimleri, kesimleri daima belirli tanıma dizilerinden yaparlar. Aktivite göstermeleri için metilaz ve restriksiyon proteinlerine ihtiyaç duymazlar. Dolayısıyla, bu enzimler hakkında bilgi edinmek çok daha kolaydır ve bilinen 600'den fazla enzim bulunmaktadır. Bu enzimlerin tanıma dizileri 4-7 baz uzunluğundadır. Farklı organizmalardan izole edilen, ama hep aynı diziyi tanıyan enzimler vardır ve bunlar 'izoşizomer' olarak adlandırılırlar (Birge 2000). Farklı genomların restriksiyon haritalarının çıkarılmasında ve rekombinant DNA teknolojisinde Tip II restriksiyon enzimlerinden yararlanılmaktadır (Lerner and Lerner 2003).

Tip III enzimleri, 24-26 bp'lik kısa asimetric dizileri tanıyarak kesim yaparlar. Ancak bir protein ile kompleks oluşturmaları durumunda fonksiyonel hale geçebilmekte ve kesim yapacağı bölgeyi tanıyabilmektedirler (Birge 2000, Lerner ve Lerner 2003).

Dördüncü tip restriksiyon enzimleri söz konusu olduğunda, konakçı DNA'sını metilleyerek yabancı DNA'ya karşı korumak mümkün olamamaktadır. Aynı baz dizilimini tanıyan (izoşizomer) *HpaII* ve *MspI* enzimleri, buna en güzel örnektir. *HpaII* enzimi, tanıma bölgesinin metillenmesi durumunda kesim yapamazken; *MspI* enziminin kesim yapabilmesi için tanıma sekansının metillenmesi gerekmektedir (Birge 2000). *E. coli* üzerinde etkili olan T4 fajında ise, durum biraz daha farklıdır. T4 fajı tarafından infekte olan bir bakteri, kendi DNA'sını metilleyerek endonükleazlara karşı korumaktadır. Ancak, bu enzimler hidroksimetil grupları tarafından bloke edildiği için T4 DNA'sı üzerine etkili olamamaktadırlar. Bunun yanı sıra *E. coli*, yabancı DNA üzerindeki 5-hidroksimetilsitozini tanıyan nükleaz enzimine sahiptir. Ancak T4 fajı, kendi DNA'sında bulunan 5-hidroksimetilsitozin gruplarına glukoz bağlayarak bu enzimi de etkisiz hale getirmektedir (Guttmann and Kutter 2002). T4 gibi diğer bazı fajlar da, kendilerini restriksiyon enzimlerine karşı koruyabilmektedir. Enzimler, faj DNA'sı üzerinde kesim yapabilmek için, öncelikle kesim dizilerini tarayıp bulmak zorundadırlar ki; bu zaman alıcı bir işlemdir. Buna ek olarak fajlar, enzimleri inhibe eden proteinler de üretebilmektedirler. T7 fajı *ocr* proteini ile tip I enzimlerini bloke ederek, bazı *Bacillus* fajları da kendi DNA'larını metilleyerek restriksiyon enzimlerden korunabilmektedirler (Birge 2000). Farklı cinslere ait fajlarda da, buna benzer durumlarla karşılaşmaktadır. *S. thermophilus* BSN45 suşundan izole edilen *SsII* adlı restriksiyon enziminin, diğer *S. thermophilus* suşlarına özgül faj DNA'larında 5-12 fragment oluşumuna neden olurken; aynı enzimin, kendisinin izole edildiği suşun homolog fajına ($\Phi 15$) etkili olamadığı tespit edilmiştir. Bu durumun, $\Phi 15$ 'in taşıdığı modifikasyon sisteminden kaynaklandığı düşünülmüştür. Çünkü, *SsII* enziminin izoşizomerleri olan *BstNI* ve *MvaI* enzimlerinin $\Phi 15$ DNA'sı üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Benbadis *et al.* 1991).

Endonükleazlar, kesim sonrası üç tip fragment oluşumuna neden olurlar. Tanıma bölgelerinin ortasından kesim yapmaları durumunda, oluşan fragmentler 'küt (blunt, pac) uç' a sahip olmaktadır. Tanıma sekanslarının merkezine göre simetrik bölgelerden kesim yapıldığında ise, her bir fragmentin sonunda tek bir DNA zincirinin oluştuğu görülmektedir. Fragmentin ucunda oluşan kuyruk şeklindeki bu tek DNA zincirinde; eğer kesim *BamHI*'in yaptığı gibi merkezin solundan olursa 5'uç, *PstI*'ın yaptığı gibi

merkezin sağından olursa 3' uç oluşmaktadır. Bu tip uçlar da 'yapışkan (cohesive, cos) uç' olarak adlandırılmaktadır. Bu DNA parçaları, yapışkan uçları sayesinde hidrojen bağları oluşturarak farklı fragmentlere bağlanabilmektedirler (Birge 2000, Klug and Cummings 2000, Öztürk vd. 2002, Lerner and Lerner 2003).

Restriksiyon endonükleazlar, kendilerini üreten organizmaların cins ve türü ile adlandırılmakta ve italik yazılmaktadırlar. Bir organizmanın birden fazla restriksiyon enzimi üretmesi durumunda, enzimlerin farklılığı Romen rakamlarının eklenmesi ile belirtilmektedir (Birge 2000, Lerner and Lerner 2003). Çizelge 2.1'de, bu bölümde anlatılan farklı tiplerdeki restriksiyon endonükleazlar ile tanıma dizileri ve izolasyon kaynakları verilmiştir (Birge 2000).

Çizelge 2.1 Restriksiyon enzim tipleri, izolasyon kaynakları ve özellikleri

Enzim	Kaynağı	Tanım Bölgesi
Tip I		
<i>EcoBI</i>	<i>Escherichia coli</i> B	TGÂ(N ₈)TGCT
Tip II		
Simetrik		
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	G/GÂTCC
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	G/AÂTTC
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	ÂTGCÂ/G
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	GÂC(N ₄)/NGGÂ
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otidis-caviarum</i>	GC/GGÂÂGC
Dejenere Simetrik		
<i>HaeII</i>	<i>Hemophilus aegyptius</i>	PuGÂGC/Py
Asimetrik		
		5'GACGÂ(N ₅)/3'
<i>HgaI</i>	<i>Hemophilus gallinarum</i>	3'ÂTGCG(N ₅ ₁₀)/5'
Tip III		
		5'AGÂCC3'
<i>EcoPI</i>	<i>Escherichia coli</i> (PI Lizogen)	3'TCTGG5'
Py: Pirimidin	Pu: Purin	N: Herhangi bir nükleotit
		Â: Metilasyon Bölgesi

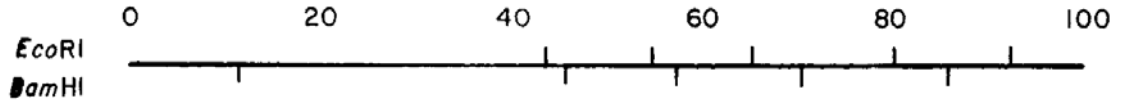
Bugüne kadar, *Lactococcus lactis* ve *S. thermophilus* suşlarında 21 adet Abortif İnfeksiyon (Abi), 29 adet Restriksiyon/Modifikasyon sistemleri ile Adsorbsiyonun Engellenmesi (AI) ve DNA injeksiyonunun bloke edilmesi şeklindeki direnç mekanizmalarının tanımı ve moleküler karakterizasyonları yapılmıştır (Forde and Fitzgerald 1999, Coffey and Ross 2002). Guimont *et al.* (1993), çalıştıkları 9 adet *S. thermophilus* suşundan CNRZ 455 kodlu olan suşta Tip II restriksiyon/modifikasyon direnç mekanizması olduğunu tespit etmişlerdir. Solow ve Somkuti (2001), tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise üç farklı *S. thermophilus* suşundan 3 adet plazmid izole edilmiş ve bunlardan birinin Tip I restriksiyon/modifikasyon sistemini kodladığı bulunmuştur. Ayrıca başka bir çalışmada Moineau vd., Madse ve Josephsen, Lubys ve Januleitis ile Benbadis vd. tarafından, bazı *S. thermophilus* suşlarında Tip II restriksiyon/modifikasyon sisteminin varlığının saptandığı ve plazmidde kodlu olduğunu belirtilmiştir (Geis *et al.* 2003). *Lactobacillus* cinsine ait türlerden de, *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus helveticus*'da restriksiyon-modifikasyon tipi direnç mekanizmaları tanımlanmıştır (Auad *et al.* 1998).

Faj direnç mekanizmaları, çoğunlukla plazmidde kodludur. Starter kültürler arasında yatay gen transferleri ile yer değiştirebilen direnç mekanizmaları, aynı zamanda bakteriyel konjugasyonla da bakteriden bakteriye geçebilmektedir (Forde and Fitzgerald 1999, Coffey and Ross 2002).

Küçük DNA moleküllerini çabucak karakterize etmek için restriksiyon haritalarını çıkarmak, iyi bir yaklaşımdır. Çünkü, eğer iki tip canlıya ait DNA molekülü farklı enzimlerle kesildiklerinde her bir enzim kesimi için aynı büyüklükte fragmentler veriyorsa, bu canlılar muhtemelen identiktir. Eğer farklı büyüklükte fragment oluşumları gözlemlendiyse, bu canlılar bazı DNA dizilerinde heterojenlik gösteriyor demektir.

Restriksiyon haritası, DNA molekülü üzerindeki farklı restriksiyon endonükleaz enzimlerine özgül tanıma sekanslarını göstermektedir. Restriksiyon haritası çıkarmak için, DNA önce bir enzimle, sonra daha başka bir enzimle kesilir. İlk enzimle kesim

sonucu oluşan fragmentlerde, ikinci enzimin tanıma dizileri olabilir. Şekil 2.1’de, λ DNA’sının *EcoRI* ve *BamHI* ile kesimleri sonucu oluşan restriksiyon haritası görülmektedir. Bu, çok basit bir örnektir (Birge 2000, Lerner and Lerner 2003). Şekil 2.2’de, daha fazla enzim kullanılarak çıkarılan kompleks bir gen haritası verilmiştir (Prescott *et al.* 1993).

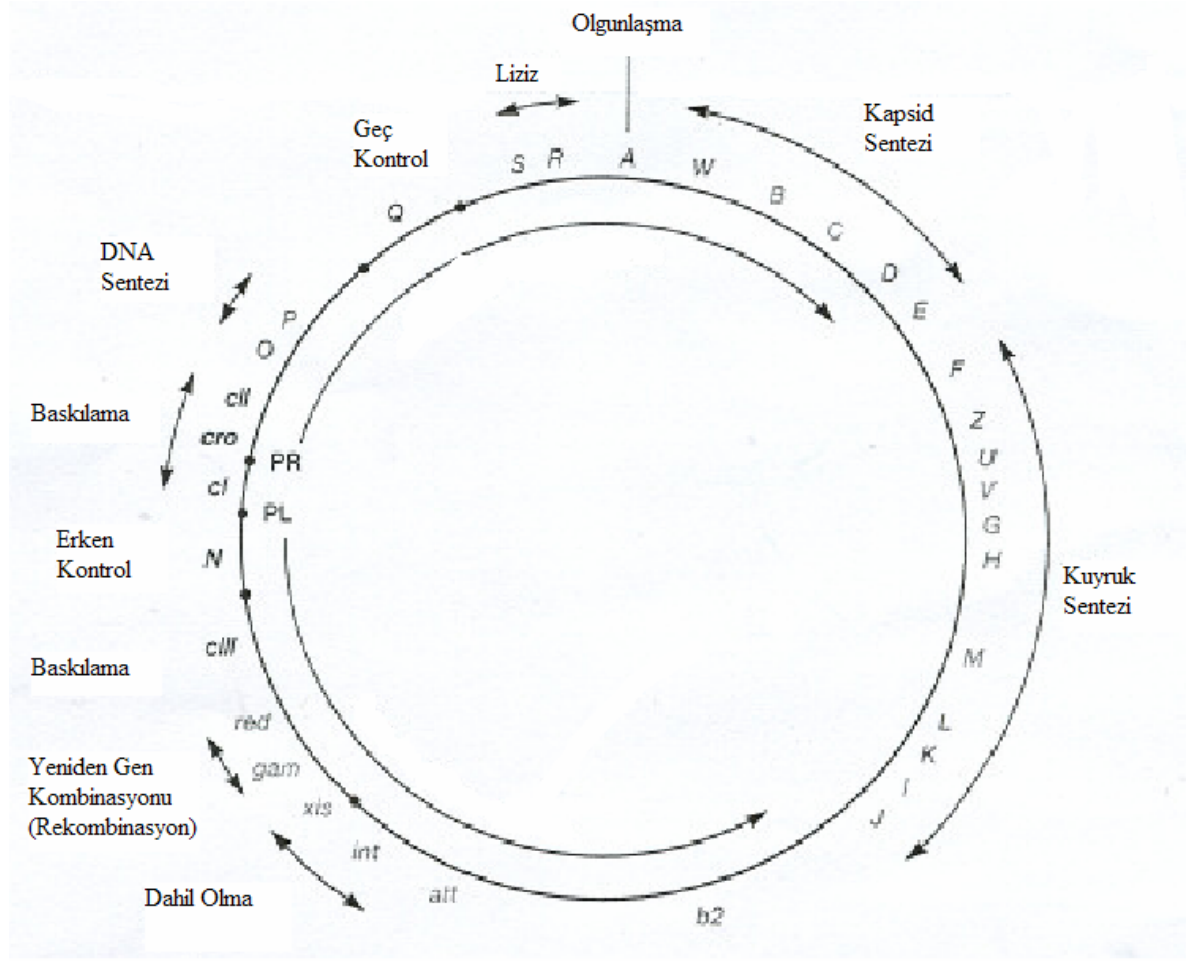


Şekil 2.1 λ fajının *EcoRI* ve *BamHI* enzimleri ile elde edilen restriksiyon haritası (Birge 2000)

2.4 Faj Replikasyon Parametreleri

Faj gelişme parametreleri denildiğinde, fajın konakçısına adsorbe olma oranı, farklı konakçılar üzerinde plak oluşturma etkinlikleri, plak çapları, latent ve artış dönem süreleri ile patlama büyüklükleri akla gelmektedir. Bunlardan latent ve artış dönemleri ile patlama büyüklükleri, tek aşamalı gelişme eğrileri çıkartılarak belirlenmektedir.

Fajların tek aşamalı gelişim eğrilerinin çıkarılması, konakçılarına adsorbe oranlarının bulunması ve titrelerinin artırılması amacıyla yapılan çalışmalarda, başlangıçta karıştırılan faj ve bakteri sayısı önemlidir ve kesin olarak bilinmelidir. Faj ile konakçı hücre arasındaki ilişki, ‘İnfeksiyon Çokluğu (MOI = Multiplicity of Infection)’ değeri ile verilmektedir. İnfeksiyon çokluğu, konakçı başına düşen infektif faj sayısı olarak tanımlanmaktadır. MOI değeri 1’den küçük olduğunda, litik yol avantajlıdır. Çünkü infekte olmayan çok sayıda hücre, infekte olan hücredeki birinci kuşak fajlara konak hücre görevi görür. Faj temperent karakterli ise, ki çoğu laktik faj böyledir; lizogeninin önlenmesi, daha açık bir ifadeyle bakterinin çoklu infeksiyondan korunması gerekir.



Şekil 2.2 *E. coli* temperant λ fajının genom haritası (Prescott *et al.* 1993)

Çoklu infeksiyon olması durumunda latent dönemin kısaldığı ve patlama büyüklüğünün arttığı savunulsa da, Ellis ve Delbrück (1939), $MOI = 4$ olacak şekilde deneme kurduklarında ortamda dört kat fazla faj olmasına karşın; hem patlama büyüklüğünde hem de latent dönem süresinde dikkate değer bir değişiklik olmadığını görmüşlerdir. Bununla birlikte, 0.00001'den 5'e kadar farklı MOI değerleri ile çalışan birçok araştırmacı bulunmaktadır (Sanders and Klaenhammer 1980, Klaenhammer and Sanozky 1985, Budde-Niekiel and Teuber 1987, Gautier and Chopin 1987, Chow *et al.* 1988, Larbi *et al.* 1990, Reyes-Gavillon *et al.* 1990, Sing and Klaenhammer 1990, Suarez *et al.* 2002).

$$\text{MOI (Multiplicity of Infection)} = \frac{\text{Faj titresi (pfu)}}{\text{Bakteri sayısı (kob)}}$$

2.4.1 Tek aşamalı gelişme eğrisi

Tek aşamalı gelişme eğrisinin çıkarılması ve fajın konakçısına adsorbe olma oranının tespiti için, MOI değeri belirlenerek belirli sayıda faj, konakçısı ile karıştırılır. Çalışılan bakterinin gelişme sıcaklığında, adsorbsiyonun gerçekleşmesi için belirli bir süre beklenir. Adsorbsiyondan sonra faj-bakteri karışımı santrifüjlenerek, adsorbe olmayan fajlar ortamdan ayrılır. Ortaya çıkacak olan fajların adsorbe olunmamış hücrelere ve hücre kalıntılarına tutunmaması için, elde edilen pelet 10 ml sıvı besiyerinde çözülüp dilüsyonları hazırlanarak seyreltilir. Belirli aralıklarla dilüsyonlardan örnekler alınır ve faj sayısı (infektif merkez), agar ortamında belirlenir (Guttman *et al.* 2005). ‘Latent Dönem’ olarak adlandırılan periyotta, olgun faja rastlanmaz ve faj plak sayısı sabit kalır. Latent dönem sonunda hücreler patlayarak fajların ortama salınması ile birden yükselen sayı, daha sonra sabit kalır. Lizis sona erdiği zaman elde edilen faj sayısının latent dönem boyunca sabit kalan faj sayısına oranlanmasıyla, ‘Patlama Büyüklüğü’ elde edilir. (Mathews 1971, Cann 2001, Guttman *et al.* 2005). Patlama büyüklüğü ve latent dönem, belirli ve sabit koşullarda her bir faj türüne spesifiktir. Ancak kullanılan konakçıya, konakçının bölünme periyoduna, ortama ve sıcaklığa bağlı olarak değişiklik gösterir. Ellis ve Delbrück tarafından yapılan bir denemede, 16.6°C, 25°C ve 37°C olarak ayarlanmış inkübasyon sıcaklıklarında; patlama büyüklüğünde değişim olmazken, sıcaklık düşmesine bağlı olarak latent dönemin 30 dk.’dan 180 dk.’ya uzadığı belirlenmiştir. Konakçı hücrenin saf sentetik ortamlarda kolayca gelişebilmesinin çok önemli olduğunu belirten araştırmacılar, gelişme ortamının miktarının ve kimyasal açıdan bileşiminin iyi tanımlanmış olmasının, ayrıca denemenin de kontrollü koşullar altında gerçekleşmesinin gerekliliğini vurgulamışlardır.

Araştırmacılar, *E. coli*’ye özgül bir fajın tek aşamalı gelişme eğrisini üç farklı günde tekrarlamışlar, plak sayılarında farklılıklar görülse de hep aynı eğriyi elde etmişlerdir. Bunun, tüm preparatların aynı koşullar altında hazırlanması ve saklanması durumunda

mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Yaptıkları tüm çalışmalar sonucunda, latent dönem süresinin; sabit koşullar altında elde edilen minimum değeriyle bu değerin iki katı arasında değişiklik gösterebildiğini tespit etmişlerdir (Ellis and Delbrück 1939).

Chow vd. (1988), çalıştıkları *Lb. bulgaricus* CH2 suşuna etkili ch2 fajının latent dönemi ile patlama büyüklüğünü sırasıyla 40 dk. ve 130 adet faj partikülü olarak bulmuşken; Lahbib-Mansais vd. (1992), mv4 *Lb. bulgaricus* temperent fajının bu değerlerinin, sırasıyla 60 dk ve 45 adet faj partikülü olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer bazı *Lb. bulgaricus* fajlarında ise, latent dönemin 30 dakikadan kısa sürdüğü ve patlama büyüklüklerinin 50 ile 65 arasında değiştiği belirtilmiştir (Suarez *et al.* 2002). Başka bir araştırmada, *Lb. bulgaricus* YSD V, Ab₁, LB-lb3 kodlu suşlara özgül BYM, YAB ve lb3 fajlarının patlama büyüklüklerinin, sırasıyla 23, 27 ve 48; patlama sürelerinin ise 60, 80 ve 80 dk olduğu saptanmış, latent dönemlerinin de 40 dakikadan daha az olduğu tespit edilmiştir (Quiberoni *et al.* 2004). Farklı *Lactobacillus* türlerine ait fajların patlama büyüklüklerinin de, optimum koşullarda 20-100 adet arasında değiştiği tespit edilmiştir (Chow *et al.* 1988, Sechaud *et al.* 1988, Lu *et al.* 2003). *S. thermophilus* suşlarına özgül fajların latent dönem sürelerine bakıldığında, *Lb. bulgaricus* fajlarına benzerlik gösterdiği (25-30 dakika), ancak patlama büyüklüklerinin çok daha fazla olduğu görülmektedir.

Larbi ve arkadaşları, restriksiyon endonükleaz kesim şablonlarına göre iki gruba ayırdıkları *S. thermophilus* fajlarına ait patlama büyüklüklerinin 88 ve 56 faj partikülü, latent dönemlerinin ise 25'er dk. olduğunu tespit etmişlerdir (Larbi *et al.* 1990). Başka bir çalışmada da, *S. thermophilus* DT1 suşuna özgül fajın patlama büyüklüğü 276±36; latent dönemi de yaklaşık 25 dk. olarak bulunmuştur (Tremblay and Moineau 1999). Suarez vd. (2002) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, *S. thermophilus* fajlarına ait patlama büyüklüklerinin 300-600 arasında olduğu ve patlamanın başlangıcından bitişine kadar 140-200 dk. geçtiği belirtilmiştir. Termofilik fajların aksine, mezofilik *Lactococcus* fajlarında latent dönemin 9 dk ile 109 dk arasında geniş bir aralıkta gerçekleştiği, ağırlıklı olarak 20-60 dk. civarında olduğu ve patlama büyüklüklerinin

10-120, nadiren 235 faj partikülü olarak bulunduğu belirtilmiştir (Suarez *et al.* 2002, şanlıbaba 2003).

Sıcaklığın fajların konakçılara adsorbsiyonları üzerinde etkili olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada; 0, 10, 20, 30, 37, 45 ve 50°C'lik inkübasyon sıcaklıkları denenmiştir. Fajlardan sadece birinde, inkübasyon sıcaklığı 0'dan 20°C'ye yükseltildiğinde, adsorbsiyon oranının % 77.2'den % 98.2'ye yükseldiği görölmüştür. 30°C'ye çıkıldığında bu oran % 99'a ulaşmış ve 50°C'de dahi bu değerde kalmıştır. Diğer fajların ise (YAB, lb3 ve LL-H), sıcaklık değişiminden etkilenmedikleri tespit edilmiştir (Quiberoni *et al.* 2004).

İnfektif merkez tek bir faj partikülü olabileceği gibi; petri plağı üzerinde infekte olan bir hücrenin patlaması sonucu ortama salınan fajların ürettiği, tek bir liziz plağı da olabilir. Plağın oluştuğu her bir bölge, infekte edebilen bir merkez (infective centers) yani 'faj' olarak adlandırılmaktadır. İnfektif merkezlerin oluşturduğu plaklar da, 'plak etkinliği (EOP=Efficiency of Plating)' olarak belirtilmektedir (Ellis and Delbrück 1939). Buna ek olarak, farklı bir anlam içeren bir plak etkinliği tanımı daha vardır. Genellikle direnç sistemi aktarılan veya bu sistemlere sahip konakçılarda geliştirilen fajların titrelerindeki değişimleri takip etmek amaçlanmakta ve fajın farklı bir konakçıda verdiği titrenin homolog konakçısında verdiği titreye oranlanmasıyla hesaplanmaktadır (Sanders and Klaenhammer 1980).

Agar ortamında plak oluşumu, yani lizize bağlı olarak plağın genişlemesi, bakteri metabolizması durduğuunda sona erer ve plak büyüklüğu ölçülebilir. Plak büyüklüğu, agar konsantrasyonu arttıkça azalır. Agarın artışı, yavaş difüzyonu da beraberinde getirir. Plak büyüklüğu, faj partiküllerinin ölçülerine de bağlıdır. Küçük partiküller, agar ortamında daha hızlı difüze olurlar. Fajlar için plak morfolojisi, genellikle karakteristik bir özelliktir ve faj genetiği üzerine yapılan çalışmalarda belirleyicidir. Bir faj plağı $10^6 - 10^9$ adet; bazen daha da fazla faj içerir (Ellis and Delbrück 1939, Luria and Darnell 1967).

Lizogenik *Lb. bulgaricus* CRL 539 kodlu suştan, mitomisin C ile indüklenerek elde edilen lb539 temperent fajı, *Lb. lactis* CNRZ 326, LKT ve CRL 934 suşları ile karşılaştırılmış ve üç suşun da, lb 539 fajına duyarlı olduğu saptanmıştır. Φlb539'un, CNRZ 326 suşundaki EOP değeri 9.4×10^{-4} bulunmuş, üç pasajdan sonra bu değerin 1.6'ya çıktığı görülmüştür. LL-H fajının titresinin ise, LKT suşunda 3×10^8 pfu/ml iken; CNRZ 326'da geliştirildiğinde 5.3×10^8 pfu/ml olduğu, dolayısıyla EOP değerinin 1.7 olduğu görülmüştür (Auad *et al.* 1998).

Finlandiya peynir işletmelerinden izole edilen 9 adet *S. thermophilus* fajı (F_y101, F_a101, F_{Ku}101, F_{Ko}74, F_K10, F_K11, F_EThs, F_{Lo}Ths ve F_{Lo}140/76), 6 adet *S. thermophilus* starter kültürü (101, 74, Ths41, 10, 11, 140/76) ile karşılaştırılmış, fajların bu suşlara adsorbe olma oranları ve plak etkinlikleri belirlenmiştir. F_{Ku}101, F_y101, F_A101, F_K11, F_{Lo}Ths ve F_EThs fajları, sadece kendi homolog konakçılarında % 100 veya % 100'e yakın plak etkinliği göstermişlerdir. F_{Ko}74, F_K10 fajlarının, aynı heterolog konakçılarda (2 adet) ve kendi homolog konakçılarında birbirine yakın EOP değerleri tespit edilmişse de; bu fajlar en yüksek EOP değerini 101 kodlu heterolog konakçılarında göstermişlerdir. F_{Lo}140/76 fajı da kendi homolog konakçısında yüksek plak etkinliği göstermiş, 74 ve 10 kodlu heterolog konakçılarda ise, 101 konakçısına göre çok daha düşük EOP değeri vermiştir. Çalışılan fajların, farklı konakçılarda plak oluşturamadıkları halde bu konakçılardan çoğuna adsorbe olabildikleri tespit edilmiştir. F_y101, F_A101, F_{Ku}101 ve F_{Lo}140/76 fajlarının, bağlanabildikleri heterolog konakçılara kendi homolog konakçılarından daha yüksek yüzde ile adsorbe oldukları tespit edilmiştir. F_{Ko}74, F_K10 ve F_K11 fajlarının ise, diğer konakçılara da adsorbe olmalarına karşın; en yüksek oranı kendi konakçılarında gösterdikleri belirlenmiştir. 6 konakçıya da adsorbe olabilen F_EThs ve F_{Lo}Ths adlı fajların, heterolog konakçılara kendi homolog konakçılarından daha az % ile adsorbe olabildikleri gösterilmiştir. Araştırmacılar, fajların plak etkinlikleri ve adsorbsiyon oranlarında görülen değişkenliğin, faj bağlanma bölgelerinin ve/veya hücre reseptörlerinin yapısal farklılığından kaynaklanabileceğini düşünmüşler; ancak konakçıların restriksiyon/modifikasyon sistemlerinin incelenmesi gerektiğini belirtmişlerdir (Kivi *et al.* 1987).

Benbadis vd. (1990), çalıştıkları *S. thermophilus* fajlarının farklı konakçılarda ve kendi homolog konakçılarında verdikleri titreler ile plak etkinliklerini (EOP) incelemişlerdir. Genetik yönden birbirine yakın olan fajların, konakçı özgüllüğü açısından birbirleriyle hiç de ilgili olmadıklarını görmüşlerdir. İki farklı homoloji grubuna dahil edilmiş 57 fajı ile 11 fajının konakçılarının aynı olduğu belirlenmiştir. Φ17, Φ46 ve Φ56'nın ise, heterolog konakçılarda 3×10^{-5} 'den 1'e kadar değişen, farklı EOP değerleri verdiği görülmüştür. Çizelge 2.2'de görüldüğü gibi 46 fajının kendi homolog konakçısında, (BSN15 suşunda) hazırlanması durumunda, BSN9 suşundaki EOP değeri 3×10^{-5} olarak bulunmuşken; BSN9 suşunda hazırlandığında, homolog konakçısındaki EOP değerinin 3×10^{-6} 'ya düştüğü görülmektedir. Bu sıradışı geri dönüşümlülük, fajın konakçılara farklı oranda tutunuyor olmasından kaynaklanmamaktadır (Çizelge 2.2). Bu durum, konakçılarda restriksiyon/modifikasyon sistemlerinin varlığını göstermektedir. Buna ek olarak, 46 fajı BSN9 veya BSN15 konakçısında hazırlanmış olsa da; *HindIII*, *HhaI* ve *PvuII* enzimleriyle kesim sonucu aynı fragment şablonunu vermektedir. Ancak, *Sau3A* restriksiyon enzimiyle kesime alınması durumunda, kendi homolog konakçısında hazırlandığı zaman 14 fragment oluşurken; heterolog konakçıda (BSN9) hazırlandığında faj DNA'sının kesilemediği görülmüştür. Buradan, fajların hazırlandıkları konakçılarda farklı restriksiyon/modifikasyon sistemlerinin var olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 2.2 Bazı *S. thermophilus* suşlarının adsorbsiyon oranları ve EOP değerleri

<u>Faj</u>	<u>Konakçı</u>	<u>EOP değeri</u>	<u>%Ads.</u>
Φ46(BSN15)	BSN15	1	93
	BSN9	3×10^{-5}	95
Φ46(BSN9)	BSN9	1	81
	BSN15	3×10^{-6}	93

2.5 Bakteriyofaj Sınıflama Nedenleri, Yapıları ve Taksonomik Durumları

2.5.1 Neden faj sınıflaması?

Faj sınıflaması, herşeyden önce fajların birbirleriyle yakınlıklarını, dolayısıyla aralarındaki evrimsel gelişmeyi açıklamak için yapılmaktadır. Ayrıca, filogenetik çalışmaların yapılabilmesi için de faj sınıflaması gerekmektedir. Böylece, bir çok biyolojik grup tanımlanabilir ve karşılaştırılabilir hale gelmektedir. Sekans analizleri yapılmış genler veya genomlar tek başlarına düşünüldüklerinde bir şey ifade etmezken, başka organizmalara ait sekanslarla karşılaştırıldığında önem kazanmaktadır.

Sınıflama çalışmaları sayesinde tanımlanmış olan 5000'den fazla fajın özellikleri kategorize edilerek, izole edilen yeni fajların da hangi gruplara ait oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, tedavide ve endüstriyel çalışmalarda kullanılabilecek yararlı fajlar ile biyoteknoloji ve fermentasyon proseslerinde zararlı olabilecek fajlar tanımlanmış, koleksiyonları oluşturularak kontrol altına alınmıştır (Ackermann 2005, Ackermann 2006).

Starter kültürlerle etkili olan fajlar söz konusu olduğunda ise, başlıca araştırılma nedeni bu fajlara dirençli starter kültürlerin bulunması ve üretimi olmaktadır. Ayrıca, dirençlilik geni taşıyan plazmidlerin suşlar arasında aktarımı ile fajlara dirençli kültürler elde edilebilmektedir. *Lactococcus* cinsine ait suşların çok sayıda faj dirençlilik geni taşıyan plazmidleri olduğundan, bu işlemi gerçekleştirmek kolaydır. Ancak *S. thermophilus* suşları söz konusu olduğunda, kültürlerden çok azı plazmid taşıdığından ve bu plazmidlerin çok azı faj dirençlilik genini bulundurduğundan, dirençlilik geninin aktarımı mümkün gözükmemektedir (Moineau *et al.* 1995, Brüssow 2001, Geis *et al.* 2003, Brüssow and Kutter 2005). Bununla birlikte Solow ve Somkuti (2001), çalıştıkları 3 *S. thermophilus* suşunda birer adet plazmid varlığını saptamışlardır. Hatta bu plazmidlerden birinin Tip I restriksiyon/modifikasyon sistemini kodladığı belirlenmiştir. Ancak Türkiye'de yapılan çalışmalardan birinde de

S. thermophilus ve *Lb. bulgaricus* suşlarında plazmid varlığına rastlanmadığı belirtilmiştir (Yılmaz 2002). Bu araştırmanın aksine Tükel ve arkadaşları, çalıştıkları MR27a ve St. 7.6 olarak adlandırılan iki yerel *S. thermophilus* suşunda adsorbsiyonun engellenmesi tipindeki direnç mekanizmasını kodlayan plazmidlerin olduğunu tespit etmişlerdir (Tükel *et al.* 2004). Başka bir çalışmada ise *Lb. bulgaricus* 2001 ve 2004 kodlu yerel suşlarda hem adsorbsiyonun hem de faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi tipinde faj direnç sistemlerinin bulunduğu ve bu sistemlerin suşların plazmid içermemeleri nedeniyle genomlarında kodlu olduğu belirtilmiştir (Tunail vd. 2002).

2.5.2 Bakteriyofaj yapıları ve taksonomik durumları

Modern faj araştırmaları, keşfedildikleri 1915 yılında Frederick W. Twort ile başlamış, Felix d'Herelle ile devam etmiştir (Summers 2005). Daha sonra, Felix d'Herelle'nin *Bacteriophagum intestinale* olarak adlandırdığı ve tek tip olduğunu düşündüğü fajların; partikül büyüklüklerine, konakçı dizgelerine, serolojik ve stabil kalabilme özelliklerine göre alt gruplara ayırdığı görülmüştür (Ackermann 2005, Ackermann 2006). 1930 yılında, virüs taksonomisi ve terminolojisi için ilk girişimlerde bulunulmuş, ancak basit taksonomik bir dayanağın bulunamaması nedeniyle sınıflandırma çalışmalarında başarı sağlanamamıştır (Tikhonenko 1970).

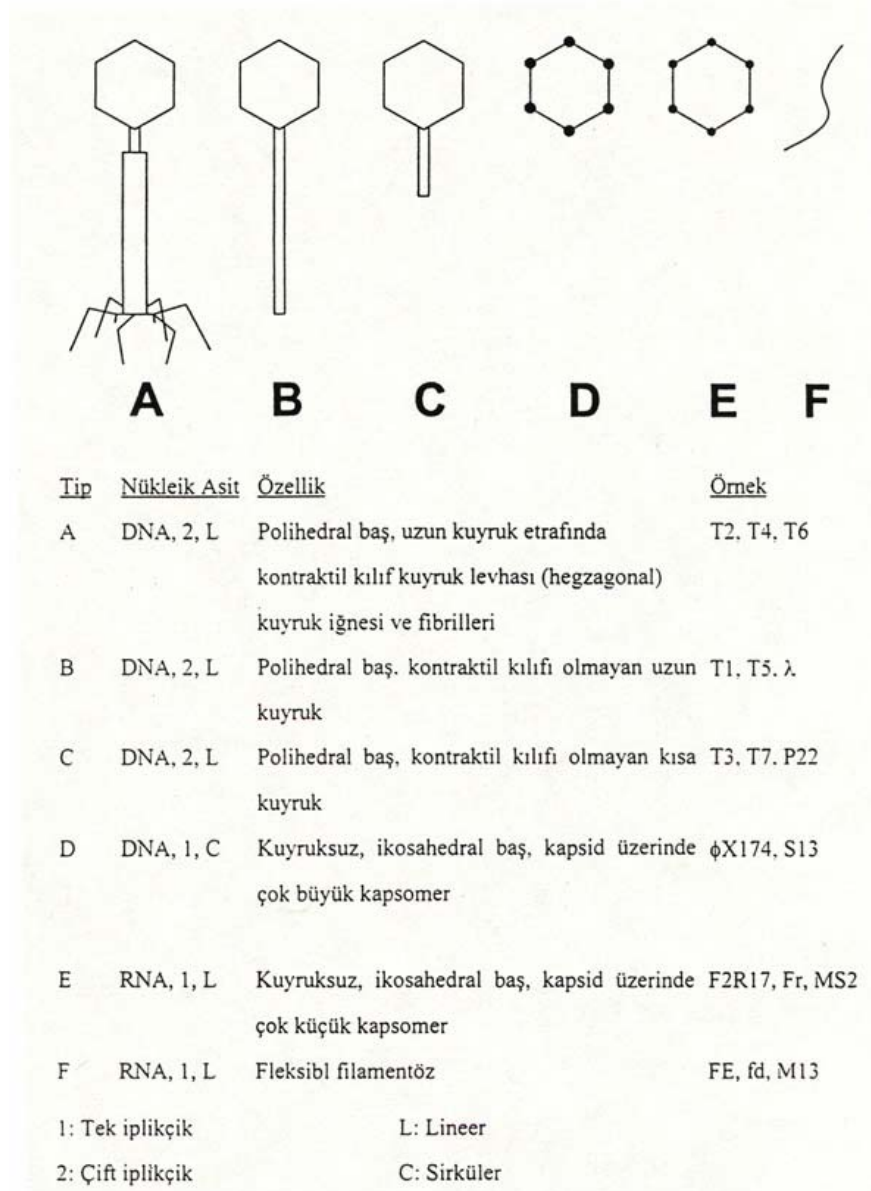
1943 yılında elektron mikroskopunun keşfiyle, fajları öncelikle üç morfolojik tipe ayırmak mümkün olmuştur. Daha sonra konakçı dizgesi, plak ve partikül büyüklüğü, sıcaklık ve üreye dayanıklılıkları dikkate alınmış ve 46 faj sınıfı oluşturulmuştur. Ancak, adı daha sonra ICTV (International Committee of Taxonomy of Viruses, Uluslar arası Virüs Taksonomi Komitesi) olarak değiştirilen komite bunu kabul etmemiş ve tüm virüslerin kendi fizikokimyasal özelliklerine bakılarak sınıflandırılmasını uygun görmüştür. 1962 yılında Lwoff, Horne ve Tournier (LHT); virüslerin içerdikleri nükleik aside, kapsid şekline, zarfı olup olmamasına ve kapsomer sayısına göre sınıflandırılmasını önermişlerdir. Bunun üzerine, virüslerin dört çift karakterden oluşan kriptogramlarının çıkarılması istenmiştir.

Nükleik Asit Tipi	Nükleik Asit Moleküler Ağırlığı	Partikülün Dış Yapısı	Konakçı
Tek/Çift Zincir	Nükleik Asit %	Kapsid Şekli	Vektör

Buna göre, T4 fajının kriptogramı çıkarılmış ve D(DNA) / 2, 169 / 40, X / X, konakçı / O şeklinde tanımlanmıştır. X kompleks bir şekle sahip olduğunu, O ise bilinen bir vektör olmadığını anlatmaktadır. Ancak, bu sistem kısa süre sonra terk edilmiştir (Ackermann 2005, Ackermann 2006).

Elektron mikroskopunda ve preparat hazırlama tekniklerinde kaydedilen gelişmeler sonucunda, fajların morfolojik olarak sınıflandırılması mümkün olmuştur (Matthews 1985). 1967 yılında Bradley, taşıdıkları nükleik asit tipine ve morfolojik yapılarına göre fajları 6 basit tipe (A – F) ayırmıştır. Bradley sınıflamasındaki gruplar içinde bulunan faj sayısı ve tipi; kübik, filamentöz ve pleomorfik fajların keşfi ve eklenmesiyle daha da genişlemiştir. 1971 yılından bu yana geçerliliğini koruyan Bradley sınıflamasına göre; Şekil 2. 3’de gösterildiği gibi T4, λ , PM2, Φ X174, MS2 ve fd fajları ile temsil edilen 6 faj cinsinin varlığı kabul edilmiştir (Arda 2000, Ackermann 2005). Daha sonra, fajların morfolojik özellikleri yanında nükleik asit yapılarının da dikkate alındığı ‘Ackermann Sınıflaması’ olarak adlandırılan, diğer bir sınıflama modeli geliştirilmiştir (Çizelge 2.3) (Ackermann 1987).

1959 yılından 1990 yılına kadar 3400 (Ackermann 1991), günümüze kadar ise yaklaşık 5100 adet değişik bakteri türlerine özgül faj; dört yapısal gruba ayrılmış ve 1 takım, 13 aile ve 31 cins olarak karakterize edilmiştir. Çizelge 2.3 ve Şekil 2.3’de gösterildiği üzere, Bradley ve Ackermann sınıflamalarına göre kübik, filamentöz ve pleomorfik grupta yer alan faj sayısı yaklaşık 180’dir ve 10 küçük aile içinde toplanmıştır (Ackermann 2001, Ackermann 2003, Ackermann 2005, Ackermann 2006).



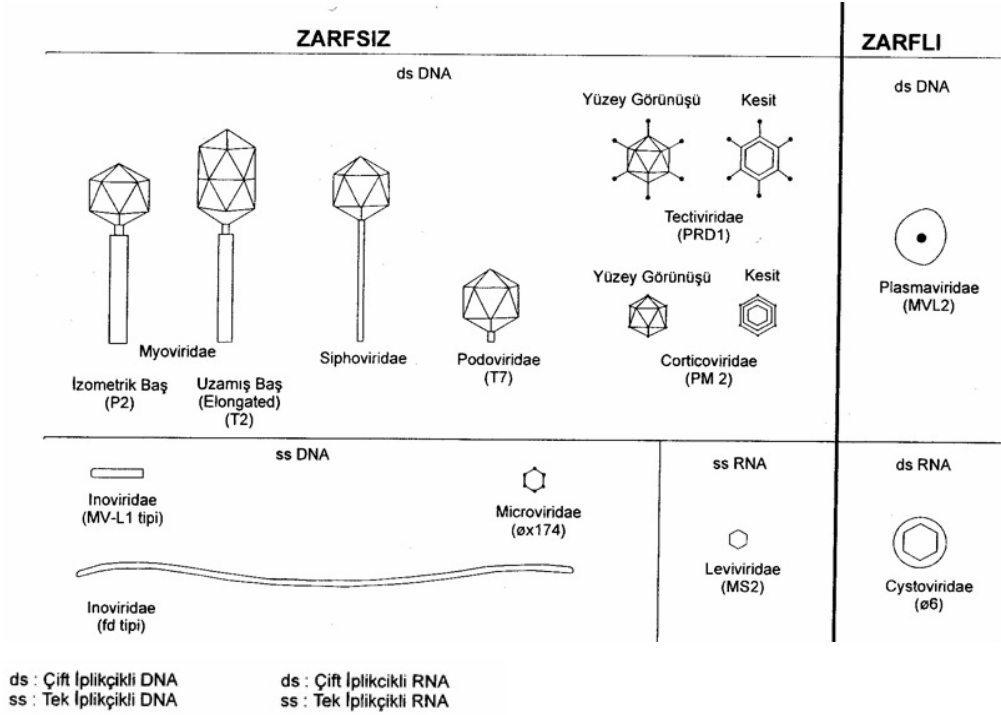
Şekil 2.3 Bradley sınıflaması

Virüs sınıflamasında daha önce de bahsedildiği gibi, morfolojik yapı ve nükleik asit doğası ön plandadır. Ancak, cins ve türlerin ayrımı için belirgin bir kriter bulunmamaktadır. Bu nedenle ICTV, sınıflama için uygun özellikleri belirlemekte ve taşınabilir kriterler seti hazırlamaktadır. ‘Polythetic Türler Kavramı’ denilen bu sistemde bir faj türü, belirlenmiş özelliklerden tamamını veya bir kısmını taşıyarak tanımlanabilmektedir. Dolayısıyla, aynı grupta yer alan fajların birbirleri ile birebir benzerlik gösteremeyeceği bilinmektedir. Nükleik asit doğası, partikül yapısı, DNA-

DNA hibridizasyonu, nükleotit veya aminoasit sekansları gibi parametreler bu sınıflandırma sistemi için kullanılabilir. Şu anki sistem aileye kadar tanımlama yapabilmekte (Şekil 2.4, Çizelge 2.3), daha ayrıntılı yani tür bazında sınıflandırmaya gidememektedir (ICTV, Ackermann 2003, Ackermann 2005).

Çizelge 2.3 Faj temel özellikleri ve sınıflaması (Ackermann Sınıflaması)

Morfoloji	Nükleik Asit	Takım ve Familyalar	Cins	Örnek	Üye Sayısı	Özellikleri
Kuyruklu	DNA, ds, L	Caudovirales	15		4950	
		Myoviridae	6	T4	1243	Kontraktil
		Siphoviridae	6	λ	3011	Kuyruk
		Podoviridae	3	T7	696	Uzun Kuyruk Kısa Kuyruk
Polihedral	DNA, ss, C	Microviridae	4	Φ X17	40	
		Corticoviridae	1	4	3?	Lipid İçeren
	ds, L	Tectiviridae	1	PM2	18	Kompleks
		Leviviridae	2	PRD1	39	Kapsid
		Cystoviridae	1	MS2 Φ 6	1	Lipoprotein Kaplı Kapsid
Filamentöz	DNA, ss, C	Inoviridae	2	fd	57	Lipid Zarf
		Lipothrixviridae	1	TTV1	6?	Uzun veya
		Rudiviridae	1	SIRV 1	2	Kısa Filament Lipid Zarf TMV Benzeri Yapı
Pleomorfik	DNA, ds, C, T	Plasmaviridae	1	L2	6	Kapsid Yok,
		Fuselloviridae	1	SSV1	8?	Lipid Zarf Kapsid Yok, Limon Formlu
ds: çift sarmal	C: sirküler	S: parçalı				
ss: tek sarmal	L: lineer	T: süper helikal				



Şekil 2.4 Bakteriyofaj familyaları

2.5.3 Kuyruklu fajlar

Faj popülasyonunun % 96'sını, 5100'e yakın üyesi ile 'kuyruklu fajlar' oluşturmaktadır (Maniloff ve Ackermann 1998, Ackermann 2001, Ackermann 2003). Kuyruklu fajlar, lineer çift sarmal DNA ve bu DNA'yı çevreleyen ikosaedral kapside ve helikal yapıda kuyruğa sahiptirler. DNA büyüklükleri 17-500 kb, kuyruk uzunlukları da 10-800 nm arasında değişmektedir. Kapsidleri, 'kapsomer' adı verilen alt ünitelerden, kapsomerler ise 5 veya 6 adet 'protomer' den oluşmaktadır. Kontraktil veya kontraktil olmayan kuyruklarının sonunda kuyruk plağı, kuyruk iğnesi ve/veya fibrilleri bulunabilmektedir (Tikhonenko 1970, Schlegel 1985, Prescott *et al.* 1993). Büyük ve kompleks olan DNA'larında, konakçı DNA'larından farklı olarak (T4 faj DNA'sında olduğu gibi) '5-hidroksimetilsitozin' veya '5-hidroksimetilurasil' bulunabilmektedir (Ackermann 2006). Birbirleriyle benzer morfolojik, fizikokimyasal ve fizyolojik özellikler taşıyan bu fajlar, 'monophyletic' bir evrim grubu oluşturmuş ve 'Caudovirales' (Cauda=kuyruk) adlı tek bir takım içerisinde yer almışlardır. Bununla

beraber bu fajlar; büyüklüklerinin, DNA içerik ve kompozisyonlarının, proteinlerinin, serolojik özelliklerinin, konakçı dizgeleri ve fizyolojilerinin farklılıklar göstermesi nedeniyle Myoviridae, Siphoviridae ve Podoviridae familyaları (Bradley sınıflamasına göre sırasıyla A, B ve C grubu) içerisinde gruplandırılmışlardır (Maniloff and Ackermann 1998). Şekil 2.3 ve Çizelge 2.3'den de görüldüğü gibi, Myoviridae familyasında bulunan fajlar kontraktil kuyruğa sahiptir ve kuyruklu fajların % 25'i bu grupta yer almaktadır. Kuyruklu fajların % 14'ünü oluşturan, kısa ve kontraktil olmayan kuyruğa sahip Podoviridae familyasında ise, 700 adet faj bulunmaktadır. Fajların geri kalan kısmı (% 61), kontraktil olmayan uzun kuyruğu ile karakterize edilen Siphoviridae familyası üyesidirler (Ackermann 2001, Ackermann 2003, Ackermann 2005, Ackermann 2006).

Kuyruklu fajlar, cos veya pac uca sahip olmalarına, DNA veya RNA polimeraz varlığına, farklı baz içermelerine, nükleotit dizileri ile konkatamer oluşumlarına bakılarak 15 cinse ayrılmıştır (Çizelge 2.4). Sınıflandırılmayı bekleyen çok sayıda faj bulunduğundan, var olan cinsler okyanustaki adalar gibi düşünülmektedir. Şu anda, izolasyonları gerçekleştirilen fajlardan sadece 250 adedinin morfolojik yapıları, DNA–DNA hibridizasyon oranları, nükleotit dizi analizleri ve serolojik özellikleri dikkate alınarak tür bazında ayrımı yapılabilmektedir (Ackermann 2003, Ackermann 2005, Ackermann 2006).

DNA ve protein dizilerindeki farklılıklar, fajların çeşitliliğinin artmasına neden olmaktadır. Çift zincirli DNA'ya sahip kuyruklu faj genomları, yatay gen değişimleri (Horizontal Gene Exchange) nedeniyle mozaik yapıdadır ve ortak genlerinin de bulunduğu çok büyük bir havuza sahiptir. Yatay gen değişimi, iki faj genomunun homolog bölgelerindeki bazı DNA dizilerinin bir bölümünün değiş tokuş edilmesi şeklinde açıklanmaktadır. Bu hipoteze göre, faj evrimi dikey evrim ile değil yatay gen transferi ile gerçekleşmektedir. Bu teori, 30 yıl önce geliştirilmiş klasik modüler değişimin güncellenmiş halidir. Süt endüstrisinde kullanılan bakterilere özgül

Çizelge 2.4 Kuyruklu Faj Cinsleri (Ackermann 2005)

Aileler	Cinsler	Tür Tipleri	Tür Sayısı	Üye Sayısı	Temel Konakçı
Myoviridae	T4-benzeri	T4	7	47 (+100)	Enterobacteria
	P1-benzeri	P1	3	12	Enterobacteria
	P2-benzeri	P2	2	16	Enterobacteria
	Mu-benzeri	Mu	1	2	Enterobacteria
	SPO1-benzeri	SPO1	1	13	<i>Bacillus</i>
	ΦH-benzeri	ΦH	1	2	<i>Halobacterium</i> *
Siphoviridae	λ-benzeri	Λ	1	7	Enterobacteria
	T1-benzeri	T1	1	11 (+50)	Enterobacteria
	T5-benzeri	T5	1	5 (+20)	Enterobacteria
	L5-benzeri	L5	1	4 (+15)	<i>Mycobacterium</i>
	c2-benzeri	c2	1	5 (+200)	<i>Lactococcus</i>
	ΨM1-benzeri	ΨM1	1	3	<i>Methanobacterium</i>
Podoviridae	T7-benzeri	T7	3	26	Enterobacteria
	P22-benzeri	P22	1	11	Enterobacteria
	Φ29-benzeri	Φ29	4	12	<i>Bacillus</i>

*: Arkeabakter

(Parantez içerisindeki değerler, izolasyonları yapılmış fakat karakterizasyon çalışmaları tamamlanmamış faj sayılarını belirtmektedir.)

fajlarla çalışan bazı araştırmacılar, fajların yapısal gen kümelerinde dikey evrime dair belirtilere rastlamışken, aynı konakçı türlerini infekte eden fajlarla çalışan diğer araştırmacılar ise dikey faj evrimine dair herhangi bir kanıt bulamamışlardır (Hendrix 2002a, Hendrix 2002b, Hendrix *et al.* 2003, Hendrix 2003, Brüssow and Desiere 2006).

Genlerin yatay değişimi sonucunda, faj genomları bazen kendilerine ait olmayan genler edinirler ve bu genleri profaj olarak bakteri genomuna taşırlar (Desiere *et al.* 2002). Bunun sonucunda yeni gen, bakteri genotipinin bir parçası olur ve fenotipi değişir. Bu yolla, temperent fajlar kendi konakçıların evrim geçirmelerinin en büyük sorumlusu olurlar. Homolog rekombinasyon ise, iki aynı veya birbirine çok benzer sekansın rekombine olmasıdır (Hendrix 2002b, Hendrix 2003, Brüssow *et al.* 2004, Brüssow 2006).

Kuyruklu fajlar arasında, yoğurt yapımında starter kültür olarak kullanılan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül fajlar da bulunmaktadır (Le Marrec *et al.* 1997, Brüssow 2001, Coffey and Ross 2002, Tunail vd. 2002, Brüssow and Suarez 2006). Bu fajlar içerisinde ICTV kayıtlarına geçmiş, tüm genom dizi analizi yapılmış ve tanımlanmış sadece 6 adet *S. thermophilus* fajı bulunmaktadır (ICTV). Dizi analizleri yapılarak karşılaştırılan bu fajların genomlarının, dört büyük parçadan oluştuğu düşünülmektedir. Segmentlerden biri, DNA paketlenme genlerinden kuyruk genlerine kadar uzanan geç gen kümelerinden oluşmaktadır. Bu modülde iki farklı genom konfigürasyonu bulunmaktadır. İlk modelde DNA yapışkan uca (cos-bölgesi) sahipken, diğesinde genomun küt uca (pac-bölgesi) sahip olduğu görülmektedir. Bu cos- ve pac- bölgelerin varlığına göre kuyruklu fajlar, sırasıyla bu grupları temsil eden Sfi21- ve Sfi11- tipi fajlar olarak birbirinden ayrılmaktadır. Bu iki tip fajın yapısal gen kümelerinin sekansları karşılaştırılmış ve birbiriyle alakalı olmadıkları görülmüştür. Bu farklılığın nedeni, her iki gen kümesinde gerçekleşmiş olan nokta mutasyonların birikmesi ile açıklanmaktadır. İkinci segmentte kuyruk fibrili, liziz ve lizogeni modülleri bulunmaktadır. Bu parçadaki farklılıklar, yeni DNA segmentlerinin eklenmesi ve ayrılmasıyla ya da bu fragmentlerin yer değiştirmesiyle oluşmuştur. İlk segmentle karşılaştırıldığında, daha az nokta mutasyonun gerçekleştiği anlaşılmıştır. *Streptococcus* faj popülasyonu içinde litik faj daha fazladır. Litik fajların, temperent fajların ikinci segmentinde bulunan lizogeni modüllerindeki kopmalar ve bu bölge üzerinde gerçekleşen yeniden düzenlenmeler ile varolduğu düşünülmektedir. Üçüncü genom segmenti, DNA replikasyon modülünden oluşmaktadır ve iki ayrı gen takımının (Sfi21 benzeri ve 7201 benzeri DNA replikasyon modülü) varlığı tespit edilmiştir. Dördüncü genom segmenti ise, genomun 5 kb 'lık kısmını kapsamaktadır. Orta ve geç transkripsiyonlar için gerekli proteinlerin kodlandığı bölgedir. Sekansların yüksek oranda korunduğu bu bölgede de çeşitliliğin, ekleme/ayırılma işlemlerinden kaynaklandığı görülmüştür (Brüssow and Desiere 2006).

“pac” bölgeye sahip olan Sfi11 ve O1205 fajlarının yapısal gen organizasyonları, açık bir şekilde λ tipi fajlara benzemektedir. Sfi21 fajı ise, λ fajı ile DNA paketlenme, kuyruk ve kapsid genlerinde birebir korelasyon göstermektedir. Sfi21 gen haritası λ gen haritasından nerede farklılaştıysa, o bölgede HKO97 lamdoid kolifajının gen haritasına

benzerlik gösterdiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca λ tipi yapısal gen kümeleri geniş bir evrimsel dağılıma sahip olduğundan, aynı genlere *Archaeovirus* 'larda da rastlanmakta ve bu özellikte olan tüm fajlar, Siphoviridae λ süpergrubu içinde yer almaktadırlar (Brüssow 2001, Brüssow and Desiere 2006).

2.5.3.1 Sfi21-tipi (cos-bölgeye sahip) kuyruklu fajlar

S. thermophilus suşlarına özgül, cos- bölgeye sahip temperent Sfi21 faj genomu ile virulent Sfi19, DT1 ve 7201 faj genomları karşılaştırıldığında, lizogeni modülü dışında fajların genom haritalarının hemen hemen aynı olduğu tespit edilmiştir (Brüssow and Desiere 2001). Bu fajlar, nokta mutasyonlar, küçük eklemeler ve ayrılmalar ile genlerin yer değiştirmesine bağlı olarak birbirlerinden farklılaşmışlardır (Brüssow and Bruttin 1995, Tremblay and Moineau 1999, Brüssow 2001, Lamothe *et al.* 2005).

G-C oranı düşük gram pozitif bakterilere etkili olan fajlar ile farklı cinslere etkili olan diğer fajlardan, cos- bölgeye sahip olanların çoğunun da DNA dizi analizi yapılmış ve Sfi21- tipi oldukları tespit edilmiştir. Bu genomların karşılaştırılmasıyla fajlar arasındaki genetik ilişkinin seviyesi belirlenmiş ve bu ilişkinin yaklaşık olarak infekte ettikleri konakçılar arasındaki filogenetik ilişkiyi yansıttığı görülmüştür (Brüssow and Desiere 2006).

Altı farklı cinse ait gram pozitif bakteriyi infekte eden bu fajların, birbirleriyle aynı modüler genom organizasyonuna sahip olduğu görülmüştür. Sfi21 DNA'sı ile, cos- bölgeye sahip diğer *S. thermophilus* fajlarının sekanslarının % 80, *Lactococcus* BK5-T fajının DNA paketleme ve kapsid oluşumundan sorumlu gen dizilerinin ise % 60 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu genlerin kodladığı proteinler incelendiğinde ise, tamamının benzer olduğu görülmüştür. *Lactobacillus gasseri* (*Lb. gasseri*) ve *Lactobacillus casei* (*Lb. casei*) suşlarına etkili olan, sırasıyla adh ve A2 fajlarının DNA dizi analizleri, Sfi21 genomu ile karşılaştırılmıştır. adh fajının DNA paketleme, kapsid ve kuyruk genleriyle ve A2 fajının DNA replikasyon genleriyle, *S.*

thermophilus Sfi21 faj genomuna benzediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, standart Sfi21 tipi genom haritalarından farklı genom haritalarına sahip oldukları görülmüştür. adh fajının DNA replikasyon modülünün etrafında ve A2 fajının aynı modülünün sol tarafında, küçük açık okuma çerçevelerinin (orf) bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) PVL fajı, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) Φ105, *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) Φ3626 fajları da, bu grup içerisinde yer almaktadır. Bu fajlar arasında ilkinden sonuncusuna doğru azalan bir şekilde genetik yakınlık olduğu ve bu yakınlığın, konakçıların filogenetik akrabalıklarının uzaklığını yansıttığı tespit edilmiştir (Brüssow 2001, Desiere *et al.* 2002, Brüssow and Kutter 2005, Brüssow and Suarez 2006).

2.5.3.2 Sfi11-tipi (pac-bölgeye sahip) kuyruklu fajlar

Sfi11 tipi fajları, genom yapılarının farklı olması dışında Sfi21 tipi fajlardan ayıran bir diğer özellik de, bir adet büyük kapsid proteini yerine iki adet kapsid proteini içermeleridir. Bu grupta yer alan *S. thermophilus* fajlarından O1205 temperent fajı, nükleotit analizine göre Sfi11 fajından sadece % 10 oranında farklıdır ve nokta mutasyonla gerçekleşen bu farklılık sadece bir gene özgüdür. Sfi21 grubunda olduğu gibi sadece *S. thermophilus* fajları değil, farklı konakçı türlerini infekte eden pac-bölgeye sahip fajlar da bulunmaktadır. *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) profajı, *Lactococcus* (TP901-1, Tuc 2009), *Lactobacillus lactis* (LL-H), *Lactobacillus plantarum* (Φgle), *Bacillus* (SPP-1), *Listeria* (A118) ve *S. aureus* ETA fajları da, Sfi11 pac-tipi fajlar grubu içerisinde yer almaktadır. Aynı konakçılara özgül fajlarda sekans benzerliğinin yüksek ve yaygın olduğu; farklı konakçılara özgül fajlarda ise yapısal gen kümelerindeki dizi benzerliklerinin çok olmadığı ancak birbirlerine özdeş genom haritaları taşıdıkları ve protein sekanslarında da yüksek benzerlik olduğu görülmüştür (Tremblay and Moineau 1999, Brüssow 2001, Desiere *et al.* 2000, Desiere *et al.* 2002, Brüssow and Kutter 2005, Brüssow and Suarez 2006).

Yukarıda anlatılan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* dahil, süt endüstrisinde kullanılan diğer cins ve türlere ait fajların tamamının taksonomik durumları, Çizelge 2.5’de verilmiştir (Brüssow 2001).

Çizelge 2.5 Süt fajlarının taksonomik durumları

KONAKÇI TÜRLERİ	FAJ TİPİ	PROTOTİP FAJ	ÜYE FAJLAR
<i>Streptococcus thermophilus</i>	B1; cos: Sfi21-türleri	Sfi21(T); Sfi19(V)	DT1, 7201, Sfi18
<i>Lactococcus lactis</i>	B1; pac: Sfi11-türleri	O1205(T); Sfi11(V)	
	B1; cos: 936-türleri	Sk1(V)	bIL170, bIL41, bIL66, P008, F4-1, US3
	B2; cos: c2-türleri	c2(V)	c6A, bIL67
	B1; P335-türleri: cos	Φ31(V); rlt(T)	
	B1; P335-türleri: pac	TP901-1(T)	Tuc2009
	Büyük B1: 949-türleri		Φ111, P026
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	B1; cos: BK5-T-türleri	BK5-T(T)	
	B1; pac grup a	Mv4(T); LL-H(V)	LL-K, lb539
	B1; cos grup b	LL-Ku(V)	c5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	B3; cos grup c	JCL1032	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	B1; pac	phigle(T)	
<i>Lactobacillus casei</i>	B1; cos	adh(T)	
	B1; pac	A2(T)	PL-1
<i>Lactobacillus johnsoni</i>	Profaj	FSW	
		Lj965	

^aB1: İzometrik kapsid, B2 ve B3: Prolat kapsid, cos: cos bölge: yapışkan uçlu DNA pac: pac bölge: küt uçlu DNA ^bT: temperent, V: virulent

2.5.4 Faj taksonomisine farklı bir yaklaşım

Fajların taksonomik durumlarının belirlenmesi için ikinci bir yol da, enzimlerini kodlayan genler arasında evrimsel bir ilişki olup olmadığını araştırmaktır. Farklı organizmalardan izole edilmiş olsalar da, fonksiyonel açıdan birbiriyle alakalı olan DNA polimeraz, aerobik ve anaerobik ribonükleotitredüktaz, topoizomerazII ve bunlar

gibi birçok enzimin benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu konuyla ilgili sekans veri ve analizleri azdır. Ancak, çalışmalar genişleyerek devam etmekte ve farklı şablonlar ortaya çıkarılmaktadır. Şu ana kadar, beş adet DNA polimeraz ailesinin varlığı tespit edilmiştir ve bu aileler arasındaki benzerlikler azdır ya da hiç yoktur. T4 DNA polimeraz enziminin dahil edildiği grupta, ökaryotik hücre enzimleri ile arkebakterilere ait enzimler bulunmaktadır (Brüssow and Kutter 2005).

2.5.5 *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* fajları

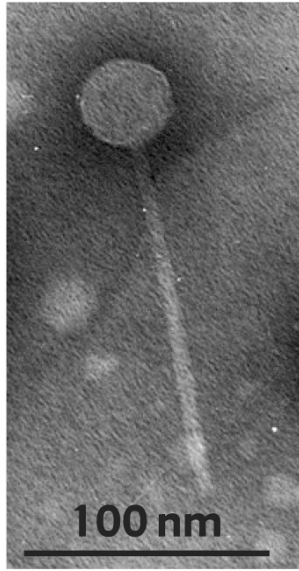
Cins ve tür bazında sınıflanmayı bekleyen çok sayıda fajdan, *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus*'a etkili olanlar da; diğerleri gibi keşfedildikleri yıllardan günümüze kadar her bir çalışma kapsamında morfolojik yapılarına, konakçı dizgelerine, serolojik özelliklerine, protein profilleri ile restriksiyon kesim şablonlarına ve DNA hibridizasyon sonuçlarına göre karakterize edilmiş ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır (Accolas and Spillmann 1979, Reinbold *et al.* 1982, Mata *et al.* 1986, Cluzel *et al.* 1987, Kivi *et al.* 1987, Krusch *et al.* 1987, Chow *et al.* 1988, Lahbib-Mansais *et al.* 1988, Prevots *et al.* 1989, Benbadis *et al.* 1990, FAYARD *et al.* 1993, Forsman 1993, Schouler 1996, Le Marrec *et al.* 1997, Brüssow *et al.* 1994a, Brüssow *et al.* 1994b, Brüssow and Bruttin 1995, Acar 2002, Tunail vd. 2002, Tükel *et al.* 2003, Quiberoni *et al.* 2004).

2.5.5.1 *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* fajlarının morfolojik yapıları ve konakçı dizgeleri esas alınarak sınıflandırılması

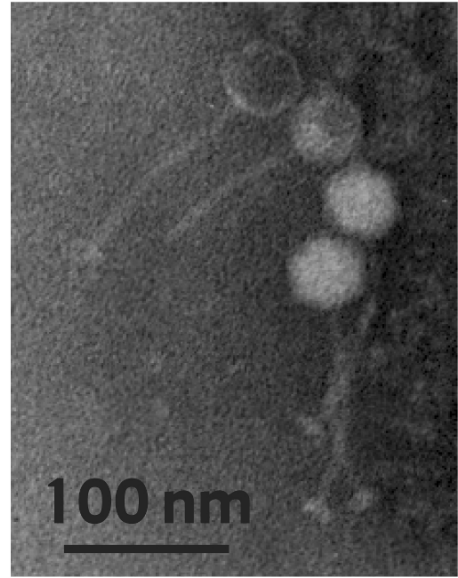
Morfolojik yapı

S. thermophilus ve *Lb. bulgaricus* fajlarının; keşfedildikleri 1952 ve 1974 yıllarından günümüze kadar yapılan tüm çalışmalarda, morfolojik olarak Bradley sınıflamasına göre B grubuna ve Ackermann sınıflamasına göre de Siphoviridae familyasına dahil edildikleri görülmektedir (Tunail vd. 2002). Şekil 2.6 ve Şekil 2.7'de, sırasıyla *S.*

thermophilus ve *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül fajların elektron mikrografları verilmiştir (Acar 2002). Sadece Reinbold ve arkadaşlarının izole ettiği tek bir *Lb. bulgaricus* fajının, Myoviridae familyasına ait olduğu saptanmıştır (Reinbold *et al.* 1982). İki cinse ait bu fajların kapsid büyüklüklerinin 42-74 nm, kontraktil olmayan uzun kuyruklarının ise 117-330 nm arasında değiştiği görülmüştür (Accolas and Spillmann 1979, Mata *et al.* 1986, Cluzel *et al.* 1987, Kivi *et al.* 1987, Krusch *et al.* 1987, Chow *et al.* 1988, Benbadis *et al.* 1990, Fayard *et al.* 1993, Brüssow *et al.* 1994a, Auad *et al.* 1997, Auad *et al.* 1999, Tremblay and Moineau 1999, Acar 2002, Quiberoni *et al.* 2003a, Quiberoni *et al.* 2004).



Şekil 2.5 *S. thermophilus* B3-X18 fajı



Şekil 2.6 *Lb. bulgaricus* Y4-X4 fajı

Konakçı dizgeleri

Prevots vd. (1989), çalıştıkları 23 adet fajı, etkili olabildikleri bakterilere göre iki gruba ayırmışlardır. Ancak, her bir gruba dahil ettikleri fajların tamamının aynı litik spektruma sahip olmadıklarını ve farklı restriksiyon profilleri verdiklerini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada, 12 adet *S. thermophilus* fajı, sekiz farklı konakçı dizgesi göstermiş ve üç litik gruba ayrılmıştır. Aynı veya farklı litik spektruma sahip bu fajların, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim sonrasında da birbirlerinden farklı

fragment profillerine sahip oldukları görülmüştür. Fajlardan ikisi (P55 ve P53), homolog konakçıları aynı olmasına ve benzer fragment profili vermelerine karşın; farklı konakçı spektrumu göstermişlerdir (Neve *et al.* 1989). Le Marrec vd. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada 27 adet faj, 36 adet endüstriyel *S. thermophilus* suşu ile karşılaştırılmış ve fajlara duyarlılık gösteren suşların, bu duyarlılığı ayırım yapmaksızın hem cos- tipi, hem de pac- tipi fajlara gösterdiği saptanmıştır.

Suarez vd. (2002), diğer çalışmalardan farklı olarak, 22 adet doğal *S. thermophilus* litik fajını hem ticari kültürlerle hem de doğal suşlarla karşılaştırmışlardır. Ticari kültürlerle karşılaştırıldıklarında geniş bir konakçı dizgesine sahip olan fajların, 16 adet doğal *S. thermophilus* suşu ile karşılaştırılmaları durumunda, sadece beş adet suşa etkili olabildikleri görülmüştür.

Tunail vd. (2002), 709, 231 ve B3 ticari *S. thermophilus* suşları ile izole ettikleri 23 adet fajı, 9 adet liyofilize yoğurt kültüründen elde edilen (709, 231, B3, CH-1, 632, Y1, Y4, V1, V2) suşu ve çiğ süt izolatu olan 30 adet doğal *S. thermophilus* suşu ile karşılaştırmıştır. 9 adet starter kültürden sadece 3 adedinin fajlara duyarlılık gösterdiği saptanmıştır ki zaten bu suşlar fajların izolasyonunda kullanılan suşlardır. Doğal suşların ise tamamının 23 adet faja dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı şekilde bu 9 adet endüstriyel, 30 adet yerel *S. thermophilus* suşu, farklı süt ürünlerinden izole edilmiş olan 25 adet *Lb. bulgaricus* fajı ile karşılaştırılmış ve tür bazında heterolog konakçısının olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda da *S. thermophilus* suşlarının tamamının *Lb. bulgaricus* fajlarına dirençli olduğu bulunmuştur.

S. thermophilus suşlarında olduğu gibi *Lb. bulgaricus* fajları da öncelikle kendi izolasyonlarında konakçı olarak kullanılan 231, V1, V2 ve Y4 suşlarına ek olarak H709, W709 ve Y1 starter *Lb. bulgaricus* suşları ile karşılaştırılmıştır. H709 ticari suşu tüm fajlara direnç gösterirken, V1 suşunun 4, 231 suşunun ise 13 adet faja dirençli olduğu, diğerlerinin ise fajların tamamına duyarlılık gösterdiği saptanmıştır. 25 adet *Lb. bulgaricus* fajının çiğ süt izolatu olan 24 adet *Lb. bulgaricus* suşu ile karşılaştırılması

durumunda da sadece 2001 ve 2004 yerel suşlarının fajların tümüne dirençli olduğu, diğerlerinin ise her faja duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir (Tunail vd. 2002).

Diğer bir çalışmada ise, endüstriyel üretimlerde kullanılan 8 adet ticari *S. thermophilus* suşu ile 11 adet faj izole edilmiş ve bu fajlar 20 adet *S. thermophilus* suşu ile karşılaştırılarak, konakçı dizgelerine göre 5 gruba (SI, SII, SIII, SIV ve SV) ayrılmışlardır. Ancak, aynı konakçıları lizize uğratan fajların yine birbirlerinden farklı restriksiyon profilleri verdiği görülmüştür (Quiberoni *et al.* 2003a)

Fajlar, konakçı dizgeleri belirlenmek üzere, 30 adet *Lb. bulgaricus* ve *L. lactis* suşu ile karşılaştırılmıştır. Fajların tamamı farklı plak etkinlikleri göstermiş olsa da, hepsi *Lb. lactis* LKT suşuna etkili olmuşlardır. Fajlardan sadece üç adedinin (c3, c5, lb4), LB4, LT1 ve LT4 kodlu *Lb. bulgaricus* suşlarında gelişebildiği; indikatör suşları *Lb. lactis* LKT olan mv1 ve mv4 temperent fajlarının da, birbiriyle aynı konakçı dizgesine sahip oldukları saptanmıştır (Mata *et al.* 1986).

2.5.5.2 *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* fajlarının restriksiyon endonükleaz analizleri ve protein profilleri esas alınarak sınıflandırılması

Fajların morfolojik yapılarının tek tip olması ve konakçı dizgelerinin moleküler çalışmalarla uyum sağlamaması nedeniyle, sadece bu kriterler baz alınarak sınıflandırmanın mümkün olamayacağı daha iyi anlaşılmış ve moleküler çalışmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (Mata *et al.* 1986, Prevots *et al.* 1989, Le Marrec *et al.* 1997, Forde and Fitzgerald 1999).

Finlandiya’da yürütülen bir araştırmada peynir fabrikalarından izole edilen 9 adet *S. thermophilus* fajının morfolojik özellikleri, yapısal proteinleri ve konakçı dizgeleri araştırılmıştır. Fajların yapısal proteinleri genel olarak aynı olmasına rağmen, bazılarının farklı yoğunlukta olduğu görülmüştür. Farklı yoğunluk ve bazı bantların

olmayışı, profillerin farklılaşmasına neden olmuştur. Majör proteinler 63, 49, 42 ve 11 kDa olarak belirlenirken, minör proteinlerin 145, 120, 87, 70, 30, 27 ve 14 kDa olduğu tespit edilmiştir (Kivi *et al.* 1987).

S. thermophilus suşlarına özgül 12 adet faj ile çalışan Neve ve arkadaşları, fajların tamamında homolog bölgelerin olduğunu saptamış ve homolojinin miktarına göre fajları üçe ayırmışlardır. P6 ve P8 kodlu fajlar birbirleri ile % 100; P6, P8 ve a10/J9 fajları hariç, diğer fajlar da birbirleriyle % 50'nin üzerinde homoloji göstermişlerdir. a10/J9 fajı ise, diğer fajlarla gösterdiği hibridizasyon oranının % 40'ın altında olması nedeni ile ayrı bir grup oluşturmuştur. Fajların altı adedinin 30.9 kDa ve 24 kDa, dört adedinin de 30.9 kDa ve 26.3 kDa olan; iki ana protein bantına sahip oldukları görülmüştür. Geriye kalan iki fajın (P6 ve P8) ise; 39.8, 24.0 ve 14.8 kDa'luk üç majör protein bantına sahip olduğu görülmüştür. Bu iki fajın gösterdiği protein profilleri, genom analizi sonucu diğer fajlardan ayrılarak farklı bir alt grup oluşturmalarını desteklemiştir. Fajların genom büyüklükleri standart ve dairesel bir faj DNA'sı kullanılarak, elektron mikroskopuyla 33.8-44.2 kb olarak tespit edilmiştir (Neve *et al.* 1989).

Yoğurt ve peynir üretimde kullanılan 26 adet *S. thermophilus* suşuna etkili 23 adet virulent fajla çalışan Prevots ve arkadaşları, bu fajları morfolojik yapıları, yapısal proteinleri, DNA restriksiyon şablonları ve DNA hibridizasyon sonuçlarına göre karakterize etmişlerdir. Protein profillerinden, fajların ikişer adet majör yapısal protein bantına sahip oldukları görülmüştür. 80, 96 ve 99 kodlu fajlarda yaklaşık 23 ve 40 kDa'luk, geri kalanlarda ise yaklaşık 23-29 kDa'luk majör protein bantlarının varlığı tespit edilmiştir. Bazı profillerde, bu iki majör banta ek olarak 43 ve 58 kDa büyüklüğünde iki minör bantın da ortak olduğu saptanmıştır. Φ81, Φ84 ve Φ85, ek olarak 26.5 kDa'luk majör bir protein bantına sahipken; aynı büyüklükteki bantın 86 ve 95 kodlu fajlarda daha az yoğunlukta olduğu görülmüştür. Lineer çift sarmal faj DNA'ları *EcoRI* ve *EcoRV* restriksiyon endonükleazlar ile kesilmiş ve oluşan fragmentlerin moleküler ağırlıkları toplanarak DNA büyüklükleri (37-43kb) hesaplanmıştır. Konakçı özgüllüklerine göre 1nci grupta yer alan faj DNA'larında

EcoRV ve *EcoRI* kesimleri sonucunda 83, 86 ve 89 kodlu faj DNA'ları hariç, birbirlerine identik fragmentler görülmüştür. $\Phi 83$, $\Phi 86$ ve $\Phi 89$ DNA'larında ise, *EcoRV* kesimi sonucu 4 kb'lık fragment yerine 3.4 kb'lık fragmentin; *EcoRI* kesimi sonucu ise 12.2 kb'lık fragment yerine 10.6 ve 1.6 kb'lık iki adet fragmentin oluştuğu görülmüştür. İkinci grupta bulunan fajlar da, hem *EcoRI* hem de *EcoRV* kesimi sonucu birbiriyle özdeş restriksiyon profili vermişlerdir. Hibridizasyon çalışmalarında ise; yine 80, 96 ve 99 kodlu fajlar hariç fajların tamamının tek bir homoloji grubunda oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca bu fajlar *Lb. bulgaricus* mv4, *Lactococcus lactis* T189 ve 936 fajlarının DNA'ları ile karşılaştırılmış ve aralarında homoloji olmadığı saptanmıştır (Prevots *et al.* 1989). Bu sonuçlar, restriksiyon endonükleaz kesim profilleri ile hibridizasyon çalışmalarının birbirini desteklemesi açısından önemlidir.

Larbi ve arkadaşları, beş farklı ülkeden izole edilmiş olan dokuz adet *S. thermophilus* fajını; morfolojik yapıları, gelişme parametreleri, restriksiyon haritaları ve DNA homolojilerine göre gruplandırmıştır. Faj genomlarının restriksiyon haritalarını çıkarmak için kullanılan enzimlerden *AvaI*, *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII*, *SacI*, *SalI*, *PvuII* ve *XhoI* ile kesim yapılabilmişken, *KpnI* ve *SmaI* enzimlerinin genomlar üzerinde tanıma sekanslarının olmadığı görülmüştür. Fajların *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* ve *PvuII* enzim kesimleri sonucu, iki farklı kesim şablonu elde edilmiş ve fajlar iki gruba ayrılmıştır. Oluşan fragment büyüklüklerinin toplamından, faj DNA büyüklüklerinin 35.6 ± 0.5 kb ve 36.2 ± 0.5 kb olduğu tespit edilmiştir. Hibridizasyon çalışmaları için, faj DNA'larından biri prob olarak kullanılmış ve bu probun *PvuII*, *EcoRI* ve *HindIII* fragmentleriyle yüksek homoloji göstermesi nedeniyle fajların aynı homoloji grubunda yer aldığı sonucuna varılmıştır (Larbi *et al.* 1990). Kesim şablonlarına göre iki gruba ayrılan fajların aynı homoloji grubuna girmeleri Prevots vd. (1989)'nin sonuçları ile çelişmektedir.

Araştırmacılar, çalıştıkları *S. thermophilus* faj DNA'larını *HindIII*, *PvuII* ve *HhaI* restriksiyon enzimleriyle muamele etmişlerdir. Farklı konakçı dizgesine sahip iki adet fajın ($\Phi 11$ ve $\Phi 57$), *HindIII* enzimi ile kesim şablonları özdeş iken; *PvuII* ile kesimleri sonucu elde edilen iki farklı kesim profiline dahil olmuşlardır. Fajların genom

büyüklikleri, elektron mikroskopik incelemeler ve *PvuII* enzim kesimiyle oluşan fragmentlerin toplanması sonucu; yaklaşık 31-45 kb olarak hesaplanmıştır. Hibridizasyon çalışmaları sonucunda tüm faj DNA'larının birbirleriyle homolog bölge veya bölgeler taşıdığı saptanmış ve fajlar için tek bir homoloji grubu olduğu düşünülmüştür. Görülen hibridizasyon derecesine göre de, fajlar kendi içerisinde A (Φ 15, Φ 29, Φ 57) ve B (Φ 11, Φ 46, Φ 17, Φ 56) olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Alt gruplarda bulunan fajların, kendi içlerinde benzer yapısal protein profili gösterdikleri saptanmıştır. A grubunda yer alan fajlardan birinin 32 kDa ve 27 kDa, diğerinin ise 31 kDa ve 27.5 kDa'luk yapısal proteinlere sahip olduğu saptanmıştır. B grubu içerisinde de iki farklı profil elde edilmiştir. Bu gruptaki fajlarda 43 kDa'luk ortak bir majör protein bantı olmasına karşın; 56 ve 17 fajlarında 25kDa ve 15 kDa büyüklüğünde iki adet; Φ 11 ve Φ 46'da ise 23.5 kDa büyüklüğünde bir adet majör bantın varlığı tespit edilmiştir (Benbadis *et al.* 1990).

Brüssow vd. (1994a), 40 adedi yoğurttan ve 41 adedi peynir fermentasyonundan olmak üzere, 81 adet *S. thermophilus* fajı izole etmişlerdir. Bu fajların konakçı dizgeleri, serolojik özellikleri ve DNA homolojileri incelenmiştir. Yoğurt fabrikasından izole edilen fajlar konakçı dizgelerine göre iki alt gruba ayrılmış; seroloji ve hibridizasyon testleri de bu sonucu desteklemiştir. Aynı durum, peynir fabrikasından izole edilen fajlar için söz konusu olamamıştır. Faj DNA'ları *PvuII* ve *EcoRI* ile kesilmiş ve 81 adet faj, 46 ayrı restriksiyon profili vermiştir. Yoğurt kaynaklı 40 faj izolatu 11 ayrı restriksiyon şablonu göstermişken; peynir kaynaklı 41 faj, 35 farklı şablon göstermiştir. *PvuII* ve *EcoRI* ile kesimleri sonucu oluşan fragmentlerin toplanmasıyla, faj DNA'larının büyüklüklerinin yaklaşık 35 kb olduğu ve yapışkan uca sahip oldukları tespit edilmiştir. DNA hibridizasyon çalışmalarında, fajların arasında saptanan homoloji ile polipeptid şablonlarının korelasyon gösterdiği, litik şablonların ise bağımsız olduğu görülmüştür.

Lizogenik *S. thermophilus* SFi21 starter suşundan izole edilmiş olan, SFi21 temperent fajı ile çalışılmıştır. *PvuII*, *XbaI*, *EcoRI*, *HindIII*, *Sall*, *SinI*, *SroI*, *NcoI* restriksiyon enzimlerinin, Sfi21 faj DNA 'sında tanıma bölgeleri olduğu belirlenmiş ve restriksiyon

endonükleaz haritası çıkarılmıştır. *PvuII* enzim kesimi sonucu oluşan fragment büyüklüklerinden, DNA büyüklüğünün 38 kb olduğu bulunmuştur (Brüssow and Bruttin 1995).

Le Marrec vd. (1997); 30 adet fajı restriksiyon profilleri, DNA homolojileri, yapısal proteinleri, paketleme mekanizmaları ve konakçı dizgelerine göre analiz etmişlerdir. Ayrıca, faj genomlarındaki çeşitliliğin nedenini oluşturan belirli genlerin ve DNA fragmentlerinin var olup olmadığını araştırmışlardır. 30 adet faj DNA'sı *EcoRV*, *HindIII* ve *PvuII* enzimleri ile kesime alınmış ve 11 adet farklı restriksiyon profili elde edilmiştir. *EcoRV* kesimi sonucunda benzer restriksiyon profili veren fajların, aynı atadan geldikleri düşünülmüştür. Φ 7201, Φ 7203, Φ 7205, Φ 7206, Φ 7209 ve Φ 8FN'de, *EcoRV* kesimleri sonucu oluşan dokuz fragmentten yedisinin eşit büyüklükte olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde, Φ 83 ve Φ 117'de bulunan 13 adet *EcoRV* fragmentinden 12'sinin eşit büyüklükte olduğu gözlenmiştir. *EcoRV* veya *HindIII* kesimi sonucu oluşan fragmentlerin toplamından, faj DNA'larının yaklaşık büyüklükleri 30–43 kb olarak bulunmuştur. Fajlardan 19'unda paketleme işleminin cos- tipi mekanizma ile gerçekleştiği, diğerlerinde ise pac- tipi mekanizmanın olduğu saptanmıştır. Yapısal proteinleri incelenen fajların, iki farklı protein profiline sahip oldukları görülmüştür. cos- tipi olan 19 adet fajda büyüklükleri yaklaşık olarak 32kDa ve 26 kDa olan iki majör banta rastlanırken; pac- tipi olan 11 adet fajda moleküler büyüklükleri 41kDa, 25kDa ve 13 kDa olan üç majör protein bantı görülmüştür. Her iki profilde de, fajdan faja nadiren ± 1 kDa'luk farklılık olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar, pac- tipi olan O1205 fajının üç adet majör ve cos- tipi olan 7201 fajının iki adet majör yapısal proteininden birini kodlayan genlerin; 30 adet faj DNA'sının *EcoRV* kesimi sonucu oluşan fragmentler ile hibridize olup olmadığını araştırmışlardır. O1205 fajına ait genlerin tüm pac- tipi fajlarla hibrit oluşturduğu, cos- tipi fajlarla ise hibridize olmadığı ortaya çıkarılmıştır. Tüm faj genomlarının (iki veya üç majör yapısal proteine sahip olsa da) DNA'larında homoloji görülmesine karşın; farklı proteinleri kodlayan spesifik DNA bölgeleri arasında homoloji olmadığı saptanmıştır (Le Marrec *et al.* 1997).

Tremblay ve Moineau, Kuzey Amerika’da bulunan bir peynir fabrikasından izole ettikleri *S. thermophilus* DT1 suşuna özgül, DT1 olarak kodladıkları litik fajın tüm genom analizini gerçekleştirmişlerdir. DT1 kodlu cos- tipi fajın, çift sarmal lineer DNA büyüklüğünün 34.82 kb olduğu ve kırktan fazla kodonu içeren 46 açık okuma çerçevesinin bulunduğu, ayrıca 26 kDa ve 32 kDa olduğu tahmin edilen iki büyük yapısal proteine sahip olduğu tespit edilmiştir (Tremblay and Moineau 1999).

Araştırmacılar, 11 adet *S. thermophilus* faj DNA’sını *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri ile muamele etmişlerdir. Kesim sonucu oluşan fragment büyüklüklerinin toplanması sonucu, fajların genom büyüklüklerinin 31–35 kb arasında değiştiği görülmüştür. Fajlardan sadece birinin cos- bölgeye sahip olduğunu tespit eden araştırmacılar, GenBank veri tabanında bulunan 6 adet faj DNA’sının restriksiyon profilleri ile çalıştıkları faj DNA’larının restriksiyon şablonlarını karşılaştırmışlar, ancak fragmentler arasında benzerlik bulamamışlardır. Çalışılan fajlardan $\Phi 1$ ve $\Phi 3$ kodlu olanların konakçı dizgelerinin ve restriksiyon şablonlarının, hem birbirlerinden hem de diğerlerinden farklı olduğu görülmüştür. Aynı konakçıları lizize uğratan, fakat üç farklı restriksiyon profili veren fajların ($\Phi 2$, $\Phi 4$ ve $\Phi 8$), konakçı özgüllüklerini belirleyen gen modüllerinin korunduğu düşünülmüştür. Aynı restriksiyon profilini gösteren, ama farklı konakçı dizgelerine sahip fajlarda ($\Phi 9$, $\Phi 10$ ve $\Phi 11$) ise, bu durumun genomlarda gerçekleşen nokta mutasyonlardan kaynaklandığı belirtilmiştir. Hibridizasyon çalışmaları sonucunda da, çalışılan fajlar arasında DNA homolojisinin olduğu tespit edilmiş ve bu fajların genetik açıdan birbiriyle yakın olduğu belirtilmiştir (Quiberoni *et al.* 2003a).

Mata ve arkadaşları, *Lb. bulgaricus* ve *Lb. lactis* suşlarına özgül, ikisi temperent olmak üzere toplam 16 adet fajı; protein kompozisyonlarını, restriksiyon kesim profillerini, DNA–DNA hibridizasyon ve serolojik test sonuçlarını dikkate alarak sınıflandırmışlardır. SDS–PAGE analizleri sonucu, her bir fajın kapsid ve kuyruğa ait iki adet majör protein bantına sahip olduğu görülmüştür. c3, c5, lb4 kodlu fajların 31 ve 23 kDa; *Lb. bulgaricus* $\Phi mv1$ ve $\Phi mv4$ temperent fajlarının 34 ve 18 kDa ve diğerlerinin de 34 ve 19 kDa büyüklüklerinde, ikişer adet yapısal proteinleri olduğu

saptanmıştır. Ayrıca P2, P18 ve P22 fajlarında, sekiz protein bantının daha varlığı tespit edilmiştir. Genom büyüklükleri 32–37 kb arası değişen faj DNA'larının kesim şablonlarının çıkarılması amacıyla, farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. *EcoRI* ve *PstI* kesimi sonucunda; Φ mv1 ile Φ mv4, Φ P18 ile Φ P21 ve Φ P19 ile Φ P22 DNA'larının birbiriyle aynı kesim profili verdiği, diğer fajların kesim şablonlarının ise birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. mv1 ve mv4 temperent fajlarının birbiriyle aynı konakçı spektrumları olduğu gibi özdeş denebilecek restriksiyon kesim profili verdikleri ve DNA büyüklükleri arasında 1 kb'lık bir fark olduğu saptanmıştır. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda; mv4 faj DNA'sının mv1 ile % 100 homoloji gösterdiği; c3, c5 ve lb4 faj DNA'larının ise diğer faj genomları ile hibrid molekül oluşturmadığı saptanmıştır. Serolojik testler sonucunda da, bu fajların (c3, c5 ve lb4) diğer fajlardan ayrıldığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda Mata ve arkadaşları, çalıştıkları fajları 'a' ve 'b' olmak üzere iki gruba ayırmışlar; 'b' grubuna c3, c5 ve lb4 fajlarını, 'a' grubuna ise mv1, mv4 temperent fajları ile 11 adet virulent fajı dahil etmişlerdir (Mata *et al.* 1986).

mv1 ve mv4 fajları ile yapılan başka bir çalışmada, DNA'larının *NotI*, *ApaI* ve *SgrAI* enzimleri ile kesilemediği; *SalI* ve *PstI* ile kesildiklerinde ise bir veya iki fragmentin farklılık gösterdiği saptanmıştır. mv4 faj genomunda *SalI* kesimi sonucu oluşan 10.5 kb'lık fragmentin yerine, mv1 faj genomunda 8.25 kb ve 2.25 kb'lık iki fragment bulunmaktadır. Buradan *SalI* enziminin, mv1 faj genomunun 10.5 kb'lık parçasında bir adet daha kesim bölgesi olduğu anlaşılmıştır. 34 ve 18 kDa'luk majör yapısal proteinlerin yanında; 68, 61, 46 kDa büyüklüğünde minör proteinlere sahip olduğu görülmüştür (Lahbib-Mansais *et al.* 1992).

Başka bir araştırmada *Lb. lactis* LL23 suşuna özgül virulent LL-H fajı ile çalışılmıştır. Araştırmacılar, LL-H faj genomunun restriksiyon profilini ve haritasını çıkarmışlardır. Bu amaçla *SalI*, *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *HindIII*, *PvuII*, *HpaI*, *SmaI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. *XhoI* ve *KpnI* endonükleazlar da denenmiş, ancak genom üzerinde tanıma dizilerinin olmadığı anlaşılmıştır. Kesim sonucu oluşan fragment büyüklüklerinin toplamından, DNA büyüklüğünün 34 kb olduğu belirlenen LL-H

fajının; 34 ve 19 kDa'luk iki adet majör, beş adet de minör proteine sahip olduğu tespit edilmiştir (Trautwetter *et al.* 1986, Sechaud *et al.* 1988).

16 adet *Lb. bulgaricus* ve *Lb. lactis* fajı ile yapılan çalışmadan sonra (Mata *et al.* 1986), fajlar arasına sekiz temperent ve iki virulent faj daha eklenerek faj sayısı 26'ya yükselmiş, 'a' ve 'b' olarak kodlanan faj sınıflarına 'c' ve 'd' olmak üzere iki grup daha eklenmiştir. Yeni fajlardan beş temperent ve bir litik faj, 'a' grubuna dahil edilmiştir. Bu gruba dahil edilen fajlar arasında protein profilleri, serolojik özellikleri ve genom hibridizasyonları dikkate alındığında az veya çok yakınlık olduğu tespit edilmiştir. Diğer üç adet *Lb. lactis* temperent fajı ise, hem 'a' hem de 'b' grubundan çok daha farklı olduğundan uzamış kapsid yapısına sahip iki faj için 'c' grubu, izometrik kapsid ve kontraktil olmayan uzun kuyruğa sahip diğer faj için de 'd' grubu oluşturulmuştur. Yeni izole edilen fajlar, mv4 genomu dahil *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII* ve *SmaI* restriksiyon enzimleri ile kesime alınmışlardır. Temperent fajlardan ikisinin ($\Phi 37$ ve $\Phi 38$) her bir enzim için birbiriyle aynı restriksiyon profili verdiği, 50 ve 51 kodlu faj DNA'larında ise *EcoRI*, *BamHI* ve *PstI* kesimleri sonucu oluşan fragmentlerden bazılarının aynı olduğu tespit edilmiştir. Diğer faj DNA'ları ise, ayrı ayrı kesim profili vermişlerdir. Ayrıca, tüm faj DNA'larında 1.3 kb'lık *HindIII* fragmentinin bulunduğu belirlenmiştir. DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda, mv4 fajı ile yeni litik fajlar arasında yaklaşık % 60-70, temperent fajlar arasında ise % 80 homoloji olduğu saptanmıştır. Koleksiyona yeni eklenen fajlardan, 19 kDa'luk tek bir yapısal proteine sahip olan 52 fajı hariç tamamının, mv4 gibi 34 kDa'luk bir majör proteine sahip olduğu görülmüştür. Φy , $\Phi 50$, $\Phi 51$ ve $\Phi mv4$ ' de 18 kDa'luk; $\Phi 37$ ve $\Phi 38$ 'de ise 19 kDa'luk ek bir majör protein bantının varlığı tespit edilmiştir. Restriksiyon profilleri ve protein şablonları aynı olan, 37 ve 38 kodlu fajların ayrıca 85, 79 ve 68 kDa büyüklüğünde üç adet minör protein bantına da sahip oldukları görülmüştür. Böylece koleksiyona yeni katılan bu fajlar da, Mata vd. tarafından oluşturulan 'a' grubuna dahil edilmişlerdir.

İki türe ait 5 adet temperent ve 13 adet litik fajın bulunduğu 'a' grubunda en iyi tanımlanmış faj, LL-H fajıdır. Yapısal proteinlerinin, lizin ve integras enzimlerinin,

erken genlerin ve DNA paketleme genlerinin sekans bölgeleri tam olarak belirlenmiştir. ‘b’ grubunda sadece *Lb. bulgaricus*’a özgül virulent fajlar bulunurken; ‘c’ ve ‘d’ gruplarında *Lb. lactis* suşuna özgül temperent fajlar bulunmaktadır. ‘a’, ‘c’ ve ‘d’ gruplarında yer alan fajlar birbirine benzer konakçı dizgesi gösterdiği halde; morfolojik, serolojik ve moleküler özellikleri tamamen farklıdır (Lahbib-Mansais *et al.* 1988, Sechaud *et al.* 1988, Auad *et al.* 1999).

İsviçre tipi peynirin peyniraltı suyundan izole edilen, *Lb. bulgaricus* CH2 suşuna özgül ch2 kodlu fajın morfolojik yapısı, restriksiyon profilleri, yapısal proteinleri incelenmiştir. Lineer olan ch2 faj DNA büyüklüğünün, elektron mikroskopik yöntemle 37 ± 1.6 kb olduğu tespit edilse de; *EcoRI*, *PstI* ve *PvuII* restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu oluşan fragmentlerin büyüklükleri toplandığında, 35 kb olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE analizi sonucunda 19.5 ve 12.2 kDa büyüklüğünde iki adet majör; 92, 56, 47, 45, 42, 39.5, 38 ve 16 kDa büyüklüğünde sekiz adet minör protein bantına sahip olduğu tespit edilmiştir (Chow *et al.* 1988).

Lb. bulgaricus CRL539 suşundan izole edilen lb539 kodlu temperent faj *Sall*, *EcoRV*, *BamHI*, *BssHI*, *EcoRI* ve *PstI* enzimleriyle kesime sokulmuş ve pac- tipi DNA büyüklüğünün yaklaşık 35 kb olduğu tespit edilmiştir. Restriksiyon profili LL-H ve mv4 fajlarından tamamen farklı olsa da, onlarla özdeş protein profiline (34 kDa ve 19 kDa) ve yüksek homolojiye sahip olması, onun da Mata vd. (1986) tarafından oluşturulan gruplardan ‘a’ ya dahil edilmesini sağlamıştır. Bu nedenle, bu fajların ortak bir atadan geldikleri sonucuna varılmıştır (Auad *et al.* 1997, Auad *et al.* 1999).

Forsman tarafından tanımlanan *Lb. lactis* JCL1032 fajı, prolat kapside sahip olması nedeniyle ‘c’ grubuna; yapışkan uca sahip 45.8kb’lık DNA’sının benzer restriksiyon kesim bölgeleri (*EcoRI*, *EcoRV*, *SacII*, *Sall*, *PstI* ve *XhoI*) vermesi nedeniyle ‘b’ grubuna; LL-H ve mv4 fajları ile yüksek homoloji göstermesi nedeniyle de ‘a’ grubuna dahil edilmiştir (Auad *et al.* 1999).

Quiberoni ve arkadaşları, *Lb. bulgaricus* YSD V, Ab₁ ve LB-lb3 suşlarına özgül, sırasıyla BYM, YAB ve lb3 kodlu fajların lineer çift sarmal DNA'larını *Bgl*III ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile muamele ederek, kesim profillerini çıkarmışlardır. DNA büyüklüklerinin 31-34 kb arasında olduğu tespit edilen fajlar, üç farklı kesim profili vermişlerdir (Quiberoni *et al.* 2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

TÜBİTAK/TARP 2106 nolu ‘Yoğurt fabrikalarında faj probleminin çözümüne yönelik araştırmalar’ adlı projede (Tunail vd. 2002) fajların izolasyonları için konakçı olarak kullanılan 709, 231 ve B3 *S. thermophilus* ticari suşları ile Y4, V1, V2 *Lb. bulgaricus* endüstriyel suşları, bu suşlara özgül fajların, protein profilleri, restriksiyon endonükleaz analizleri ve faj replikasyon parametrelerinin belirlenmesi amacıyla hazırlanmalarında kullanılmıştır.

Ayrıca *S. thermophilus* suşlarından B3 ve *Lb. bulgaricus* suşlarından V1 ve V2 suşlarına ek 231 suşundan, bu suşlara özgül fajların konakçı özgüllüklerinin belirlenmesi için yüksek titreye sahip hale getirilmelerinde yararlanılmıştır. Dr. Remziye Yılmaz (Yılmaz 2002) tarafından pastörize sütlerden izole edilmiş olan 43 adet yerel, 1 adet endüstriyel (St. 20.1) *S. thermophilus* suşu ile 12 adet yerel, 1 adet ticari (Ch-Lb12) *Lb. bulgaricus* suşu, fajların litik spektrumlarının belirlenmesi amacıyla çalışılan suşlar arasına dahil edilmiştir.

3.1.2 Bakteriyofajlar

Tez çalışmasının çeşitli aşamalarında TÜBİTAK/TARP 2106 nolu projede (Tunail vd. 2002) oluşturulan faj koleksiyonundan yararlanılmıştır. *S. thermophilus* fajları, 709, 231, B3 kodlu endüstriyel (starter) *S. thermophilus* suşları kullanılarak; *Lb. bulgaricus* fajları da Y4, V1 ve V2 kodlu endüstriyel *Lb. bulgaricus* konakçılarıyla çeşitli işletmelerin süt ürünlerinden [yoğurt, peynir altı suyu (PAS), bulk (kütle starter üretimi)] izole edilmiştir. Ayrıca Esra Acar’ın izole etmiş olduğu çiğ süt kökenli 2 adet *S. thermophilus* fajı (Φ1B3-A, Φ2B3-A) (Acar 2002) ile bir başka projede (Gürsel vd.

2004) pastörize sütün (72°C’de 1 dakika) izole ettiği 1 adet *S. thermophilus* fajı (Φ231S-A1MÖ, A1 kodlu sütün mayalama öncesi alınan örnek), ayrıca bu tez konusunun da dahil olduğu A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü 67 nolu proje kapsamında (Tunail vd. 2006) yine Esra Acar’ın Y4, V1, V2 endüstriyel *Lb. bulgaricus* konakçılarını kullanarak çiğ sütlerden izole ettiği 5 *Lb. bulgaricus* fajı (ΦY4L-A, ΦY4L-Z, ΦV1L-A, ΦV2L-A, ΦV2L-Z) tez çalışmasının çeşitli aşamalarında kullanılmıştır.

Sonuç olarak çeşitli denemelerde 26 *S. thermophilus* fajı ve 24 *Lb. bulgaricus* fajından yararlanılmıştır (Çizelge 3.1-3.2).

3.1.3 Besiyerleri

S. thermophilus ve *Lb. bulgaricus* suşlarının yeni stoklarının hazırlanmasında sırasıyla M17 ve MRS Broth; bu suşlara özgül fajların izolasyonunda, titrelerinin yükseltilmesi ve konakçı özgüllüklerinin belirlenmesinde ise sırasıyla thM17 ve MRS Broth, Yumuşak Agar (sırasıyla % 0.45 ve % 0.6 agar) ve Agar (% 1.5) besiyerleri kullanılmıştır (Sozzi *et al.* 1976, Krusch *et al.* 1987). Bu besiyerlerinin bileşimleri Ek-1’de verilmiştir. *Lb. bulgaricus* fajları ile çalışılırken besiyerlerine fajın konakçısına adsorbe olmasını sağlamak amacıyla CaCl₂ (10 mmol.l⁻¹) eklenmiştir (Foschino *et al.* 1995).

3.1.4 Enzim ve ince kimyasallar

Fajların protein profillerinin çıkarılması amacıyla, öncelikle saflaştırıldıkları aşamada DNaz I (Sigma, D-7291), RNaz A (Sigma, R-5503) enzimleri; klasik yöntemle DNA izolasyonu denemelerinde ise bu enzimlere ek olarak kapsid proteinlerini parçalamak amacıyla Proteinaz-K (Applichem A38330-0100) kullanılmıştır. SDS-PAGE ile protein profillerinin belirlendiği denemelerde fajların sahip oldukları protein bantlarının büyüklüklerinin hesaplanmasında, Sigma marka Low Range M-3913 (36-6.5 kDa) ve High Range, M-3788 (205-36 kDa) merdivenlerden (marker) yararlanılmıştır.

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan *S. thermophilus* fajlarının; kodları, endüstriyel konakçıları, izolasyon materyali ve sağlandığı kaynaklar

FAJ KODU	KONAKÇI BAKTERİ	İZOLASYON MATERYALİ	KAYNAK
Φ1B3-A	<i>S.thermophilus</i> B3	Çiğ süt	Acar (2002)
Φ2B3-A	<i>S.thermophilus</i> B3	Çiğ süt	
ΦB3-X11	<i>S.thermophilus</i> B3	CH-1 Ayran (A.O.Ç.)	TÜBİTAK/TARP (2106) PROJESİ
ΦB3-X12	<i>S.thermophilus</i> B3	231 Bulk (A.Ü.Z.F.)	
ΦB3-X13	<i>S.thermophilus</i> B3	231 Bulk (A.Ü.Z.F.)	
ΦB3-X14	<i>S.thermophilus</i> B3	709 Bulk (HİTİT)	
ΦB3-X15	<i>S.thermophilus</i> B3	709 Ayran (HİTİT)	
ΦB3-X16	<i>S.thermophilus</i> B3	CH-1 Bulk (A.O.Ç.)	
ΦB3-X17	<i>S.thermophilus</i> B3	B3 Bulk (A.O.Ç.)	
ΦB3-X18	<i>S.thermophilus</i> B3	Yoğurt (A.Ü.Z.F.)	
ΦB3-X19	<i>S.thermophilus</i> B3	Yoğurt (A.O.Ç.)	
ΦB3-X20	<i>S.thermophilus</i> B3	Yoğurt (A.O.Ç.)	
Φ709-X1	<i>S.thermophilus</i> 709	CH-1 Ayran (A.O.Ç.)	TÜBİTAK/TARP (2106) PROJESİ
Φ709-X2	<i>S.thermophilus</i> 709	231 Bulk (A.Ü.Z.F.)	
Φ709-X3	<i>S.thermophilus</i> 709	231 Yoğurt (A.Ü.Z.F.)	
Φ709-X4	<i>S.thermophilus</i> 709	709 Bulk (HİTİT)	
Φ709-X5	<i>S.thermophilus</i> 709	709 Ayran (HİTİT)	
Φ231-X6	<i>S.thermophilus</i> 231	CH-1 Ayran (A.O.Ç.)	TÜBİTAK/TARP (2106) PROJESİ
Φ231-X7	<i>S.thermophilus</i> 231	231 Bulk (A.Ü.Z.F.)	
Φ231-X8	<i>S.thermophilus</i> 231	231 Yoğurt (A.Ü.Z.F.)	
Φ231-X9	<i>S.thermophilus</i> 231	709 Bulk (HİTİT)	
Φ231-X10	<i>S.thermophilus</i> 231	709 Ayran (HİTİT)	
Φ231-X21	<i>S.thermophilus</i> 231	Yoğurt (TATAL)	
Φ231-X22	<i>S.thermophilus</i> 231	Yoğurt (A.O.Ç.)	
Φ231-X23	<i>S.thermophilus</i> 231	Kaşar PAS (BİRTAT)	
Φ231S-A1MÖ	<i>S.thermophilus</i> 231	Pastörize süt	BİYOTEKN. ENS. (67) PROJESİ

A.O.Ç. : Atatürk Orman Çiftliği

A.Ü.Z.F. : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt İşletmesi

HİTİT, TATAL, BİRTAT: Diğer Süt İşletmeleri

Bulk : Çizelgede yer alanların hepsi yoğurt bulk kültürüdür.

PAS : Peynir altı suyu

Not : İzolasyon materyallerinin üretiminde kullanılan starterin bilinmesi durumunda, kodu ürünün başında belirtilmiştir

Çizelge 3.2 Araştırmada kullanılan *Lb. bulgaricus* fajlarının; kodları, endüstriyel konakçıları, izolasyon materyali ve sağlandığı kaynaklar

FAJ KODU	KONAKÇI BAKTERİ	İZOLASYON MATERYALİ	KAYNAK
ΦY4-X1 (ΦH2Y4)	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	Kaşar PAS (GÜVEN)	TÜBİTAK/TARP (2106) PROJESİ
ΦY4-X2 (ΦMY4)	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	Bulk (A.Ü.Z.F.)	
ΦY4-X3 (ΦJY4)	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	Kaşar PAS (GÜVEN)	
ΦY4-X4 (ΦFY4)	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	Yoğurt (A.Ü.Z.F.)	
ΦY4-X5 (ΦH3-Y4)	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	Kaşar PAS (GÜVEN)	
ΦY4-X6 (ΦH1Y4)	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	Kaşar PAS (GÜVEN)	
ΦY4-X8 (ΦSIYY4)	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	Yoğurt (A.Ü.Z.F.)	
ΦY4-X9 (Φ709BY4)	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	709 Bulk	
ΦY4-X10 (ΦSIBY4)	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	Bulk (A.Ü.Z.F.)	
ΦY4-X12 (ΦPY4)	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	Yoğurt (HİTİT)	
ΦV1-X19 (ΦHV1)	<i>Lb.bulgaricus</i> V1	Kaşar PAS (GÜVEN)	TÜBİTAK/TARP (2106) PROJESİ
ΦV2-X21 (ΦGV2)	<i>Lb.bulgaricus</i> V2	Yoğurt (A.O.Ç.)	TÜBİTAK/TARP (2106) PROJESİ
ΦV2-X22 (ΦG1V2)	<i>Lb.bulgaricus</i> V2	Yoğurt (A.O.Ç.)	
ΦV2-X23 (ΦG3V2)	<i>Lb.bulgaricus</i> V2	Yoğurt (A.O.Ç.)	
ΦV2-X24 (ΦG4V2)	<i>Lb.bulgaricus</i> V2	Yoğurt (A.O.Ç.)	
ΦV2-X25 (ΦG5V2)	<i>Lb.bulgaricus</i> V2	Yoğurt (A.O.Ç.)	
ΦV2-X26 (ΦGKV2)	<i>Lb.bulgaricus</i> V2	Yoğurt (A.Ü.Z.F.)	
ΦV2-X27 (ΦKV2)	<i>Lb.bulgaricus</i> V2	Yoğurt (A.Ü.Z.F.)	
ΦV2-X28 (ΦLV2)	<i>Lb.bulgaricus</i> V2	Yoğurt (A.Ü.Z.F.)	
ΦY4L-A	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	Çiğ süt	BİYOTEKN. ENS. (67) PROJESİ
ΦY4L-Z	<i>Lb.bulgaricus</i> Y4	Çiğ süt	
ΦV1L-A	<i>Lb.bulgaricus</i> V1	Çiğ süt	
ΦV2L-A	<i>Lb.bulgaricus</i> V2	Çiğ süt	
ΦV2L-Z	<i>Lb.bulgaricus</i> V2	Çiğ süt	

A.O.Ç. : Atatürk Orman Çiftliği
A.Ü.Z.F. : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt İşletmesi
HİTİT, GÜVEN : Diğer Süt İşletmeleri
Bulk : Çizelgede yer alanların hepsi yoğurt bulk kültürüdür.
PAS : Peynir altı suyu
Not : Parantez içindeki kodlar, daha önce projede verilen orijinal kodlardır.

Ön denemelerden sonra klasik yöntemle DNA izolasyonundan vazgeçilmiş önerisi ile faj DNA izolasyon kitleri (Lambda DNA Mini Isolation Kit, 12154, Qiagen) alınmıştır. DNA izolasyonlarının tamamlanmasından sonra bu DNA'ların restriksiyon kesim şablonları elde edilmiştir. Bu amaçla Sigma marka *EcoRI* (R-6265), *PvuII* (R-2631), *HindIII* (R-1137), *ClaI* (R-7763), *HaeII* (R-4257), *PstI* (R-7023), *BamHI* (R-0260) enzimleri ile Fermentas marka *EcoRV* (ER0301) ve *HhaI* (ER1851) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. Kesimler sonrası oluşan fragmentlerin büyüklükleri

ise, λ DNA *HindIII/EcoRI* (Fermentas, SM 0191) merdiveninden yararlanarak hesaplanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Faj izolasyonu, saflaştırma ve zenginleştirme

3.2.1.1 Çiğ ve pastörize süttten faj izolasyonu

100 ml çiğ veya pastörize süt örneğine % 10'luk laktik asitten 6 ml eklenerek kazeinin çökmesi için bir süre beklenmiş ve daha sonra kaba filtre kağıdından süzölmüş ve 5000 rpm (dv/dk)'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanta, % 10 kloroform (Billing 1969) ilave edilerek bakterilerden arındırılmıştır.

3.2.1.2 Çift tabaka agar yöntemiyle faj varlığının belirlenmesi

Bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı gibi elde edilen süzöntülerden 1'er ml steril tüplere alınmış, üzerlerine 4 saatlik konakçı bakteri kültürlerinden 0.1'er ml eklenmiştir. Adsorpsiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 10 dk beklendikten sonra sıvı besiyeri eklenerek 43°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, hücre artıklarını ve partikülleri uzaklaştırmak için 5000 dv/dk'da 10 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Elde edilen süpernatantlara % 10 kloroform eklenmiştir. Faj varlığını belirlemek için içerisinde 4 saatlik konakçı kültüründen 0.1 ml bulunan 3 ml yumuşak agar, önceden petri kutularına dökölmüş olan agar üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Agar katılaştıktan sonra mikroyenjektör yardımıyla 10'ar µl süpernatant agar üzerine damlatılmıştır. 43°C, 18 saat inkübasyon sonucunda damlatma yapılan bölgelerde plak oluşumunun (liziz) görülmesiyle faj varlığı saptanmıştır.

3.2.1.3 Faj saflaştırması (Tek plak izolasyonu)

Faj varlığı saptanan faj süspansiyonlarını saflaştırmak için tek plak izolasyonuna gidilmiştir. Faj süspansiyonlarının 10^{-6} 'ya kadar FTS (fizyolojik tuzlu su) kullanılarak dilüsyonları hazırlandıktan sonra, her bir dilüsyondan 0.2'şer ml, içerisinde 0.2'şer ml 4 saatlik konakçı bakteri bulunan steril endorf tüplere alınmıştır. Adsorpsiyon için oda sıcaklığında 10 dk beklendikten sonra, faj-bakteri karışımı 3 ml yumuşak agar içine katılmış ve hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım önceden hazırlanmış agarlı besiyeri üzerine dökülmüş ve homojen bir dağılım sağlandıktan sonra 43°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan plakların tek tek düştüğü bir bölgeden tek bir plak steril enjektör ucuyla kesilip, steril bir tüp içerisine alınmıştır. Bu tüpe 5 ml sıvı besiyeri eklenip iyice karıştırılarak fajların besiyerine geçmesi sağlanmıştır. 4 saatlik konakçı kültürden tekrar 0.1 ml alınarak bu tüp içine pipetlenmiş ve adsorpsiyonun gerçekleşmesinden sonra 5 ml daha sıvı besiyeri eklenmiştir. 43°C'de 18 saat inkübasyonun ardından hücre artıklarını uzaklaştırmak için 5000 dv/dk'lık santrifüj işlemi 10 dk süre ile uygulanmıştır. Elde edilen süpernatant, 0.45 µm porlu filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilerek veya % 10 kloroform eklenerek saf faj filtratı olarak kullanılmıştır.

3.2.1.4 Zenginleştirme ve titre belirlenmesi

Saf faj filtratının zenginleştirilmesi için daha önce de anlatıldığı gibi faj ve 4 saatlik konakçı bakteri, sıvı ortamda istenilen titreye ulaşmaya kadar pasajlar yapılarak karşılaştırılmıştır. Titrenin belirlenmesi için son karşılaştırmaya ait faj süspansiyonunun 10^{-6} 'ya kadar FTS içerisinde dilüsyonları hazırlanmış ve yine çift tabaka agar yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, 4 saatlik konakçı kültüründen 0.1 ml alınarak 3 ml yumuşak agar ile karıştırılmış ve önceden hazırlanmış agarlı besiyeri üzerine yayılmıştır. Agarın katılaşmasından sonra faj dilüsyonlarından petri kutusunda belirlenmiş olan bölgelere mikroenjektör ile 10'ar µl damlatılmıştır. 43°C'de 18 saat inkübasyon sonunda faj plakları, damlatıldıkları bölgelerde sayılmıştır. Faj titresi (plak oluşturma birimi,

pfu/ml), örneğin 10^{-6} dilüsyonundan damlatılmış bölgede 3 faj plağı görülmüşse $3 \times 10^6 \times 100 = 3 \times 10^8$ pfu/ml olarak belirlenmiştir.

3.2.2 Fajların saklanması

S. thermophilus ve *Lb. bulgaricus* suşları, sırasıyla M17 ve MRS Broth besiyerleri içerisine % 15-20 gliserol katılarak -18°C 'de korunmaya alınmıştır (Krusch *et al.* 1987). Fajlar ise titreleri 10^8 pfu/ml ve daha yüksek titreye ulaştıktan sonra 0.45 µm porlu filtrelerden geçirilmiş, % 15 gliserol eklenerek -18°C 'de saklanmıştır.

3.2.3 Suşların faj özgüllüklerinin belirlenmesi

Önde bahsedilen tamamlanmış iki projede (TÜBİTAK/TARP 2106 ve A.Ü. Bitoteknoloji Enst. 67 nolu proje) çiğ süt kökenli *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşlarının tamamı ve pastörize süt kökenli suşların da yarısı faj özgüllüklerinin tespit edilmesi çalışmalarında belirlendiğinden (Tunail vd. 2002, Kaleli *et al.* 2004, Özyurt 2005, Kahraman 2006) burada yalnızca henüz tamamlanmamış olan kısma ait denemeler yürütülmüştür. Bu kapsamda Dr. Remziye Yılmaz'ın izolatu olan 44 adet *S. thermophilus* suşu (43 adet pastörize süt kökenli, 1 adet ticari suş, St 20.1) ve 13 adet yerel *Lb. bulgaricus* suşu (12 adet pastörize süt kökenli, 1 adet ticari suş, Ch-Lb12), Çizelge 3.1'de görüleceği üzere B3 konakçısı ile izole edilmiş 10 adet *S. thermophilus* fajına ve Çizelge 3.2'de görülen V1 ve V2 *Lb. bulgaricus* fajlarına karşı test edilmiştir. Bunlara ek olarak çizelgelerde yer almayan Φ231-X17, ΦV1-X20, ΦV2-X29 ve ΦV2-X30 fajları da denemelerde kullanılmıştır.

Suşların fajlara karşı duyarlı olup olmadıklarının anlaşılması için öncelikle logaritmik fazda olan bakteri, 3 ml yumuşak agar ile karıştırılarak önceden dökülerek hazırlanmış agar plakları üzerine yayılmıştır. Agarın katılaşmasından sonra titresini 10^8 - 10^9 pfu/ml olan fajlar, 10'ar µl olacak şekilde agar üzerinde belirlenmiş bölgelere damlatılmış, 42-

43°C’de 18 saat inkübasyon sonunda faj plaklarının oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.4 Faj protein profilleri

3.2.4.1 Fajların saflaştırılması ve konsantre edilmesi

Fajların saflaştırması ve konsantre edilmesi amacıyla Sambrook vd. (1989) tarafından önerilen yöntem ile çalışılmıştır. Titresi 10^8 - 10^9 pfu/ml olan 50 ml faj örneğine, son konsantrasyonları 1 µg/ml olacak şekilde DNaz ve RNaz eklendikten sonra, 37° C’de 1-2 saat beklenmiştir. İnkübasyon sonrası hücre artıklarını uzaklaştırmak amacıyla faja, son konsantrasyonu 1 M olacak şekilde NaCl katılarak hızlıca karıştırılmıştır. 1 saat buzlu su içerisinde bekletilen faj örneği, 15000-18000 g’de 4°C’de 15 dakika santrifüjlenmiş (Sigma 3K-30) ve süpernatant temiz bir erlene alınmıştır. Hücre artıklarından arınmış faj süspansiyonuna, son konsantrasyonu % 10 (w/v) olacak şekilde katı PEG 8000 (polietilen glikol, Sigma) eklenmiş, çözünmesi için yavaş yavaş karıştırılmış ve tekrar buzlu su içerisinde bir gece bekletilmiştir. 4°C’de 15 dakika süresince 15000-18000 g’lik santrifüj işlemi uygulanarak PEG 8000 ile faj partikülleri çöktürülmüştür. Süpernatant dikkatlice dökülmüş, pelet, 700 µl SM (Faj Tamponu, Ek-1) içerisinde çözülmüştür. Üzerine eşit hacimde kloroform eklenerek 4°C’de 9000 g hızla 15 dakika santrifüj edilmiş böylece hücre artıkları ve PEG 8000, faj süspansiyonundan uzaklaştırılmıştır. Faj partiküllerini elde edebilmek için süspansiyon, 4°C’de 20000 dv/dk hızla 2 saat santrifüjlenerek faj peleti elde edilmiştir.

3.2.4.2 Faj protein profillerinin çıkarılması

Faj protein profillerinin çıkarılması amacıyla, SDS-PAGE kesikli sistem kullanılmış ve bu amaçla % 5’lik yığılma jeli ile % 12,5’luk ayırma jeli hazırlanmıştır (Sambrook *et al.* 1989). Bölüm 3.2.4.1’de elde edilen faj peleti üzerine 40-100 µl SDS-PAGE örnek

yükleme tamponu ilave edilmiş 100°C’de 5 dakika kaynatıldıktan sonra 35-40 µl örnek, jele yüklenmiştir (Yoon *et al.* 2001). 25-30 mA 125-150 V’luk elektrik akımıyla SDS-PAGE (CBS, 190-02) ile gerçekleştirilmiştir (Laemmli 1970). Protein bantlarının tespiti ve boyanması için Bushuk vd. (1997) ve Demiralp vd. (2000) tarafından önerilen yöntemler kullanılmıştır. Fajların sahip oldukları protein büyüklüklerinin hesabı, yüksek (205-66 kDa) ve düşük protein (66-6.5 kDa) büyüklüğü aralığına sahip merdivenler kullanılarak, Biasis Ltd. Ş. tarafından geliştirilen EJA-09 adlı program ile yapılmıştır.

<u>Elektroforez Tamponu (5X)</u>	<u>1000 ml</u>
Glisin	94 g
Tris	15,1 g
SDS (% 10)	50 ml
 <u>Örnek Yükleme Tamponu</u>	 <u>20 ml</u>
0,5 M TrisCl (pH 6,8)	2,5 ml
Gliserol	2 ml
SDS (% 10)	4 ml
β-merkaptoetanol	1 ml
Brom Fenol Mavisi	0,5 ml
Distile Su	8 ml
 <u>% 5 lik Yığılma Jeli</u>	 <u>20 ml</u>
Distile Su	13,6 ml
% 30 Akrilamid	3,3 ml
1 M TrisCl (pH 6,8)	2,5 ml
SDS (% 10)	200 µl
AP (% 10)	200 µl
TEMED	20 µl
 <u>% 12,5 luk Ayırma Jeli</u>	 <u>40 ml</u>
Distile Su	19,8 ml
% 30 Akrilamid	13,6 ml
1,5 M TrisCl (pH 8,6)	12,5 ml
SDS (% 10)	500 µl
AP (% 10)	500 µl
TEMED	40 µl

Tespit Çözeltisi	250 ml
Distile Su	142,5 ml
Metanol	82,5 ml
TCA (% 100)	25 ml

Boya Çözeltisi	
Boya	150 ml
TCA (% 100)	25 ml
KOH (10 N)	17,5 ml

3.2.5 Restriksiyon endonükleaz analizleri

3.2.5.1 Faj DNA izolasyonu

Faj DNA izolasyonları, Qiagen Lambda DNA Isolation Kit kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu kitin çalışma prensibi, Sambrook vd. (1989) tarafından önerilen ve Bölüm 3.2.4.1’de verilen yöntemle uyum göstermektedir. Öncelikle 10^{10} - 10^{11} pfu/ml titreye sahip faj filtratları, DNaz ve RNaz enzimleriyle muamele edilmekte ve bakteriye ait DNA ve RNA’nın parçalanması sağlanmaktadır. Daha sonra içerisinde PEG 6000 olan tampon ile 4°C’de 1 gece bekletilen faj lizati, inkübasyonunun ardından santrifüj edilerek lizati oluşturan faj partiküllerinin konsantre edilmesi amaçlanmaktadır. Konsantre edilen faj partiküllerine, SDS ilavesiyle faj proteinlerinin parçalanması ve DNA’ların serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Parçalanmış faj proteinleri potasyum asetat ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Bundan sonraki aşamada klasik yöntemden farklı olarak resin kolonlar kullanılmaktadır. Resin kolonlara tutturulan DNA, kolondan geri alınmış, izopropanol ile görünür hale getirilmiştir. Son olarak DNA’yı kalıntı tuzlardan uzaklaştırmak ve daha kolay çözünür hale getirmek için % 70’lik etanol ile yıkama yoluna gidilmiştir. Elde edilen DNA peleti, TE (pH 8, 10mM Tris.Cl, 1 mM EDTA) tamponunda çözülerek saklanmıştır.

İzolasyonları gerçekleştirilen DNA’lar, % 0.8-1’lik agaroz jelde 60 V da yürütülmüş, GEL LOGIC 100 IMAGING SYSTEM (A.Ü. Veterinerlik Fakültesi Viroloji Bölümü) yardımıyla enzim kesimine girecek DNA miktarına karar verilmiştir. *S. thermophilus*

fajlarının filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla, PHILIP 3.6 Version yazılımında bulunan Peny adlı program ile Philogramları çıkarılmıştır.

3.2.5.2 Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim

S. thermophilus B3, 231 ve 709 kodlu starter suşlarına özgül 26 adet faj (Çizelge 3.1), *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII*, *HindIII*, *ClaI*, *HaeII*, *HhaI*, *PstI*, *BamHI*; *L. bulgaricus* Y4, V1, V2 kodlu starter kültürlerine etkili 24 adet faj (Çizelge 3.2), *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII*, *HindIII*, *HhaI*, *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesime alınmıştır. % 0.8-1'lik agaroz jele yüklenen DNA fragmentleri GEL LOGIC 100 IMAGING SYSTEM (A.Ü. Veterinerlik Fakültesi Viroloji Bölümü) ile görüntülenmiştir.

Reaksiyon karışımlarının hacmi 10-15 µl olacak şekilde ayarlanmış, 37°C'de 2 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

Reaksiyon Karışımı

DNA	Değişken
Enzim	10-15 u (unit)
Tampon	1 µl
Çift distile su	Değişken

3.2.6 Faj replikasyon parametreleri

3.2.6.1 Konakçı suşların gelişme eğrilerinin çıkarılması

Fajların, tek aşamalı gelişme eğrilerinin çıkarılmasında ve konakçılarına adsorbe olma oranlarının bulunmasında ortama katılan faj ve bakteri sayısının bilinmesi, ona göre MOI (multiplicity of infection) değerinin tespit edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle konakçı olan suşların gelişme eğrileri çıkarılmıştır. 18 saatlik aktif kültürden yeni besiyerine % 1'lik inokülasyon yapılmış, bir yandan 1-2 saat aralıklarla 650 nm dalga

boyunda absorbans ölçümü yapılırken bir yandan da *S. thermophilus* suşlarından M17 agara, *Lb. bulgaricus* suşlarından da MRS agara ekim yapılmıştır. Böylelikle faj denemelerinde kullanılacak olan konakçı kültürün logaritmik fazda (üreme fazı) verdiği hem absorbans değeri hem de sayısı belirlenmiştir.

3.2.6.2 Latent dönem süresinin ve patlama büyüklüğünün belirlenmesi (Tek aşamalı gelişme testi)

Fajların tek aşamalı gelişme eğrileri Reyes-Gavillon vd. (1990) ve Suarez vd. (2002) tarafından önerilen yöntem baz alınarak gerçekleştirilmiştir. 650 nm dalga boyunda yaklaşık 0.5 absorbans değerini veren logaritmik fazda bulunan konakçı bakteriden 900 µl alınıp üzerine titresini 1×10^8 pfu/ml olan fajdan 100 µl eklenmiştir. Böylece MOI değeri yaklaşık 0.1 olarak ayarlanmıştır. *S. thermophilus* fajları için, 42°C’de 10 dakika (Duplessis and Moineau 2001); *Lb. bulgaricus* fajları için, 42°C’de 15 dakika adsorbsiyonun gerçekleşmesi için beklenmiş, inkübasyondan sonra adsorbe olmayan fajları uzaklaştırmak için 5500 rpm’de 10 dk santrifüj işlemi uygulanmış ve süpernatant dökülmüştür. *S. thermophilus* fajlarına ait peletler, 10 ml thM17 Broth besiyerinde; *Lb. bulgaricus* fajlarına ait peletler ise 10 ml thMRS Broth besiyerinde çözüldükten sonra 10^{-7} ’ye kadar sırasıyla thM17 ve MRS Broth besiyerlerinde dilüsyonları hazırlanmış ve inkübasyona bırakılmışlardır. Sıfırıncı dakika dahil *S. thermophilus* fajları ile çalışılırken 5’er dk, *Lb. bulgaricus* fajları ile çalışırken ise 10-15’er dk arayla dilüsyonlarda 100’er µl alınıp çift tabaka agar yöntemi ile faj titresini belirlenmiştir.

Çift tabaka agar yöntemiyle belirlenen faj titrelerinin bir süre sabit kaldığı görülmüş ve buradan fajların latent dönem süreleri belirlenmiştir. Latent dönemin sonunda faj titresinin artmaya başladığı, daha sonra ise yine artan titrenin sabit kaldığı görülmüştür. Bu zaman aralığı ise fajların artış dönem sürelerinin belirlenmesini sağlamıştır. Artarak sabit kalan faj sayısının latent dönemdeki faj sayısına oranlanmasıyla faj patlama büyüklükleri bulunmuştur.

Fajların latent dönem süreleri spektrofotometrik yöntemle de saptanabilmektedir. Bu amaçla MOI değeri yaklaşık 10 olarak ayarlanmış faj-konakçı karışımı, inkübasyondan sonra santrifüj edilmiş ve elde edilen pelet 10 ml sıvı besiyerinde çözülmüştür. 42°C’de inkübasyona bırakılan örneklerin belirli aralıklarla 650 nm’de absorbans değerleri ölçülerek latent dönem süreleri bulunmuştur.

3.2.6.3 Fajların plak etkinlikleri (EOP), % adsorbsiyon oranları ve plak morfolojileri

Fajın duyarlı konakçıda verdiği titrenin homolog konakçısında verdiği titreye bölünmesiyle Faj Plak Etkinliği (EOP) hesaplanmıştır (Sanders and Klaenhammer 1980).

Fajların konakçı suşlara adsorbsiyon oranlarını belirlemek amacıyla, titresini 10^6 pfu/ml olan fajdan 100 µl alınarak 900 µl logaritmik fazda bulunan konakçı bakteri üzerine eklenmiştir. % 90’ın üzerinde adsorbsiyon için; *S. thermophilus* fajları 42-43°C’de 10 dakika, *Lb. bulgaricus* fajları ise 42-43°C’de 15 dakika bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra bakteri-faj karışımı 5500 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve adsorbe olmayan fajları içeren süpernatanttaki faj titresini belirlenerek aşağıdaki formülden % adsorbsiyon hesaplanmıştır (Sanders and Klaenhammer 1980).

$$\% \text{ Adsorbsiyon} = \frac{(\text{Başlangıç faj titresini} - \text{Adsorbsiyon sonrası faj titresini})}{\text{Başlangıç faj titresini}} \times 100$$

Çift tabaka agar yöntemiyle titre belirleme çalışmaları sırasında fajların oluşturdukları plaklardan, plak morfolojileri belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4. 1 Fajların Konakçı Özgüllüklerinin Belirlenmesi (Litik Spektrum)

Koleksiyonda bulunan fajlardan, konakçısı B3 endüstriyel suşu olan 10 adet *S. thermophilus* fajı öncelikle 44 adet *S. thermophilus* (43 adet pastörize süt kökenli yerel suş ve 1 adet ticari suş) suşu ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.1). Tüm *S. thermophilus* suşlarının, kendi türünün fajlarına karşı dirençli olduğu saptanmıştır. Aynı suşlar, yoğurt üretiminde *Lb. bulgaricus* ile miks halde kullanılmaya aday olduklarından, yine koleksiyondan alınan homolog konakçıları endüstriyel *Lb. bulgaricus* 231, V1, V2 olan 13 adet *Lb. bulgaricus* fajı ile de karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.2). *S. thermophilus* suşlarından hiçbirinin *Lb. bulgaricus* fajları ile lize olmadığı görülmüştür. Bu karşılaştırma, *S. thermophilus* fajlarının türler arası heterolog konakçıların bulunup bulunmadığını test etmek amacıyla yapılmıştır. *S. thermophilus* fajlarının heterolog konakçısı belirlenmemiştir.

Bu tez kapsamında ayrıca, pastörize sütlerden izole edilmiş olan *Lb. bulgaricus* yerel suşları, bir adet ticari suş (Ch-Lb12) ile birlikte, yine öncelikle kendi türünün fajları olan ve 231, V1, V2 konakçılarıyla elde edilen 13 *Lb. bulgaricus* fajına karşı test edilmiştir (Çizelge 4.3). Denenen 13 fajdan, yalnızca ticari starter suşu Ch-Lb12 fajlara tam direnç gösterirken, diğer tüm yerel *Lb. bulgaricus* suşları tamamen duyarlı bulunmuştur. Yukarıda belirtilen miks kültür gerekçesiyle aynı suşlar bir kez de *S. thermophilus* fajlarına karşı denenmiştir (Çizelge 4.4). 11 adet *Lb. bulgaricus* suşu, *S. thermophilus* fajlarına tam direnç sergilerken diğer üçünün bazı fajlarla liziz plakları oluşturdukları gözlemlenmiştir. ΦB3-X19, Lb1312-1 suşunu; ΦB3-X12, ΦB3-X13 ve ΦB3-X19, Lb1313-1 suşunu; ΦB3-X15 de Lb1433-1 suşunu türler arası heterolog konakçı olarak kullanmıştır.

Çizelge 4.1 Pastörize sütlerden izole edilmiş 43 adet *S. thermophilus* suşu ile 1 adet ticari suşun değişik süt ürünlerinden izole edilmiş 10 adet *S. thermophilus* fajına karşı dirençlilikleri

Suş Kodu	Faj Kodu									
	St ΦB3-X11	St ΦB3-X12	St ΦB3-X13	St ΦB3-X14	St ΦB3-X15	St ΦB3-X16	St ΦB3-X17	St ΦB3-X18	St ΦB3-X19	St ΦB3-X20
St 216	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 217	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 218	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 219	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 229	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 235	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 236	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 238	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 239	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 411	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 412	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 413	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 421	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 422	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 432	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 435	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 436	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 437	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 440	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 447	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 481	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 525	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 526	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Çizelge 4.1 Pastörize sütlerden izole edilmiş 43 adet *S. thermophilus* suşu ile 1 adet ticari suşun değişik süt ürünlerinden izole edilmiş 10 adet *S. thermophilus* fajına karşı dirençlilikleri (devam)

Suş Kodu	Faj Kodu									
	St ΦB3-X11	St ΦB3-X12	St ΦB3-X13	St ΦB3-X14	St ΦB3-X15	St ΦB3-X16	St ΦB3-X17	St ΦB3-X18	St ΦB3-X19	St ΦB3-X20
St 533	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 534	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 535	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 537	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 542	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 543	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 545	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 552	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 553	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 614	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 622	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 624	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 626	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 631-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 634-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 641	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 643	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 645	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 646	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 652	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St20.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(SK)										
SK: Starter Kültür —: dirençli										

Çizelge 4.2 Pastörize sütlerden izole edilmiş 43 adet *S. thermophilus* suşu ile 1 adet ticari suşun değişik süt ürünlerinden izole edilmiş 13 adet *Lb. bulgaricus* fajına karşı dirençlilikleri

Suş Kodu	Faj Kodu												
	Φ231-X17	ΦV1-X19	ΦV1-X20	ΦV2-X21	ΦV2-X22	ΦV2-X23	ΦV2-X24	ΦV2-X25	ΦV2-X26	ΦV2-X27	ΦV2-X28	ΦV2-X29	ΦV2-X30
St 216	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 217	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 218	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 219	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 229	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 235	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 236	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 238	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 239	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 411	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 412	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 413	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 421	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 422	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 432	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 435	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 436	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 437	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 440	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 447	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 481	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 525	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 526	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Çizelge 4.2 Pastörize sütlerden izole edilmiş 43 adet *S. thermophilus* suşu ile 1 adet ticari suşun değişik süt ürünlerinden izole edilmiş 13 adet *Lb. bulgaricus* fajına karşı dirençlilikleri (devam)

Suş Kodu	Faj Kodu												
	Φ231-X17	ΦV1-X19	ΦV1-X20	ΦV2-X21	ΦV2-X22	ΦV2-X23	ΦV2-X24	ΦV2-X25	ΦV2-X26	ΦV2-X27	ΦV2-X28	ΦV2-X29	ΦV2-X30
St 533	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 534	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 535	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 537	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 542	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 543	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 545	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 552	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 553	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 614	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 622	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 624	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 626	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 631-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 634-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 641	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 643	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 645	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 646	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 652	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
St 20.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(SK)													
SK: Starter Kültür —: dirençli													

Çizelge 4.3 1 adet endüstriyel, diğerleri pastörize sütlerden izole edilmiş toplam 13 adet *Lb. bulgaricus* suşunun çeşitli süt ürünlerinden izole edilmiş 13 adet *Lb. bulgaricus* fajına karşı dirençlilikleri

Suş Kodu	Faj Kodu												
	Φ231-X17	ΦV1-X19	ΦV1-X20	ΦV2-X21	ΦV2-X22	ΦV2-X23	ΦV2-X24	ΦV2-X25	ΦV2-X26	ΦV2-X27	ΦV2-X28	ΦV2-X29	ΦV2-X30
Lb 132	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb 1312-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb 1313-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb 1319	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb 1332-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb 1415	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb 1451-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb 1415-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb 1421-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb 1433-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb 1471	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb 1472	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ch-Lb12 (SK)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

SK: Starter Kültür —: dirençli +: duyarlı

Çizelge 4.4 1 adet endüstriyel, diğerleri pastörize sütlerden izole edilmiş toplam 13 adet *Lb. bulgaricus* suşunun çeşitli süt ürünlerinden izole edilmiş 10 adet *S. thermophilus* fajına karşı dirençlilikleri

Suş Kodu	Faj Kodu									
	St ΦB3-X11	St ΦB3-X12	St ΦB3-X13	St ΦB3-X14	St ΦB3-X15	St ΦB3-X16	St ΦB3-X17	St ΦB3-X18	St ΦB3-X19	St ΦB3-X20
Lb 132	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lb 1312-1	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Lb 1313-1	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Lb 1319	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lb 1332-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lb 1415	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lb 1451-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lb 1415-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lb 1421-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lb 1433-1	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
Lb 1471	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lb 1472	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ch-Lb12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(SK)										

SK: Starter Kültür —: dirençli +: duyarlı

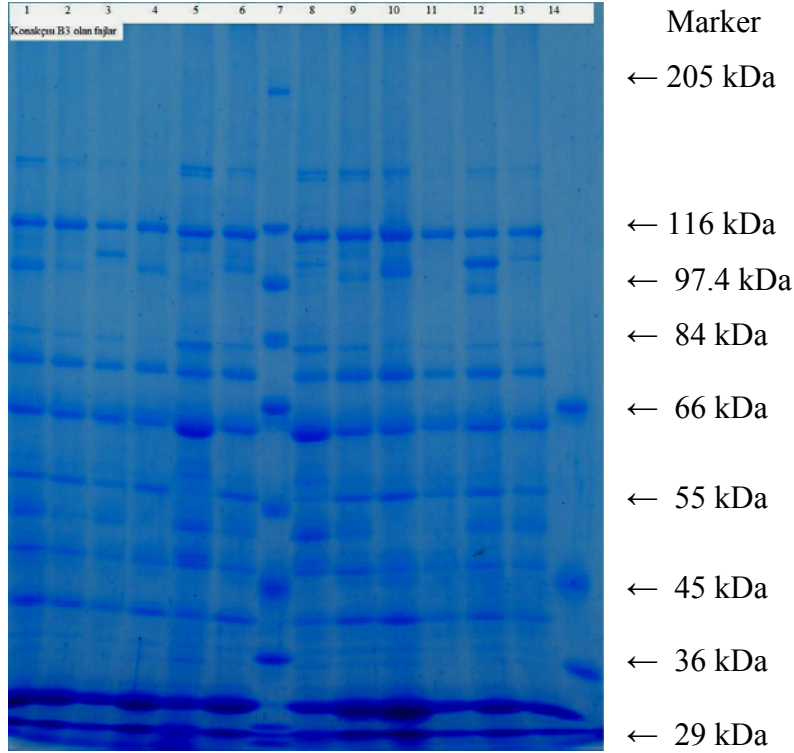
4.2 Fajların moleküler düzeyde tanımlanması

4.2.1 Yapısal Proteinler

4.2.1.1 *S. thermophilus* fajlarının yapısal protein profillerine göre tanımlanması

Endüstriyel *S. thermophilus* B3, 231 ve 709 suşlarına özgül toplam 26 adet *S. thermophilus* fajı Bölüm 3.2.4.1’de anlatıldığı gibi konsantre edilmiş, 5 dakika kaynayan suda bekletilerek denatürasyonları sağlanmış (Yoon *et al.* 2001) ve SDS-PAGE yöntemiyle yapısal proteinleri belirlenmiştir (Laemmli 1970). Fajların sahip oldukları protein büyüklüklerinin hesabı, yüksek ve düşük protein büyüklüğü aralığına sahip merdivenler kullanılarak, Biasis Ltd. Şt. tarafından geliştirilen EJA-09 adlı program ile yapılmıştır.

S. thermophilus B3, 231 ve 709 ticari kültürlerine etkili fajların protein profilleri incelendiğinde çok göze çarpan farklılıkların olmadığı tespit edilmiştir. Buna çiğ ve pastörize sütlerden izole edilen fajlar da dahildir. B3 *S. thermophilus* fajlarının protein bantları arasındaki farklılıklar çoğunlukla, Şekil 4.1’de görüldüğü üzere ilk yoğun bantların ardından gelen proteinlerden kaynaklanmaktadır. B3-X17 ve B3-X18 fajlarının 52.1 kDa’luk bantlarının olmadığı, B3-X20 fajının ise diğerlerinde olmayan 94.4 kDa’luk bir banta sahip olduğu dikkati çekmektedir. Birbirleriyle aynı protein profili veren B3-X13 ve B3-X15 fajlarının, hepsinde ortak olan 56.8 kDa büyüklüğündeki bantların diğerlerine göre daha az, yine ortak olan 63.5 kDa büyüklüğündeki bantın ise daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak ΦB3-X17 ve ΦB3-X19’un ilk yoğun bantlarının ardından gelen ve farklılık yaratan fragmentlerinin diğerlerinden daha yoğun olduğu anlaşılmıştır. 52.1 kDa büyüklüğündeki protein bantının yokluğu, B3-X12 fajını 1. gruptan ayırmıştır.



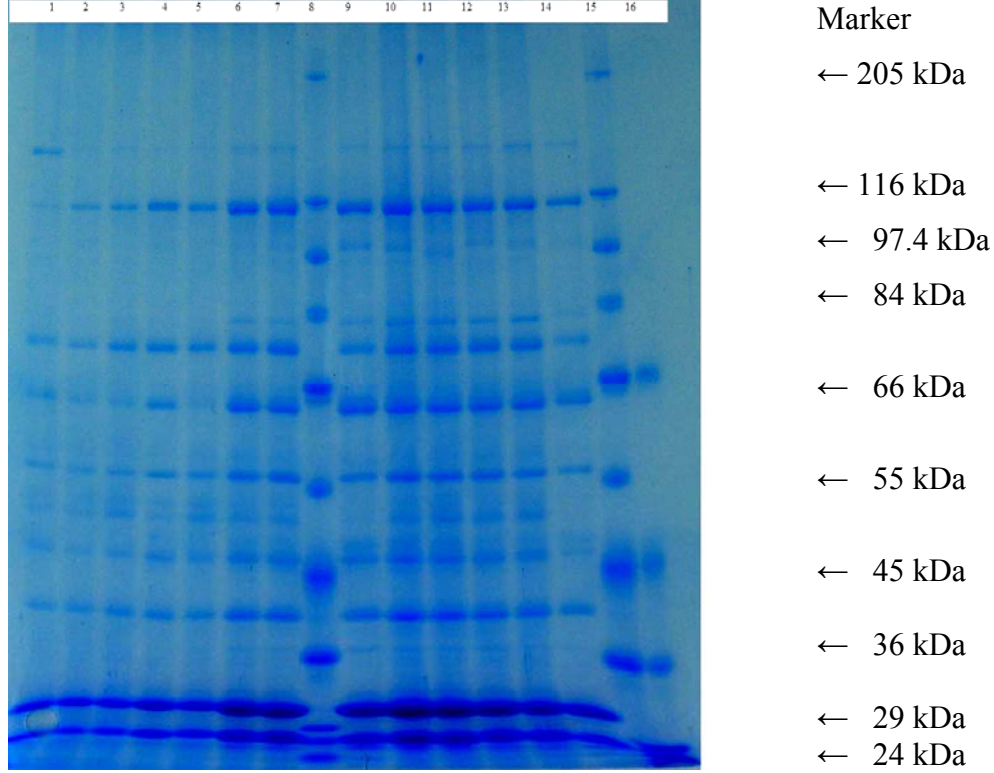
Şekil 4.1 *S. thermophilus* B3 suşlarına etkili fajların protein profilleri

- | | | | |
|------------|------------------|-------------|-------------------------------------|
| 1. Φ1B3-A | 5. ΦB3-X13 | 9. ΦB3-X16 | 13. ΦB3-X20 |
| 2. Φ2B3-A | 6. ΦB3-X14 | 10. ΦB3-X17 | 14. Marker (düşük protein ağırlığı) |
| 3. ΦB3-X11 | 7. Marker (Miks) | 11. ΦB3-X18 | |
| 4. ΦB3-X12 | 8. ΦB3-X15 | 12. ΦB3-X19 | |

Homolog konakçıları 709 ve 231 olan *S. thermophilus* suşlarına özgül fajların protein profilleri ayrı bir jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.2). 709 fajlarının sahip oldukları protein bantlarının özdeş, 231 fajlarının ise B3 fajlarında olduğu gibi küçük farklılıklar göstererek birbirlerinden ayrıldıkları tespit edilmiştir. Bununla birlikte hepsinde sabit ve önemli olan 30.6 ve 27.3 kDa büyüklüğündeki protein bantlarının varlığıdır.

709 fajlarının tamamında olduğu gibi 231-X6, 231-X7 ve 231-X23 fajlarının da ilk yoğun protein bantlarından sonra gelen ikinci bantlara sahip olmadıkları tespit

edilmiştir. Ayrıca 231-X8 ve 231-X23 fajlarında 52.1 kDa büyüklüğündeki bantın varlığına rastlanmamıştır.



Şekil 4.2 *S. thermophilus* 709 ve 231 suşlarına etkili fajların protein profilleri

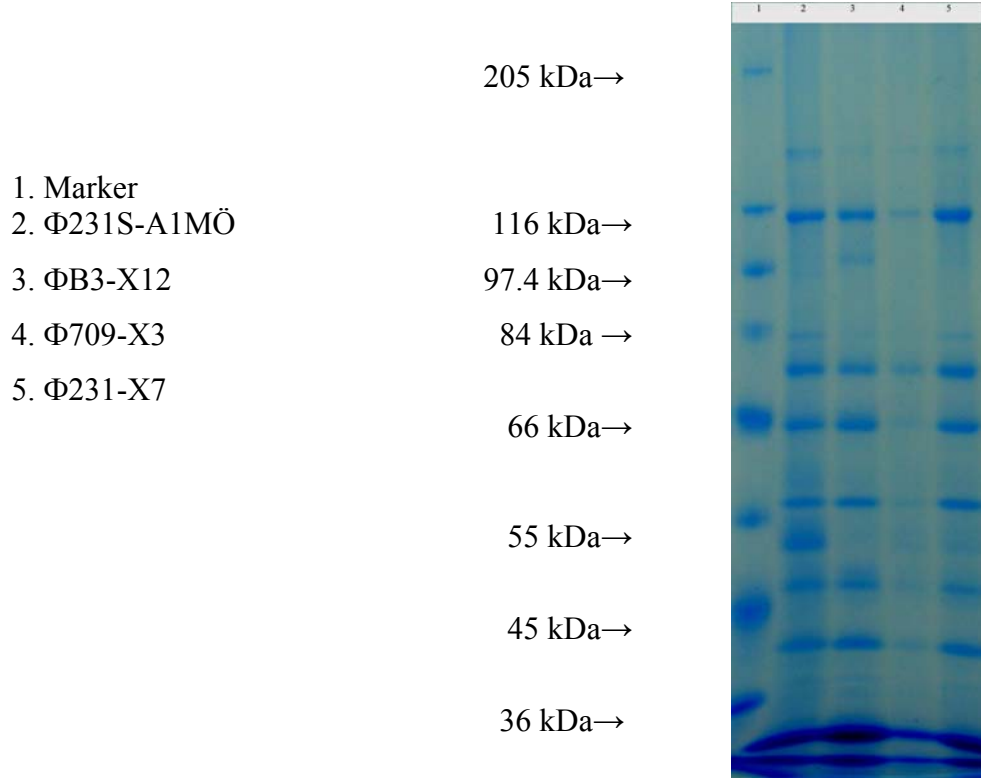
- | | | | |
|------------|------------------|--------------|-------------------------------------|
| 1. Φ709-X1 | 5. Φ709-X5 | 9. Φ231-X8 | 13. Φ231-X22 |
| 2. Φ709-X2 | 6. Φ231-X6 | 10. Φ231-X9 | 14. Φ231-X23 |
| 3. Φ709-X3 | 7. Φ231-X7 | 11. Φ231-X10 | 15. Marker (Miks) |
| 4. Φ709-X4 | 8. Marker (Miks) | 12. Φ231-X21 | 16. Marker (düşük protein ağırlığı) |

Elde edilen profillerin birarada değerlendirilmesi durumunda 8 farklı profilin ortaya çıktığı görülmektedir.

231S-A1MÖ fajının protein profilinin görüntüleneceği jelle, ΦB3-X12, Φ709-X3 ve Φ231-X7 faj örnekleri de yüklenmiştir (Şekil 4.3). Böyle yapılmasının nedeni konakçıları farklı ancak birbirine çok benzer profil veren bu fajlardan hangisine

benzeyeceğinin saptanmasının kolaylaştırılmasıdır. Şekil 4.3'den de anlaşılacağı üzere bu fajın sahip olduğu protein bantlarının, Φ231-X7 proteinleri ile aynı olduğu saptanmıştır.

1. Grup Φ231-X6 Φ231-X7 Φ231S-A1MÖ Φ709-X1 Φ709-X2 Φ709-X3 Φ709-X4 Φ709-X5	2. Grup 231-X8	3. Grup Φ231-X10 Φ1B3-A Φ2B3-A ΦB3-X14 ΦB3-X16 ΦB3-X17 Φ231-X10	4. Grup Φ231-X21 ΦB3-X20 ΦB3-X11
1. Grup 153 149 112 82.5 75 63.5 56.8 <u>52.1</u> 47.1 40.8 30.6 27.3	2. Grup 153 149 112 <u>103</u> 82.5 75 63.5 56.8 47.1 40.8 30.6 27.3	3. Grup 153 149 112 <u>97</u> 82.5 75 63.5 56.8 <u>52.1</u> 47.1 40.8 30.6 27.3	4. Grup 153 149 112 <u>104</u> 82.5 75 63.5 56.8 <u>52.1</u> 47.1 40.8 30.6 27.3
5. Grup Φ231-X23 ΦB3-X18	6. Grup Φ231-X9 Φ231-X22 ΦB3-X13 ΦB3-X15	7. Grup ΦB3-X19	8. Grup ΦB3-X12
5. Grup 153 149 112 82.5 75 63.5 56.8 47.1 40.8 30.6 27.3	6. Grup 153 149 112 <u>103</u> 82.5 75 63.5 56.8 <u>52.1</u> 47.1 40.8 30.6 27.3	7. Grup 153 149 112 <u>103</u> <u>94.4</u> 82.5 75 63.5 56.8 52.1 47.1 40.8 30.6 27.3	8. Grup 153 149 112 <u>97</u> 82.5 75 63.5 56.8 47.1 40.8 30.6 27.3



Şekil 4.3 *S. thermophilus* B3, 709 ve 231 suşlarına etkili bazı fajların protein profilleri

4.2.1.2 *Lactobacillus bulgaricus* fajlarının yapısal protein profillerine göre tanımlanması

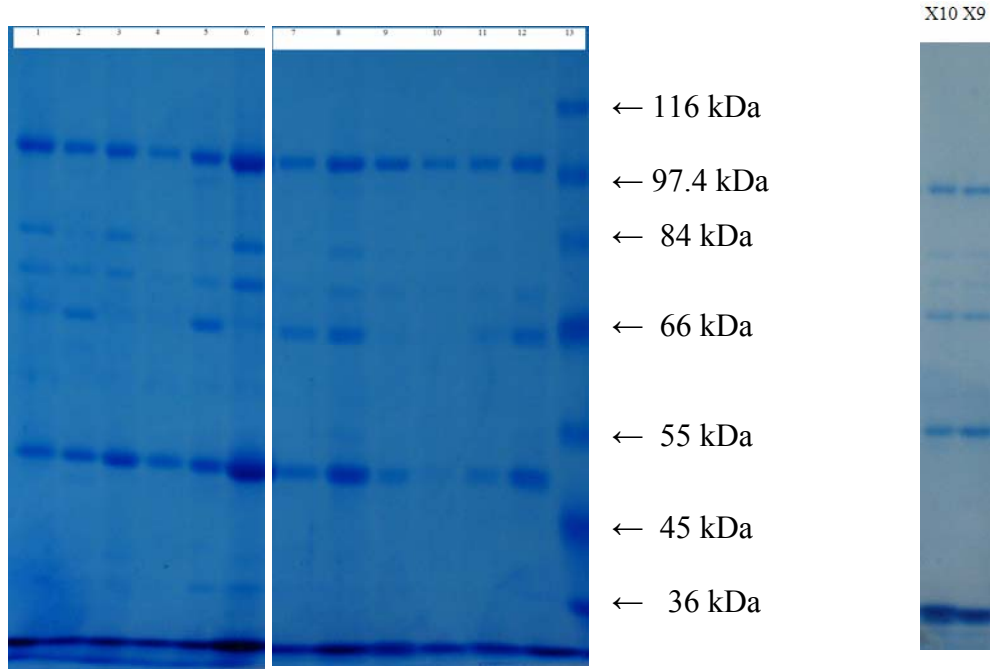
Lb. bulgaricus Y4 starter suşu ile çeşitli süt ürünlerinden ve çiğ sütlerden izole edilmiş olan 12 adet fajın SDS-PAGE ile protein profilleri belirlenmiş ve Şekil 4.4’de verilmiştir. Fajların tamamının 100.8, 50 ve 26.2 kDa’luk yoğunlukları fazla olan bantlara sahip oldukları tespit edilmiştir. Y4-X2, Y4-X5, Y4-X8, Y4-X9, Y4-X10, Y4-X12, Y4L-A ve Y4L-Z fajlarının profillerinde bu bantlara ek olarak 65 kDa’luk yoğun ek bir bantın varlığına rastlanmıştır. 5. ve 6. kuyucuklara bakıldığında fajların gösterdiği farklı profiller daha iyi anlaşılmaktadır. Bu bantlara ek olarak tüm fajların 83 ve 73 kDa’luk proteinlerinin de bulunduğu görülmüştür. Fajların, bu büyük protein bantları dışında düşük molekül ağırlığına sahip proteinleri de olduğu tespit edilmiştir. Her bir faja ait protein bantlarının büyüklüğü aşağıda verilmiştir. Şekil 4. 4’de yer alan büyük jelin yanında, ayrıca ΦY4-X9 ve ΦY4-X10’a ait protein profillerinin görüldüğü

bir jel bulunmaktadır. İkinci jelin eklenmesinin nedeni büyük jelde Y4-X10 fajına ait protein bantlarının tam seçilemiyor olmasıdır.

Şekil 4.5 incelendiğinde ise, Y4 *Lb. bulgaricus* fajlarına ait majör protein bantları görülmektedir. Bu bantlar ilk denemede elde edilmiştir. Ancak daha yüksek molekül ağırlığına sahip bantlar görülememiştir. Bu nedenle yeni faj konsantreleri hazırlanmış ve Şekil 4.4’de verilen jel elde edilmiştir. Fakat en son yapılan Y4 *Lb. bulgaricus* fajlarına ait bu jelde majör protein bantlarının görüntüleri yakalanamamıştır. Bu bantların büyüklükleri marker ile karşılaştırılarak 29.6, 29.2 ve 26.2 kDa olarak hesaplanmış ve aşağıda bu ve diğer bantlara sahip faj grupları verilmiştir. Şekil 4.5’de diğer jelde bulunmayan Y4-X7 ve Y4-X11 fajlarına ait majör protein bantları da görülmektedir. Ancak DNA kesim çalışmaları ve protein profilleri için aynı sayıda faj (Çizelge 3.1-3.2) kullanıldığından burada fazladan jele yüklenen faj protein bantları değerlendirmeye alınmamıştır.

Çiğ sütlerden izole edilmiş olan Y4L-A ve Y4L-Z fajlarının düşük molekül ağırlığına sahip protein bantları görüntülenememiştir. Üç büyük yoğun bantı (100, 65 ve 50 kDa) olan diğer fajlarla karşılaştırıldıklarında ya 29.6, 29.2 ve 26.2 kDa’luk üç banta yada 29.2 ve 26.2 kDa’luk iki banta sahip olmaları gerektiği düşünülmektedir. Böyle olması durumunda 2. veya 4. grupta yer alacağı varsayılabilir.

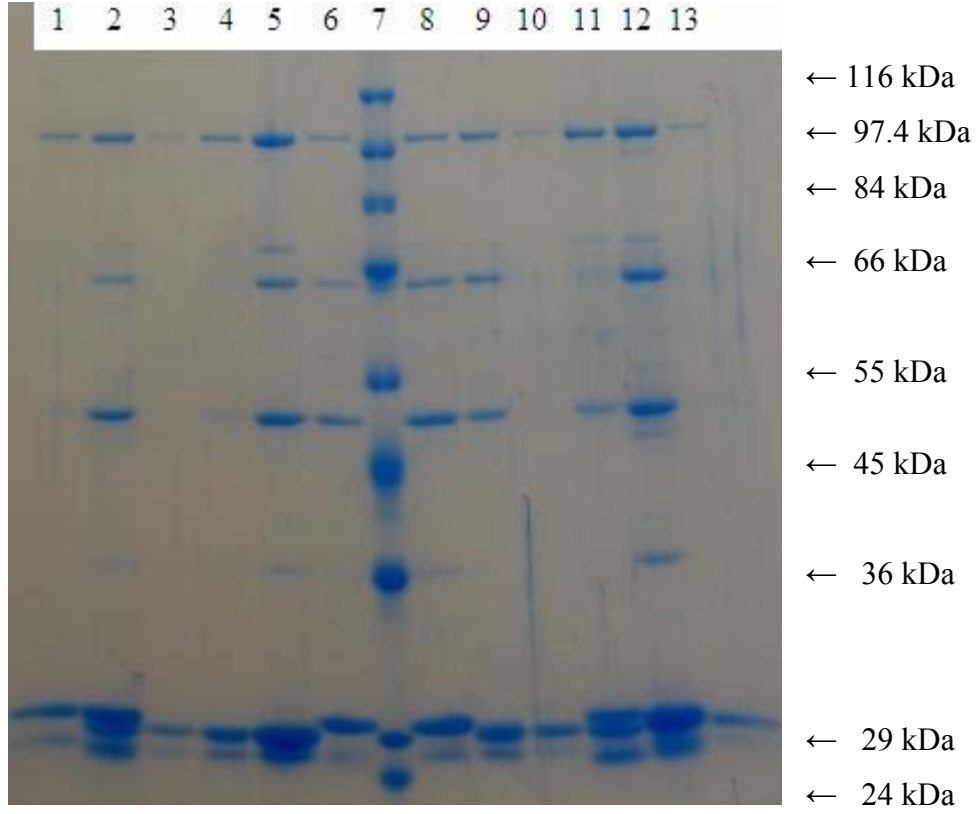
<u>1. GRUP</u>	<u>2. GRUP</u>	<u>3. GRUP</u>	<u>4. GRUP</u>
ΦY4-X1	ΦY4-X2	ΦY4-X3	ΦY4-X5, ΦY4-X8,
ΦY4-X6	ΦY4-X10	ΦY4-X4	ΦY4-X9, ΦY4-X12
100.8	100.8	100.8	100.8
83	83	83	83
73	73	73	73
~65	65	~65	65
50	50	50	50
29.6	29.6	29.2	29.2
26.2	29.2	26.2	26.2
	26.2		



Şekil 4.4 Homolog konakçısı Y4 olan *Lb. bulgaricus* fajlarının protein profilleri

- | | | | |
|-----------|-----------|-----------|-------------|
| 1. ΦY4-X1 | 4. ΦY4-X4 | 7. ΦY4-X8 | 10. ΦY4-X12 |
| 2. ΦY4-X2 | 5. ΦY4-X5 | 8. ΦY4-X9 | 11. ΦY4L-A |
| 3. ΦY4-X3 | 6. ΦY4-X6 | 9. ΦY4-10 | 12. ΦY4L-Z |
| | | | 13. Marker |

Lb. bulgaricus V1 ve V2 suşlarına etkili fajların sahip oldukları yapısal protein şablonları da çıkarılmış ve bu proteinlerin büyüklükleri hesaplanmıştır (Şekil 4. 6-4.7). Çiğ süt izolatları dahil fajların tamamının 101.07, 64.2 ve 49.5 kDa büyüklüğünde üç protein bantına sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu büyüklükler, Y4 fajlarının protein büyüklükleri ile karşılaştırıldığında çok da farklı bulunmamıştır. Büyüklüklerdeki artış yada azalışların ölçümlerdeki küçük hatalardan kaynaklandığı çok açıktır. Aynı durum küçük bantlar için de geçerlidir. V1 ve V2 *Lb. bulgaricus* fajlarının sahip oldukları bu bantların büyüklükleri 30.17, 29.93 ve 27.2 kDa'dur (Şekil 4.7). Profiller arasındaki farklılıklar da bu bantların olup olmasına bağlıdır.

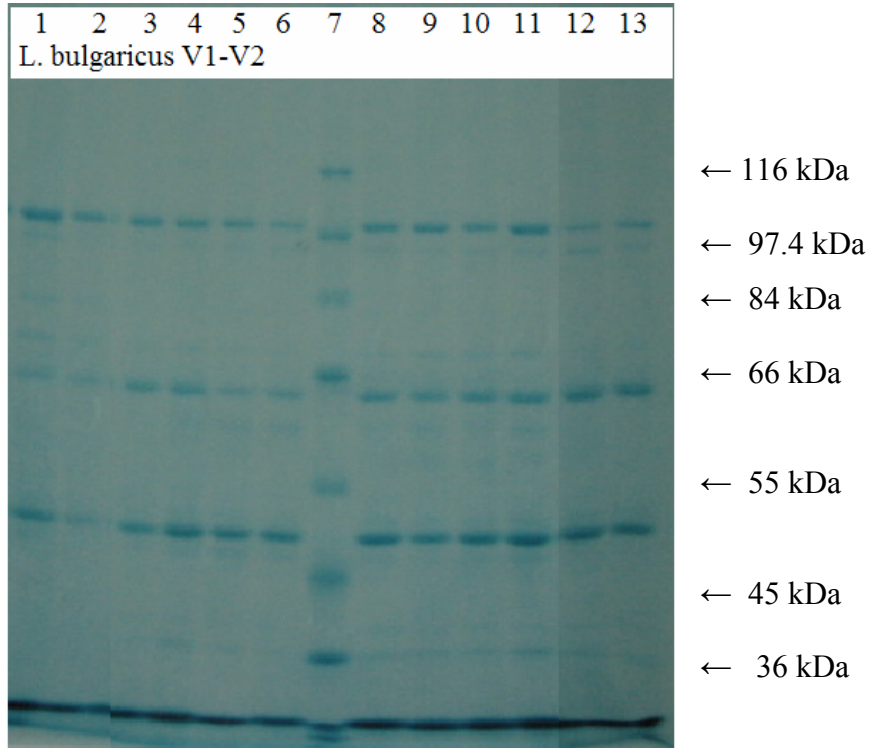


Şekil 4.5 Homolog konakçısı Y4 olan *Lb. bulgaricus* fajlarının majör proteinleri

1. ΦY4-X1	4. ΦY4-X4	7. Marker	10. ΦY4-X9
2. ΦY4-X2	5. ΦY4-X5	8. ΦY4-X7	11. ΦY4-X10
3. ΦY4-X3	6. ΦY4-X6	9. ΦY4-X8	12. ΦY4-X11
			13. ΦY4-X12

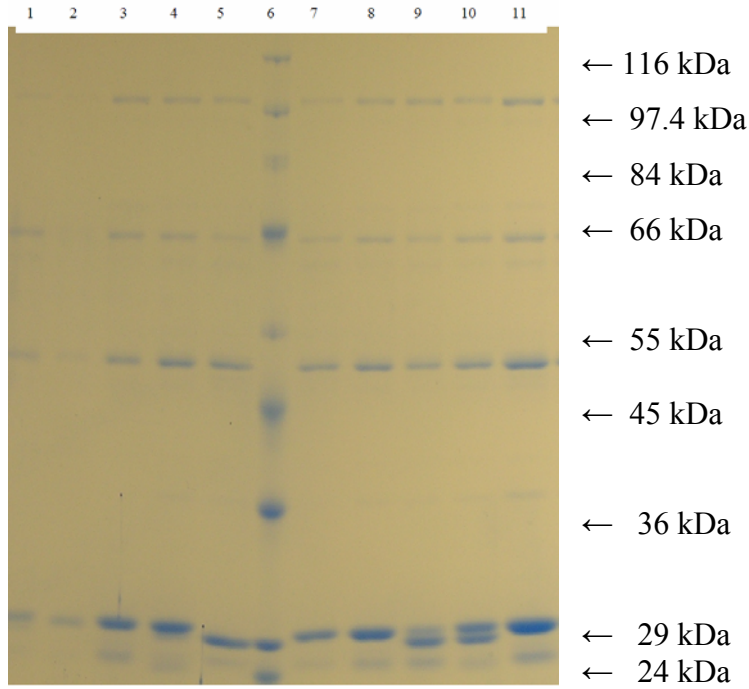
Fajlardan V1-X19, V2-X21, V2-X22, V2-X26 ve V2-X27 bu bantların hepsine sahiptir. ΦV2-X24, ΦV2-X25 ve ΦV2-X28, 30.17 ve 27.2 kDa; ΦV2-X23 ise 29.23 ve 27.2 kDa büyüklüğündeki bantlara sahiptir. Bu sonuçlar doğrultusunda ΦV1-X19, ΦV2-X21, ΦV2-X22, ΦV2-X26 ve ΦV2-X27, Y4 fajlarından Y4-X2 ve Y4-X10'un bulunduğu gruba; V2-X23 fajı, ΦY4-X5, ΦY4-X8, ΦY4-X9, ΦY4-X12'nin bulunduğu gruba dahil edilmiş; ΦV2-X24, ΦV2-X25 ve ΦV2-X28 ise Y4 fajları ise kendilerine birebir uyum sağlayan bir grup olmadığından ayrı bir sınıf olarak düşünülmüştür.

Fajların ayrıca yoğunlukları az olan 80.8, 71.3, 60.9 kDa büyüklüğünde proteinlere de sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinler de, Y4 fajlarının sahip olduğu az yoğunluktaki proteinlerle benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.6 Homolog konakçısı V1 ve V2 olan *Lb. bulgaricus* fajlarının protein profilleri

- | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|
| 1. ΦV1L-A | 4. ΦV2-X22 | 7. Marker | 10. ΦV2-X27 |
| 2. ΦV1-X19 | 5. ΦV2-X23 | 8. ΦV2-X25 | 11. ΦV2-X28 |
| 3. ΦV2-X21 | 6. ΦV2-X24 | 9. ΦV2-X26 | 12. ΦV2L-A |
| | | | 13. ΦV2L-Z |



Şekil 4.7 Homolog konakçısı V1 ve V2 olan *Lb. bulgaricus* fajlarının sahip oldukları majör proteinler

1. ΦV1-X19	4. ΦV2-X22	7. ΦV2-X24	10. ΦV2-X27
2. ΦV1-X20	5. ΦV2-X23	8. ΦV2-X25	11. ΦV2-X28
3. ΦV2-X21	6. Marker	9. ΦV2-X26	

Konakçısı Y4 olan *Lb. bulgaricus* fajları gibi, V1 ve V2 konakçılarına özgül fajların ilk denemelerde majör proteinleri görüntülenmiş ancak daha sonra farklı yürütme koşulları ve jel konsantrasyonları denense de başarılı olunamamıştır. Bu nedenle majör proteinlere ait jel, ilk deneme de elde edilen hali ile verilmiştir (Şekil 4.7). Bu jelde V2 *Lb. bulgaricus* suşuna özgül ve V1-X20 fajına ait bantlar da görülmektedir. Ancak daha önce de belirtildiği gibi çalışmalar, DNA kesimleri ile paralel yürütüldüğünden bu faja ait protein profili de değerlendirmeye alınmamıştır.

4. 2. 2 Restriksiyon endonükleaz kesim profilleri

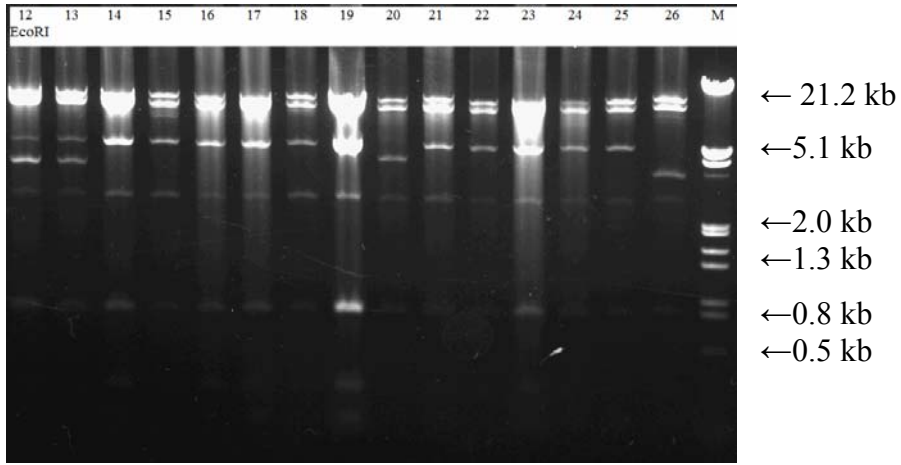
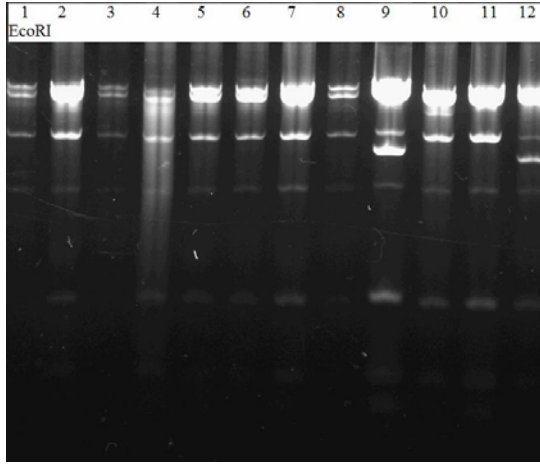
4. 2. 2. 1 *S. thermophilus* fajlarının restriksiyon endonükleaz kesim profillerine göre tanımlanması

Homolog konakçıları B3, 231 veya 709 kodlu endüstriyel suşlar olan 26 adet *S. thermophilus* fajı; *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *ClaI*, *HaeII*, *HhaI*, *PstI*, *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesime alınmıştır. % 0.8-1'lik agaroz jele yüklenen DNA fragmentleri GEL LOGIC 100 IMAGING SYSTEM (A.Ü. Veterinerlik Fakültesi Viroloji Bölümü) ile görüntülenmiştir.

PstI kesimi için hem Sigma hem de Fermentas marka enzim kullanılmış ancak sağlıklı sonuç alınamamıştır.

S. thermophilus faj DNA'larının *EcoRI* kesimi

26 adet *S. thermophilus* fajının *EcoRI* enzimi ile kesim sonucunda 5 farklı fragment profili elde edilmiştir (Şekil 4.8). Kaşar peyniri üretimi amacıyla pastörize edilen süttten izolasyonu başarılan 231S-A1MÖ fajı, 25 adet fajdan farklı kesim profili vererek ayrı bir genomik yapıya sahip olduğunu göstermiştir. ΦB3-X17 ikinci grubu, Φ231-X23 üçüncü grubu, ΦB3-X20 ile Φ231-X6 ise dördüncü grubu oluşturmuşlardır. Fajların geri kalan 21 adedi ise 5. grup içerisinde toplanmıştır. Her bir grubu temsil eden fajın fragment büyüklükleri aşağıda verilmiş ve genom büyüklükleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.8 *S. thermophilus* faj DNA'larının *EcoRI* kesimi sonucu oluşan fragmentleri

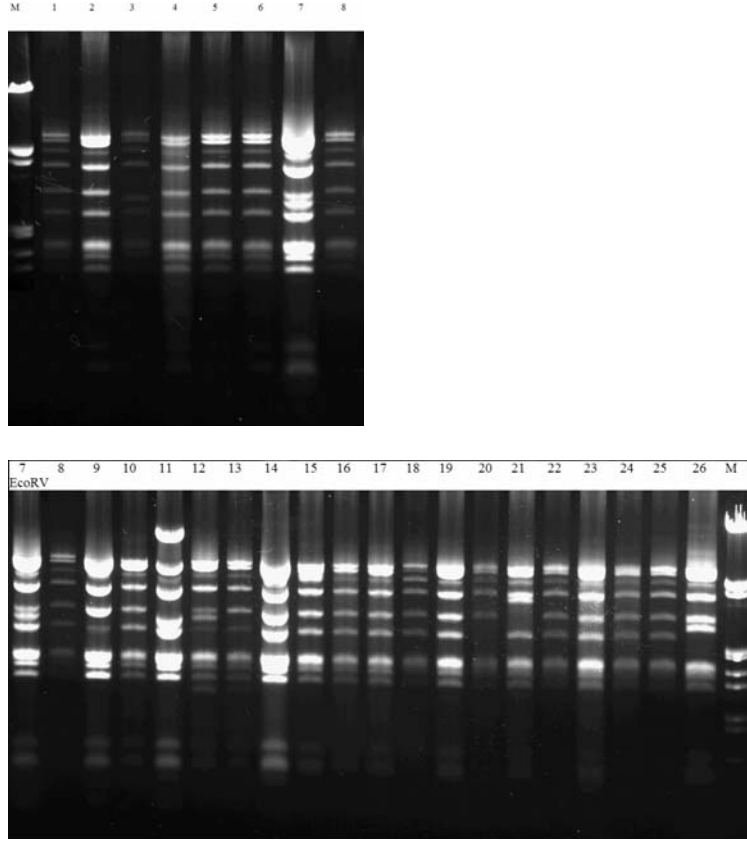
1. Φ1B3-A	8. ΦB3-X16	15. Φ231-X8	22. Φ709-X2
2. Φ2B3-A	9. ΦB3-X17	16. Φ231-X9	23. Φ709-X3
3. ΦB3-X11	10. ΦB3-X18	17. Φ231-X10	24. Φ709-X4
4. ΦB3-X12	11. ΦB3-X19	18. Φ231-X21	25. Φ709-X5
5. ΦB3-X13	12. ΦB3-X20	19. Φ231-X22	26. Φ231S-A1MÖ
6. ΦB3-X14	13. Φ231-X6	20. Φ231-X23	M: Marker
7. ΦB3-X15	14. Φ231-X7	21. Φ709-X1	

MARKER	Φ231S-A1MÖ	ΦB3-X17	Φ231-X23	ΦB3-X20 Φ231-X6	Φ231-X22 (ve diğer 20 faj)
21226	18320	18320	18320	18320	18320
5148	15995	15995	15995	15995	15995
4268	3635	6116	4809	4674	7085
3530	2838	3291	2838	2838	2838
2027	916	1030	916	916	916
1904	315	315	315	315	315
1584	145	145	145	145	145
1375					
947					
831					
564					
DNA büyüklüğü	42164 baz	45212 baz	43338 baz	43203 baz	45614 baz

Fragmentlerden ortak olduğu anlaşılan 18320, 15995, 315 ve 145 baz büyüklüğündeki bu bantlar koyu yazılmıştır.

***S. thermophilus* faj DNA'larının *EcoRV* kesimi**

Fajlar, *EcoRV* enzimi ile kesimleri sonucu 9 farklı fragment şablonu vermiştir. *EcoRI* kesiminde aynı fragment profiline sahip olan ve 5. grupta bulunan Φ709-X1, ΦB3-X11, ΦB3-X12, B3-X15 ve ΦB3-X19'un bu enzim kesimi ile ayrı gruplarda yer aldığı görülmüştür. Bunlar gibi dördüncü grupta bulunan 231-X6 ve B3-X20 fajlarının da birbirlerinden farklı profil verdiği saptanmıştır. Φ231S-A1MÖ ve Φ231-X23 ise yine ayrı gruplarda yer almıştır.

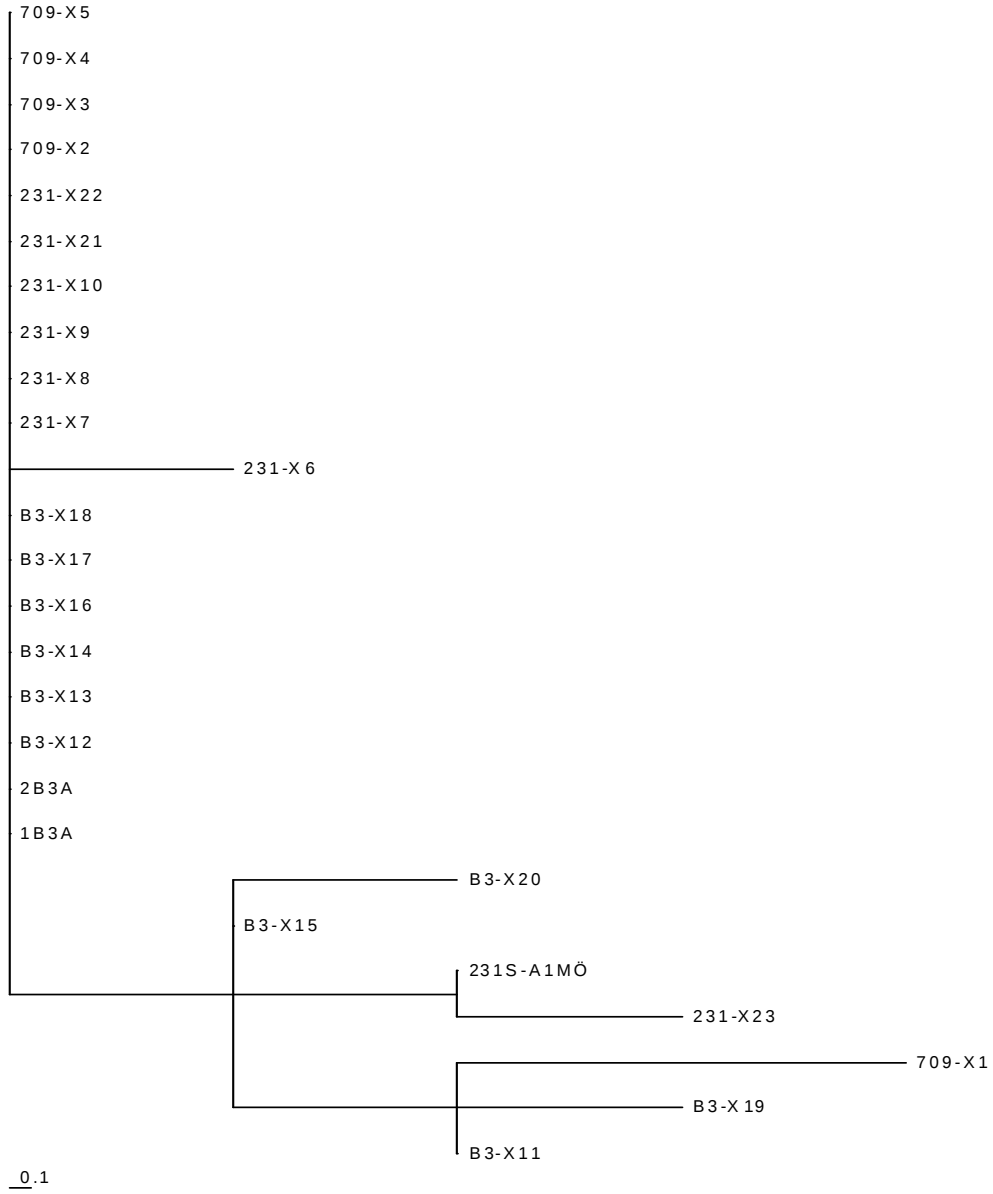


Şekil 4.9 *S. thermophilus* faj DNA'larının *EcoRV* kesimi sonucu oluşan fragmentleri

- | | | | |
|------------|-------------|--------------|----------------|
| 1. Φ1B3-A | 8. ΦB3-X16 | 15. Φ231-X8 | 22. Φ709-X2 |
| 2. Φ2B3-A | 9. ΦB3-X17 | 16. Φ231-X9 | 23. Φ709-X3 |
| 3. ΦB3-X11 | 10. ΦB3-X18 | 17. Φ231-X10 | 24. Φ709-X4 |
| 4. ΦB3-X12 | 11. ΦB3-X19 | 18. Φ231-X21 | 25. Φ709-X5 |
| 5. ΦB3-X13 | 12. ΦB3-X20 | 19. Φ231-X22 | 26. Φ231S-A1MÖ |
| 6. ΦB3-X14 | 13. Φ231-X6 | 20. Φ231-X23 | M: Marker |
| 7. ΦB3-X15 | 14. Φ231-X7 | 21. Φ709-X1 | |

Tüm faj DNA'larında, *EcoRV* kesimi sonucunda 9 fragmentin ortak olduğu görülmektedir.

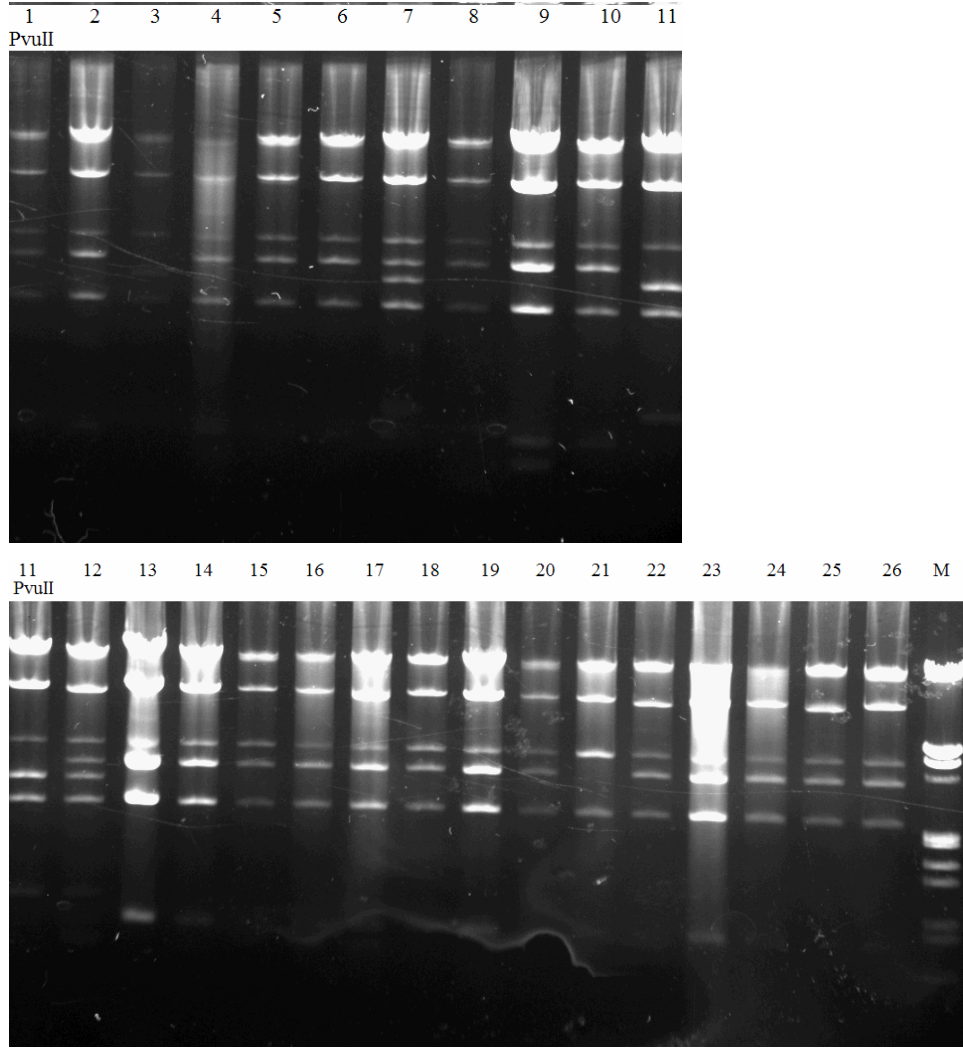
Marker	ΦB3-X11	ΦB3-X12 (diğer 17 faj)	ΦB3-X15	ΦB3-X19
21226	10344	10344	10344	17977
5148	8883	8883	8883	10344
4268	6284	6284	6284	8883
3530	4403	4403	4403	6284
2027	3365	3365	2926	4403
1904	2994	2582	2659	2994
1584	1817	1817	2582	2582
1375	1645	1645	1817	1817
947	1441	1441	1645	1645
831	613	613	1441	1441
564	374	374	613	613
			374	374
Toplam DNA Büyüküğü	41382 baz	41753 baz	44747 baz	59359 baz
ΦB3-X20	Φ231-X6	Φ231-X23	Φ231S-A1MÖ	Φ709-X1
10344	10344	10344	10344	10344
8883	8883	8883	8883	8883
6284	6284	6284	6284	6284
4403	4403	4403	4403	4403
3899	3365	3365	3365	3899
3365	2582	1817	2994	2582
2994	1817	1645	1817	1817
2582	1645	1441	1645	1645
1817	1441	613	1441	1441
1645	1349	374	613	613
1441	613		374	374
1349	374			
613				
374				
46096 baz	43102 baz	39171 baz	42165 baz	42287 baz



Şekil 4.10 *EcoRV* kesimi sonucu oluşan fragmentlere göre fajların filogenetik uzaklıkları

***S. thermophilus* faj DNA'larının *PvuII* kesimi**

S. thermophilus fajlarının *PvuII* enzimi ile kesimi sonucu 4 farklı fragment dizgesi elde edilmiştir. *EcoRI* ve *EcoRV* kesimlerinde hep ayrı grupta bulunan Φ 231S-A1MÖ, Φ 231-X23 ve Φ B3-X17, fajların çoğunluğunun bulunduğu grupta yer almıştır. *EcoRV* kesimi sonucu ayrı gruba dahil edilmiş olan 709-X1, B3-X15 ve B3-X19 fajları *PvuII* enzim kesimiyle de birbirlerinden ayrılmışlardır (Şekil 4.11).



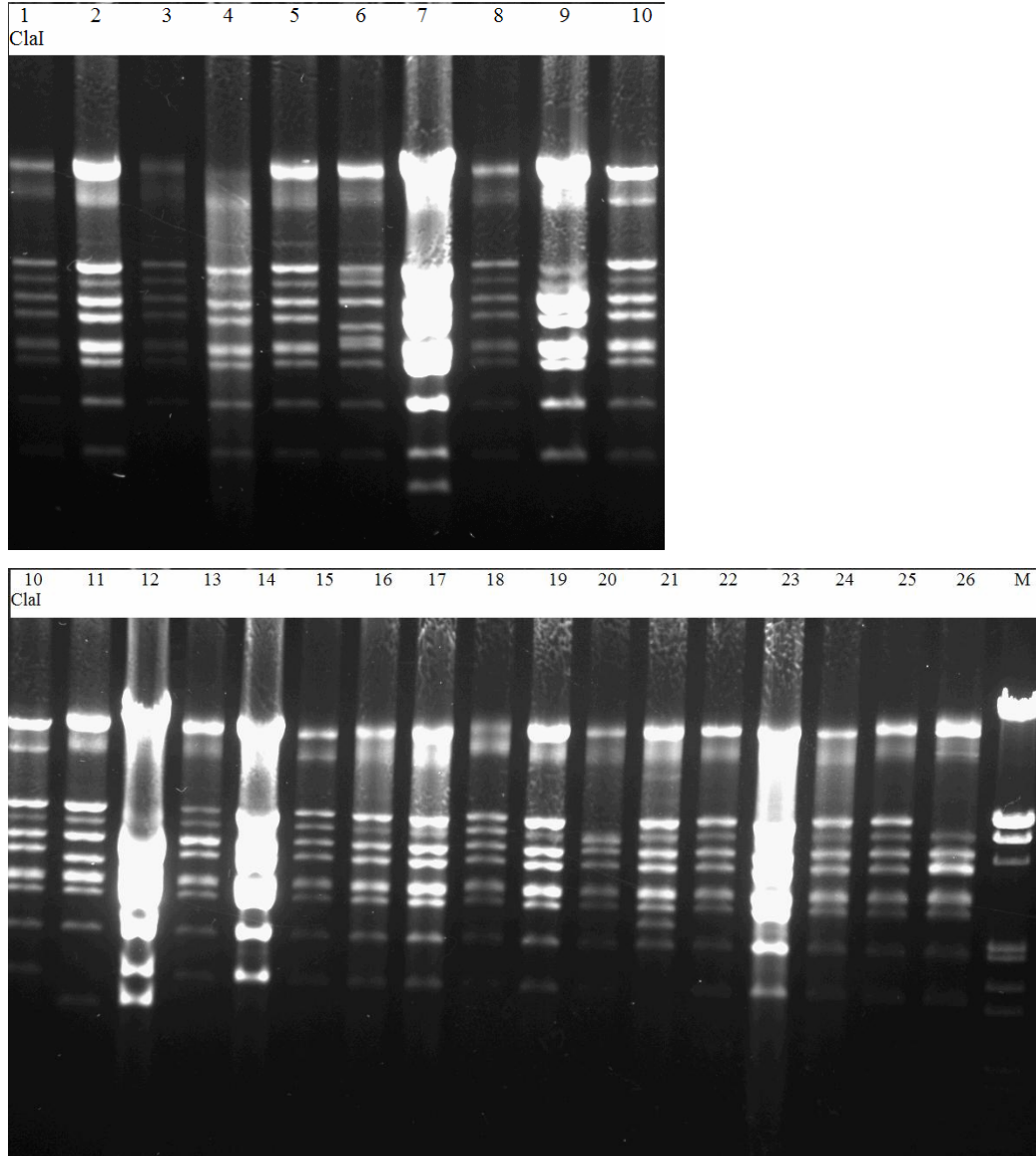
Şekil 4.11 *S. thermophilus* faj DNA'larının *PvuII* kesimi sonucu oluşan fragmentleri

1. Φ1B3-A	8. ΦB3-X16	15. Φ231-X8	22. Φ709-X2
2. Φ2B3-A	9. ΦB3-X17	16. Φ231-X9	23. Φ709-X3
3. ΦB3-X11	10. ΦB3-X18	17. Φ231-X10	24. Φ709-X4
4. ΦB3-X12	11. ΦB3-X19	18. Φ231-X21	25. Φ709-X5
5. ΦB3-X13	12. ΦB3-X20	19. Φ231-X22	26. Φ231S-A1MÖ
6. ΦB3-X14	13. Φ231-X6	20. Φ231-X23	M: Marker
7. ΦB3-X15	14. Φ231-X7	21. Φ709-X1	

Marker	Φ231S-A1MÖ (diğer 20 faj)	Φ709-X1 ΦB3-X11	ΦB3-X15 ΦB3-X20	ΦB3-X19
21226	20363	20363	20363	20363
5148	13665	13665	13665	13665
4268	4198	4198	4198	4198
3530	3375	2277	3375	3183
2027	2277	885	3183	2277
1904	885	707	2277	885
1584	707		885	707
1375			707	
947				
831				
564				
Toplam DNA Büyükluğu	43879	45280	48657	45279

***S. thermophilus* faj DNA'larının *Cla*I kesimi**

*Cla*I restriksiyon enzimi ile kesime sokulan faj DNA'ları 4 farklı fragment şablon çıkarmışlardır (Şekil 4.12). Diğer enzimlerde olduğu gibi Φ231-X23 ve ΦB3-X19'un profilleri diğerlerinden farklıdır. Bununla birlikte 709-X1, 231-X6, B3-X20 ve B3-X17, sürekli aynı profili veren fajların bulunduğu grupta yer almıştır. B3-X14 fajı ise ilk defa diğer faj DNA'larından farklı bir profil göstermiştir. İkinci bantlarından itibaren faj DNA'larının birbirlerinden farklı olup olmadığı incelenmiştir. Bunun nedeni 17000-18000 baz civarında bulunan DNA fragmentlerinde kısmi kesim olmasıdır. Aralarında en uygun olanları büyüklük hesaplamak için seçilmiştir. Aşağıda her bir grubu temsil eden fajların DNA'larının ve fragmentlerinin büyüklükleri verilmiştir.



Şekil 4.12 *S. thermophilus* faj DNA'larının *ClaI* kesimi sonucu oluşan fragmentleri

- | | | | |
|------------|-------------|--------------|----------------|
| 1. Φ1B3-A | 8. ΦB3-X16 | 15. Φ231-X8 | 22. Φ709-X2 |
| 2. Φ2B3-A | 9. ΦB3-X17 | 16. Φ231-X9 | 23. Φ709-X3 |
| 3. ΦB3-X11 | 10. ΦB3-X18 | 17. Φ231-X10 | 24. Φ709-X4 |
| 4. ΦB3-X12 | 11. ΦB3-X19 | 18. Φ231-X21 | 25. Φ709-X5 |
| 5. ΦB3-X13 | 12. ΦB3-X20 | 19. Φ231-X22 | 26. Φ231S-A1MÖ |
| 6. ΦB3-X14 | 13. Φ231-X6 | 20. Φ231-X23 | M: Marker |
| 7. ΦB3-X15 | 14. Φ231-X7 | 21. Φ709-X1 | |

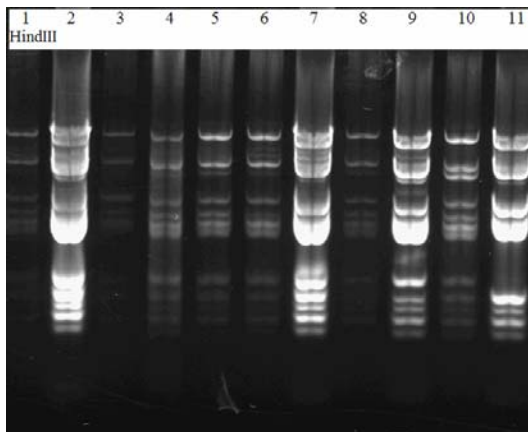
Marker	ΦB3-X14	Φ709-X5 (diğer 21 faj)	ΦB3-X19	Φ231-X23 Φ231S-A1MÖ
21226	14769	18134	18134	17639
5148	4268	5148	5148	4400
4268	3913	4400	4400	3785
3530	3424	3785	3785	3390
2027	3049	3390	3049	2894
1904	2868	2894	2631	2631
1584	2808	2631	1970	1970
1375	2508	1970	760	1521
947	1945	1521		
831	1429			
564				
Toplam DNA Büyükülüğü	40981 baz	43873 baz	39877 baz	38230 baz

26 adet *S. thermophilus* faj genomunun molekül ağırlığı, *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII* ve *Clal* restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu oluşan fragmentlerin büyüklüklerinin toplanmasıyla hesaplanmıştır. *EcoRI* kesimine göre aynı grupta olan ve o grubu temsilen gösterilen 231-X22 fajının DNA büyüklüğü 45614 baz olarak bulunmuşken, *EcoRV* kesiminde birbirinden ayrılan Φ709-X1, ΦB3-X11, ΦB3-X12, B3-X15 ve ΦB3-X19'un genom büyüklüklerinin ise sırasıyla 42287, 41382, 41753, 44747 ve 59359 baz olduğu saptanmıştır. B3-X15 fajının genom büyüklüğünün diğer ölçümle uyum sağladığı görülmektedir. Fragmentlerden bazılarının aynı büyüklükte olması durumunda agaroz jelde aynı yerde toplanması söz konusu olduğundan 45000 bazdan küçük çıkan genom büyüklüklerinin nedeni bu olabilir. Aynı durum B3-X20 ve 231-X23 fajları için de geçerlidir. Bununla birlikte *EcoRI* kesiminde kısmi kesimlerden kaynaklanmış yanılmalar olabilir. Tüm bunlara ek olarak kesim koşulları ile enzim aktivitesi ve kalitesinin önemli olduğu unutulmamalıdır. Φ231-X6 ve Φ231S-A1MÖ DNA büyüklükleri ise neredeyse birebir uyum göstermektedir. B3-X19 fajının fragment dizilimi incelendiğinde ise diğerlerinde olmayan 17977 bazlık bir fragment olduğu görülmektedir. Büyük olasılıkla bu bantın kesimi tamamlanmamıştır. Dolayısıyla bu fragment nedeniyle faj genomunun mol ağırlığı diğerlerine oranla oldukça yüksek bulunmuştur. Kesimin tamamlanması durumunda fajın genom büyüklüğünün diğerleri gibi 40000 baz civarında olabileceği düşünülmektedir.

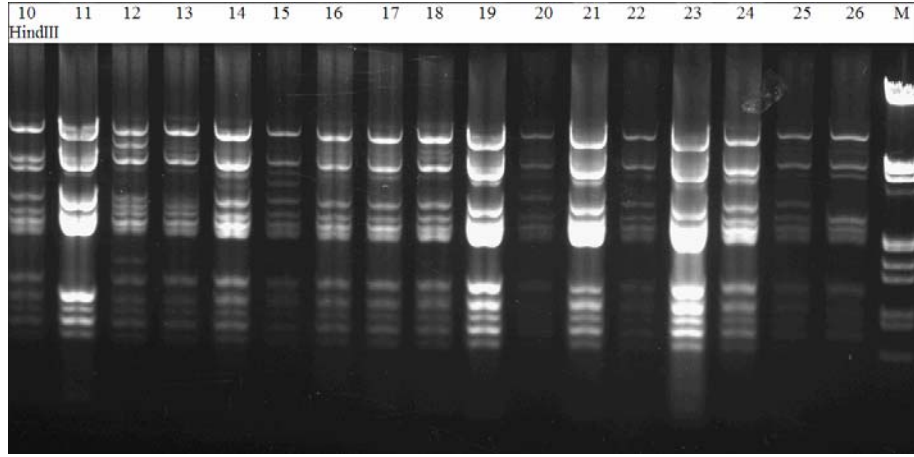
PvuII ve *ClaI* enzimi ile reaksiyona sokulan faj DNA'larında da yine kısmi kesimlere rastlanmıştır. Özellikle ilk iki bantta bu daha çok göze çarpmaktadır. Bu iki bantın büyüklükleri aşağı yukarı aynıdır. Bilgisayar programı tarafından fragment büyüklüğünün hesabı için işaretin tam olarak nereye konacağına karar vermek zordur ve kişiden kişiye değişmektedir. Bu nedenle DNA büyüklüklerinde farklı değerlere ulaşılmaktadır. Ölçümler arasında 1-6 kb'lık farklılıklar bulunmaktadır. Buna göre genom büyüklüklerinin 41-45 kb arasında değiştiği söylenebilir.

***S. thermophilus* faj DNA'larının *HindIII* kesimi**

HindIII restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesime alınan faj DNA'larının fragment profillerine ve büyüklüklerine kısmi kesimlerin fazla olması nedeniyle karar verilememiştir (Şekil 4.13). Bu nedenle kesim süresi 37°C'de 2 saatten 37°C'de bir geceye çıkarılmıştır. Şekil 4.14'de görüldüğü üzere yine başarılı olunamamıştır. Hatta 709-X5 ve B3-X14 faj DNA'larında kesim bölgesi bulunan *HindIII* enziminin bu denemede kesim yapamadığı görülmüştür. Buradan kesim koşullarının ve enzim aktivitesinin ne kadar önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte her iki fotoğraf incelendiğinde yine Φ 709-X5, Φ 231-X9, Φ B3-X19, Φ B3-X20 ve Φ 231S-A1MÖ faj DNA'larının bir fragmentle de olsa diğerlerinden ve birbirlerinden ayrıldığı göze çarpmaktadır.

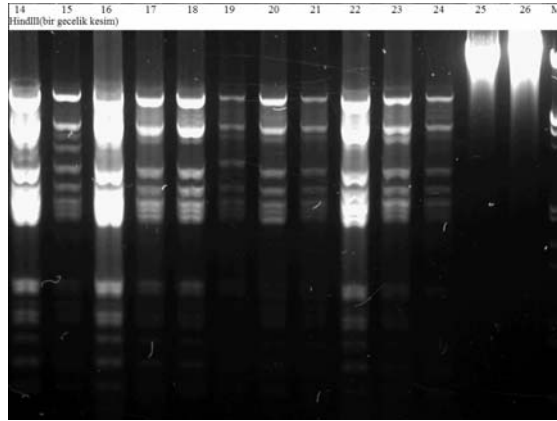


Şekil 4.13 *S. thermophilus* faj DNA'larının *HindIII* kesimi sonucu oluşan fragmentleri (37°C'de 2 saat)

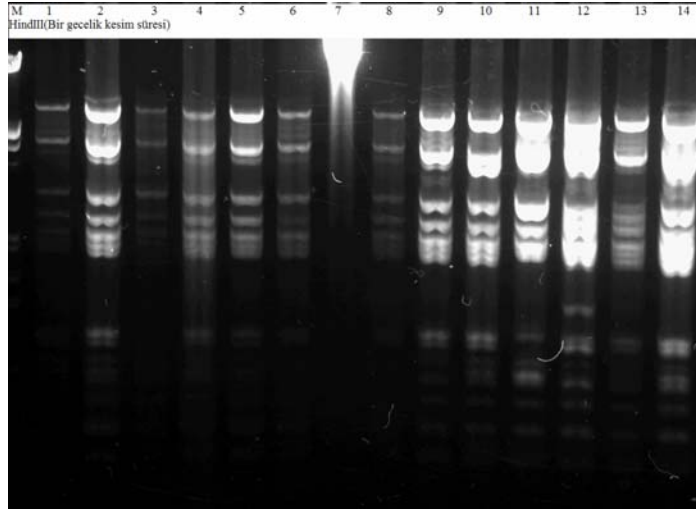


Şekil 4.13 (devam) *S. thermophilus* faj DNA'larının *Hind*III kesimi sonucu oluşan fragmentleri (37°C'de 2 saat)

- | | | | |
|------------|-------------|--------------|----------------|
| 1. Φ1B3-A | 8. ΦB3-X16 | 15. Φ231-X8 | 22. Φ709-X2 |
| 2. Φ2B3-A | 9. ΦB3-X17 | 16. Φ231-X9 | 23. Φ709-X3 |
| 3. ΦB3-X11 | 10. ΦB3-X18 | 17. Φ231-X10 | 24. Φ709-X4 |
| 4. ΦB3-X12 | 11. ΦB3-X19 | 18. Φ231-X21 | 25. Φ709-X5 |
| 5. ΦB3-X13 | 12. ΦB3-X20 | 19. Φ231-X22 | 26. Φ231S-A1MÖ |
| 6. ΦB3-X14 | 13. Φ231-X6 | 20. Φ231-X23 | M: Marker |
| 7. ΦB3-X15 | 14. Φ231-X7 | 21. Φ709-X1 | |



Şekil 4.14 *S. thermophilus* faj DNA'larının *Hind*III kesimi sonucu oluşan fragmentleri (37°C'de 1 gece)

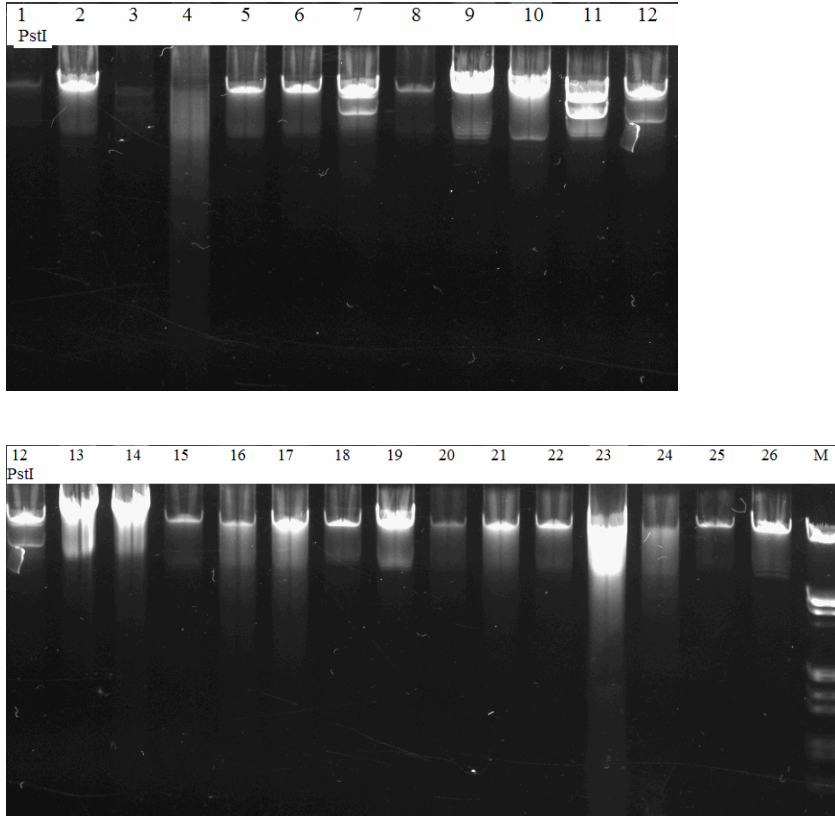


Şekil 4.14 (devam) *S. thermophilus* faj DNA'larının *Hind*III kesimi sonucu oluşan fragmentleri (37°C'de 1 gece)

1. Marker	8. ΦB3-X15	15. Φ231-X7	22. Φ709-X2
2. Φ1B3-A	9. ΦB3-X16	16. Φ231-X8	23. Φ709-X3
3. Φ2B3-A	10. ΦB3-X17	17. Φ231-X9	24. Φ709-X4
4. ΦB3-X11	11. ΦB3-X18	18. Φ231-X10	25. Φ709-X5
5. ΦB3-X12	12. ΦB3-X19	19. Φ231-X22	26. ΦB3-X20 kesilmemiş
6. ΦB3-X13	13. ΦB3-X20	20. Φ231-X23	M: Marker
7. ΦB3-X14	14. Φ231-X6	21. Φ709-X1	

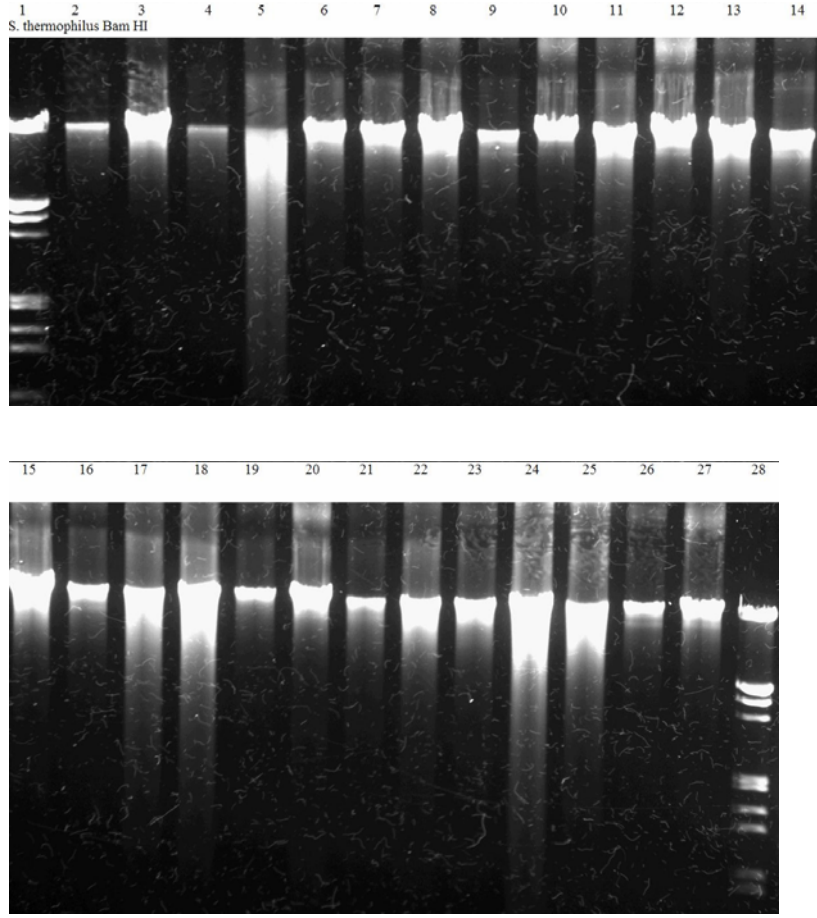
S. thermophilus faj DNA'larının *Pst*I ve *Bam*HI kesimleri

Fermentas ve Sigma marka *Pst*I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile reaksiyona giren *S. thermophilus* faj DNA'larında sağlıklı bir fragment oluşumu gözlenmemiştir. Bu nedenle *Pst*I enzimi ile kesimden vazgeçilmiştir (Şekil 4.15). *Bam*HI enziminin ise bu faj genomları üzerinde tanıma dizisinin olmadığı anlaşılmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.15 *S. thermophilus* faj DNA'larının *Pst*I kesimi

- | | | | |
|------------|-------------|--------------|----------------|
| 1. Φ1B3-A | 8. ΦB3-X16 | 15. Φ231-X8 | 22. Φ709-X2 |
| 2. Φ2B3-A | 9. ΦB3-X17 | 16. Φ231-X9 | 23. Φ709-X3 |
| 3. ΦB3-X11 | 10. ΦB3-X18 | 17. Φ231-X10 | 24. Φ709-X4 |
| 4. ΦB3-X12 | 11. ΦB3-X19 | 18. Φ231-X21 | 25. Φ709-X5 |
| 5. ΦB3-X13 | 12. ΦB3-X20 | 19. Φ231-X22 | 26. Φ231S-A1MÖ |
| 6. ΦB3-X14 | 13. Φ231-X6 | 20. Φ231-X23 | M: Marker |
| 7. ΦB3-X15 | 14. Φ231-X7 | 21. Φ709-X1 | |



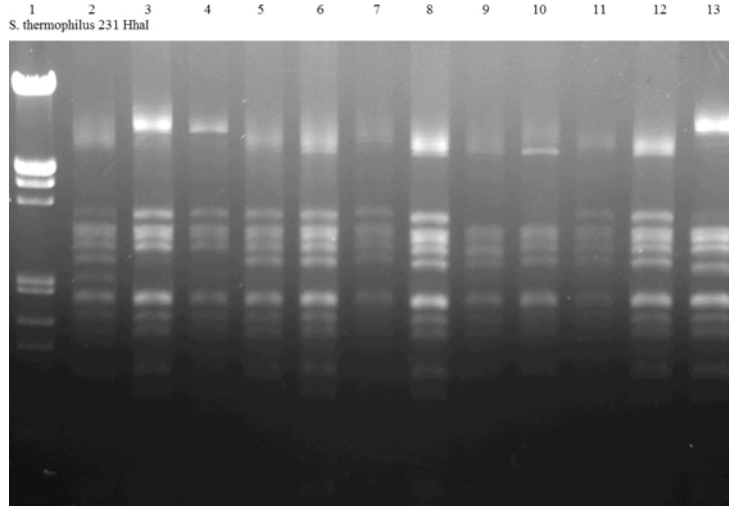
Şekil 4.16 *S. thermophilus* faj DNA'larının *Bam*HI kesimi

1. Marker	8. ΦB3-X15	15. Φ231-X7	22. Φ709-X1
2. Φ1B3-A	9. ΦB3-X16	16. Φ231-X8	23. Φ709-X2
3. Φ2B3-A	10. ΦB3-X17	17. Φ231-X9	24. Φ709-X3
4. ΦB3-X11	11. ΦB3-X18	18. Φ231-X10	25. Φ709-X4
5. ΦB3-X12	12. ΦB3-X19	19. Φ231-X21	26. Φ709-X5
6. ΦB3-X13	13. ΦB3-X20	20. Φ231-X22	27. Φ231S-A1MÖ
7. ΦB3-X14	14. Φ231-X6	21. Φ231-X23	28. Marker

***S. thermophilus* faj DNA'larının *Hha*I kesimleri**

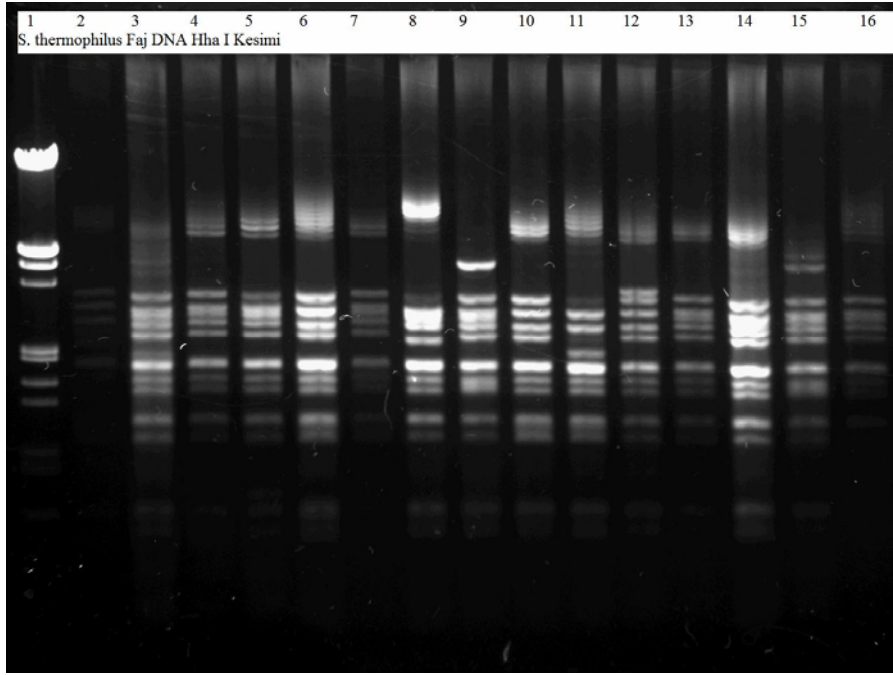
*Hha*I kesimi sonucu faj DNA'larının, kısmi kesimlerin varlığına rağmen açık bir şekilde 8 farklı fragment dizilimine sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.17-4.18). Fajlardan 709-X1, B3-X20 ve 231-X6 daha önceki kesimlerde de dikkati çektiği gibi sadece kendilerinin bulunduğu ayrı birer grup oluşturmuşlardır. İlk defa Φ231-X7 ve

Φ231-X8'in fajların çoğunluğunun bulunduğu gruptan ayrılp ayrı bir grup oluşturdukları görülmüştür. ΦB3-X12, ΦB3-X18 ve Φ709-X4 birleriyle benzer; ΦB3-X15 ve ΦB3-X19 birbirleriyle özdeş; ΦB3-X17, Φ231S-A1MÖ ve Φ231S-X23 birbirleriyle aynı fragment dizilimi göstermişlerdir. Geri kalan 13 faj ise başka bir grup oluşturmuştur.



Şekil 4.17 *S. thermophilus* faj DNA'larının *HhaI* kesimi

- | | |
|-------------|----------------|
| 1. Marker | 8. Φ231-X22 |
| 2. Φ231-X6 | 9. Φ231-X23 |
| 3. Φ231-X7 | 10. Φ231S-A1MÖ |
| 4. Φ231-X8 | 11. Φ1B3-A |
| 5. Φ231-X9 | 12. Φ2B3-A |
| 6. Φ231-X10 | 13. ΦB3-X17 |
| 7. Φ231-X21 | |

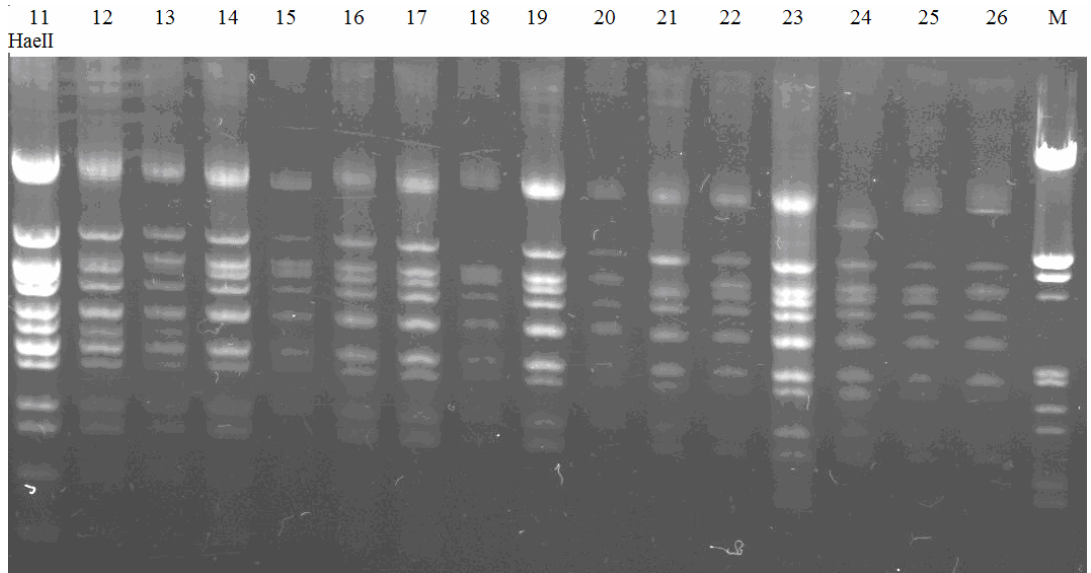
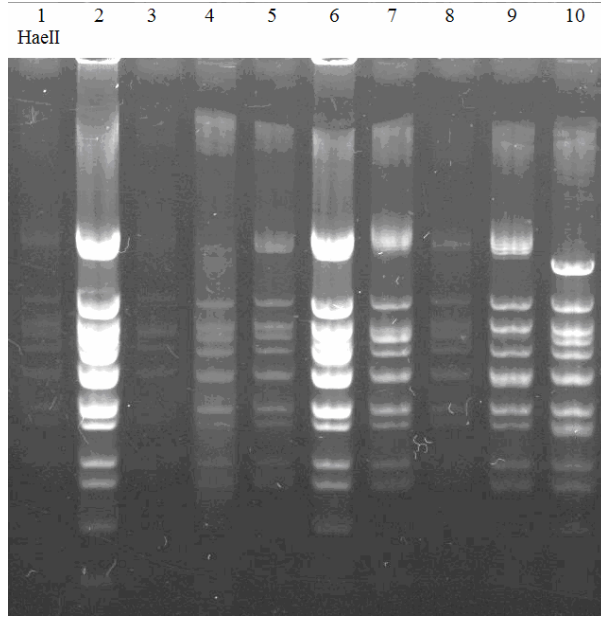


Şekil 4.18 *S. thermophilus* faj DNA'larının *HhaI* kesimi

1. Marker	5. ΦB3-X14	9. ΦB3-X18	13. Φ709-X2
2. ΦB3-X11	6. ΦB3-X15	10. ΦB3-X19	14. Φ709-X3
3. ΦB3-X12	7. ΦB3-X16	11. ΦB3-X20	15. Φ709-X4
4. ΦB3-X13	8. ΦB3-X17	12. Φ709-X1	16. Φ709-X5

***S. thermophilus* faj DNA'larının *HaeII* kesimleri**

26 adet *S. thermophilus* fajının *HaeII* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesime alınmıştır. Şekil 4.19'dan da görüldüğü üzere oluşan fragmentlerinin iyi ayrılamaması ve denemenin tekrarlanamaması nedeniyle tam bir sonuç alınamamıştır. Bununla birlikte jel fotoğrafları dikkatle incelendiğinde ΦB3-X17, ΦB3-X18, ΦB3-X19, Φ231-X21, Φ231-X23 ve Φ709-X1 DNA kesim profillerinin birbirlerinden farklılaşabileceği görülmüştür.



Şekil 4.19 *S. thermophilus* faj DNA'larının *HaeII* kesimi

1. Φ1B3-A	8. ΦB3-X16	15. Φ231-X8	22. Φ709-X2
2. Φ2B3-A	9. ΦB3-X17	16. Φ231-X9	23. Φ709-X3
3. ΦB3-X11	10. ΦB3-X18	17. Φ231-X10	24. Φ709-X4
4. ΦB3-X12	11. ΦB3-X19	18. Φ231-X21	25. Φ709-X5
5. ΦB3-X13	12. ΦB3-X20	19. Φ231-X22	26. Φ231S-A1MÖ
6. ΦB3-X14	13. Φ231-X6	20. Φ231-X23	M: Marker
7. ΦB3-X15	14. Φ231-X7	21. Φ709-X1	

4.2.2.2 *Lb. bulgaricus* fajlarının restriksiyon endonükleaz kesim profillerine göre tanımlanması

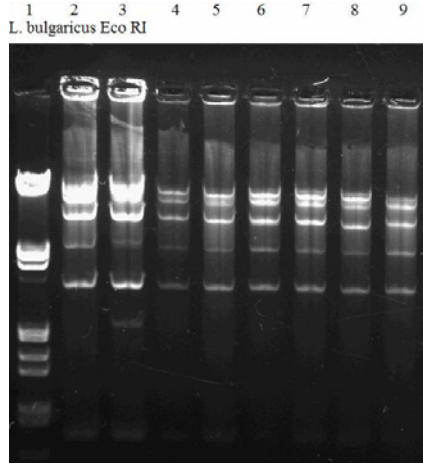
Endüstriyel *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül, Çizelge 3.2’de verilen 24 adet faj *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII*, *HindIII*, *BamHI*, *HhaI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesime alınmış, oluşan fragment dizilimlerine göre fajlar sınıflandırılmaya çalışılmıştır.

Kesime alınan fajlar arasında 231 ve V2 ticari *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül sırasıyla Φ 231-X17 ve Φ V2-X29 ile *Lb. bulgaricus* ATCC 11842 referans suşu ile çiğ süttten izole edilen Φ LbA-Z olarak kodlanan fajlar da bulunmaktadır (Şekil 4.21-4.23). Ancak bu fajlara ait kesimlerden sağlıklı sonuçlar alınamadığından Çizelge 3.2’de verilmemiş ve değerlendirmeye alınmamıştır.

***Lb. bulgaricus* faj DNA’larının *EcoRI* kesimi**

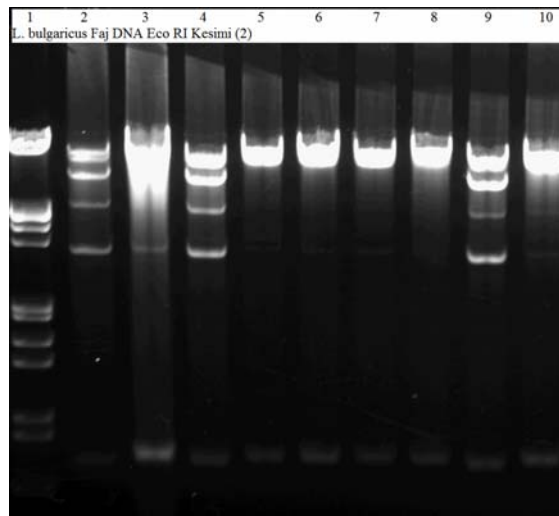
Çiğ sütlerden izole edilmiş fajlar dahil 24 adet *Lb. bulgaricus* fajının (Çizelge 3.2) saflaştırılan ve konsantre edilen DNA’ları, *EcoRI* enzimi ile kesime sokulmuştur. Kesim sonucunda Y4-X2, Y4-X4, Y4-X5, Y4-X6, Y4-X8 ve Y4-X10 faj DNA’ları birinci grubu, geri kalan 18 adet faj ise ikinci grubu oluşturmuştur. Şekil 4.20’de görüldüğü üzere 3 numaralı kuyucukta yer alan Y4-X22 fajının diğer fajlardan 2027 bazlık DNA fragmenti ile ayrıldığı görülmüştür. Büyük olasılıkla bu fragmentin varlığı, her fajın DNA fragmentinde gözlenen kısmi kesimlerden kaynaklanmaktadır. Jel fotoğrafları incelendiğinde tüm fajların yaklaşık aynı büyüklükteki ilk fragmente sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.20-4.21). Ancak kesimin tamamlanmamasından dolayı iki bant şeklinde karşımıza çıkmaktadır. 3. bantın ise yine kısmi kesimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Her iki grubu temsil eden fajların sahip oldukları fragment büyüklükleri aşağıda verilmiştir.

$\Phi Y4-X4$ (ve diğ er 5 faj)	$\Phi V2-X24$ (ve diğ er 17 faj)
18320	18320
3305	13379
654	3305
	654
22 329 baz genom büyüklüğü	35 658 baz genom büyüklüğü

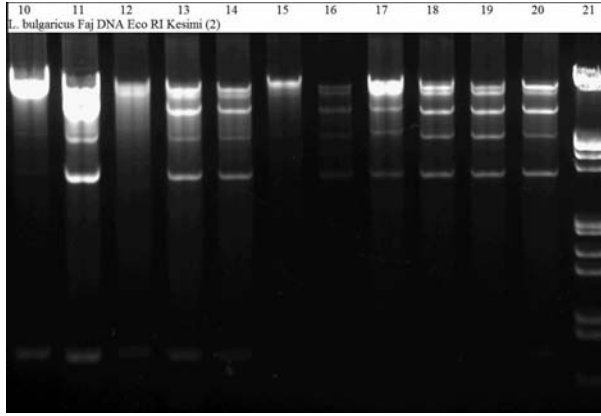


Şekil 4.20 *Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *EcoRI* kesimi

1. Marker 3. $\Phi V2-X22$ 5. $\Phi V2-X24$ 7. $\Phi V2-X26$ 9. $\Phi V2-X28$
2. $\Phi V2-X21$ 4. $\Phi V2-X23$ 6. $\Phi V2-X25$ 8. $\Phi V2-X27$



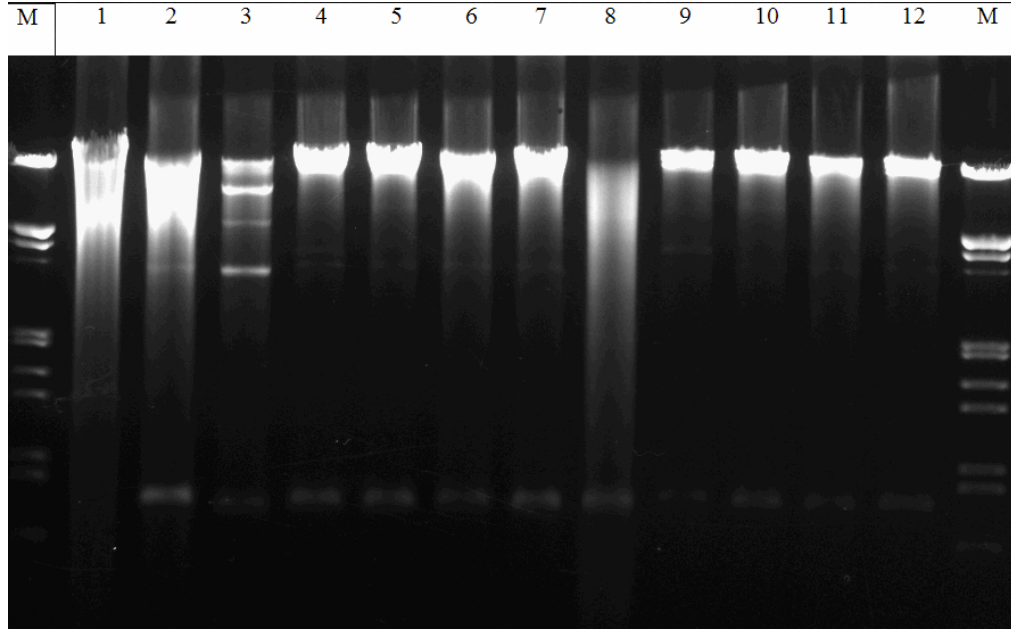
Şekil 4. 21 *Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *EcoRI* kesimi



Şekil 4.21 (devam) *Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *EcoRI* kesimi

1. Marker	7. ΦY4-X6	12. Φ231-X17	17. ΦY4L-Z
2. ΦY4-X1	8. ΦY4-X8	13. ΦV1-X19	18. ΦV2L-A
3. ΦY4-X2	9. ΦY4-X9	14. ΦV2-X24	19. ΦV2L-Z
4. ΦY4-X3	10. ΦY4-X10	15. ΦV2-X29	20. ΦV1L-A
5. ΦY4-X4	11. ΦY4-X12	16. ΦY4L-A	21. Marker
6. ΦY4-X5			

İlk yapılan kesimlerin sonuçlarından şüpheye düşülmesi nedeniyle Y4-X2, Y4-X3, Y4-X4, Y4-X5, Y4-X6, Y4-X8 faj genomları ile tekrar kesime gidilmiştir. İnkübasyon süresinin uzatılması, kullanılan enzim miktarının artırılması ve kesime giren DNA miktarında değişiklik yapılması ilk denemeden farklı bir sonucun alınmasını sağlamamıştır (Şekil 4.22). Dolayısıyla faj genomlarının daha önce de bahsedildiği şekilde fragment dizilimine sahip oldukları görülmüştür.



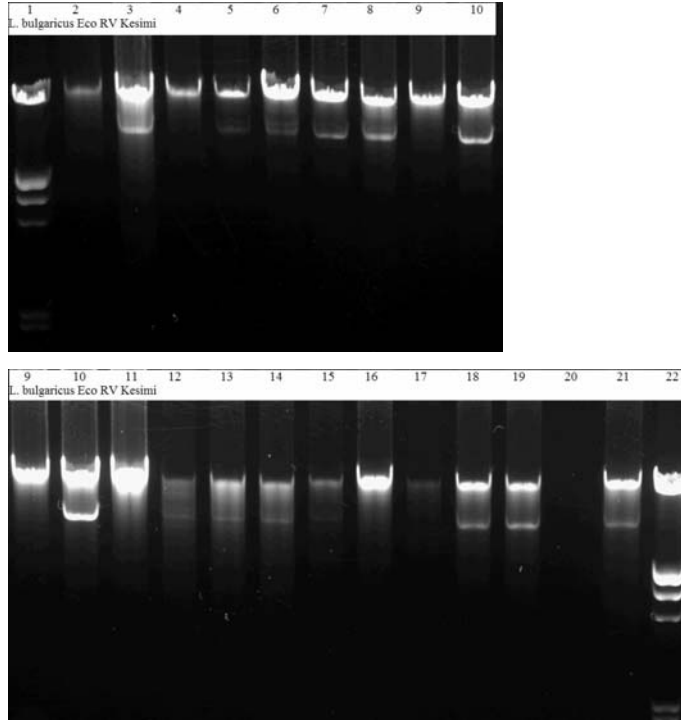
Şekil 4.22 *Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *EcoRI* kesimi (2. ve 3. denemeler)

1. ΦY4-X2 (Kesilmemiş)	4. ΦY4-X4	7. ΦY4-X8	<u>10. ΦY4-X5</u>
2. ΦY4-X2	5. ΦY4-X5	8. Φ231-X17	<u>11. ΦY4-X6</u>
3. ΦY4-X3	6. ΦY4-X6	<u>9. ΦY4-X4</u>	<u>12. ΦY4-X8</u>

Altı çizili fajlara ait görüntüler 3. denemeye aittir.

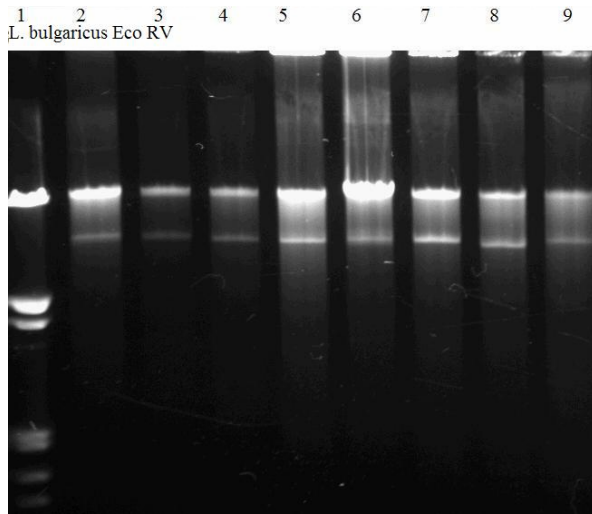
***Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *EcoRV* kesimi**

Lb. bulgaricus faj DNA'larının diğer enzimlerle kesimlerden çok sağlıklı olmasa da sonuç alınabiliyorken *EcoRV* ile kesiminden, jel fotoğraflarından da anlaşılacağı üzere DNA kalitesine ve enzim faktörüne bağlı olarak iyi bir veri elde edilememiştir (Şekil 4.23-4.24).



Şekil 4.23 *Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *EcoRV* kesimi

- | | | | |
|-----------------|--------------------|-------------------|------------------|
| 1. Marker | 7. $\Phi Y4-X6$ | 13. $\Phi V1-X19$ | 19. $\Phi V2L-Z$ |
| 2. $\Phi Y4-X1$ | 8. $\Phi Y4-X8$ | 14. $\Phi V2-X24$ | 20. $\Phi LbA-Z$ |
| 3. $\Phi Y4-X2$ | 9. $\Phi Y4-X9$ | 15. $\Phi V2-X29$ | 21. $\Phi V1L-A$ |
| 4. $\Phi Y4-X3$ | 10. $\Phi Y4-X10$ | 16. $\Phi Y4L-Z$ | 22. Marker |
| 5. $\Phi Y4-X4$ | 11. $\Phi Y4-X12$ | 17. $\Phi Y4L-A$ | |
| 6. $\Phi Y4-X5$ | 12. $\Phi 231-X17$ | 18. $\Phi V2L-A$ | |



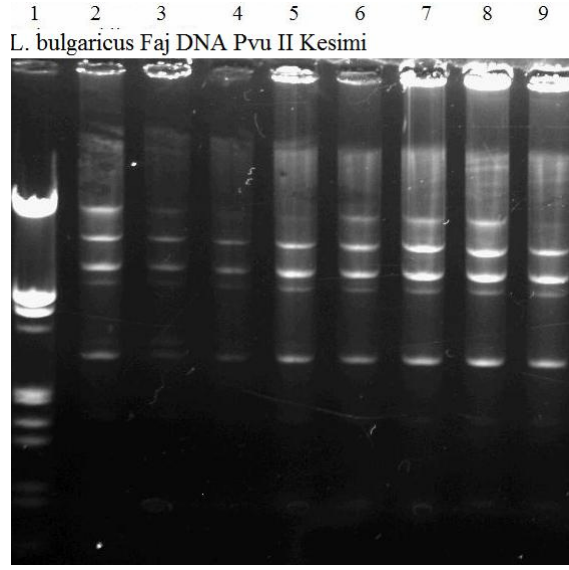
Şekil 4.24 *Lb. bulgaricus* V2 X21-X28 faj DNA'larının *EcoRV* kesimi

1. Marker 3. ΦV2-X22 5. ΦV2-X24 7. ΦV2-X26 9. ΦV2-X28
2. ΦV2-X21 4. ΦV2-X23 6. ΦV2-X25 8. ΦV2-X27

***Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *PvuII* kesimi**

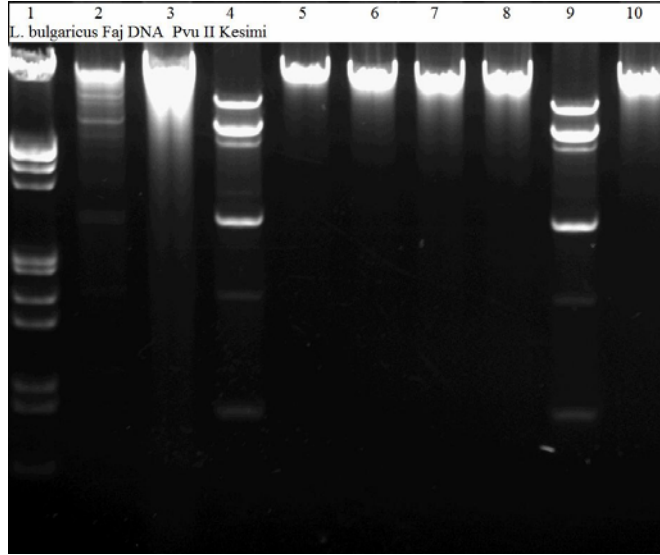
Lb. bulgaricus faj DNA'larının, *PvuII* ile kesime sokulması ile *EcoRI* kesiminde alınan sonuçlara ulaşılmış, yani iki kesim birbirini doğrulamıştır. Bu sonuca varılmasının nedeni *PvuII*'nin, ΦY4-X2, ΦY4-X4, ΦY4-X5, ΦY4-X6, ΦY4-X8 ve ΦY4-X10 üzerinde kesim için ihtiyacı olan tanıma sekaslarının olmayışı ve çiğ süt izolatları dahil diğer tüm faj genomlarının *EcoRI* kesiminde olduğu gibi aynı profili vermesidir (Şekil 4.25-4.6). Şekil 4.25'de de görüldüğü üzere ΦY4-X1'de kesim tamamlanamamış ve iyi bir kesim profili alınamamıştır. Aynı şekilde Y4L-Z faj DNA'sında diğerlerinde olmayan bir fragmentin varlığından emin olmak için bu fajlarla tekrar kesim karışımları hazırlanmıştır (Şekil 4.27). Bu kesim ile Y4-X1 fajının DNA fragmentlerinin oluşumu sağlanmış ve görüntülenmiştir. Üçüncü bantın kısmi kesimden kaynaklandığı düşünülmektedir. 1042 baz büyüklüğündeki 6. fragment ise diğerlerinde yoktur. Ancak aynı şey ΦY4L-Z için geçerli olamamıştır. Kesim bölgesinin olmaması nedeniyle Y4-X2, Y4-X4, Y4-X5, Y4-X6, Y4-X8 ve Y4-X10 faj genom büyüklükleri hesaplanamamıştır. Grubu temsilen ΦY4-X1 ve ΦY4-X3 genomlarına ait fragment büyüklükleri aşağıda verilmiştir.

ΦY4-X1	ΦY4-X3
14151	14151
9392	9392
2834	2834
1637	1637
1042	804
29056 baz genom büyüklüğü	28818 baz genom büyüklüğü

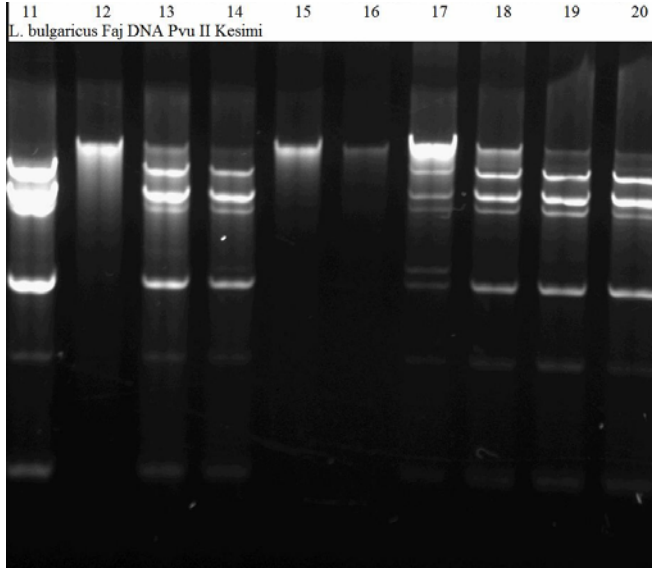


Şekil 4.25 *Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *PvuII* kesimi

1. Marker 3. ΦV2-X22 5. ΦV2-X24 7. ΦV2-X26 9. ΦV2-X28
2. ΦV2-X21 4. ΦV2-X23 6. ΦV2-X25 8. ΦV2-X27

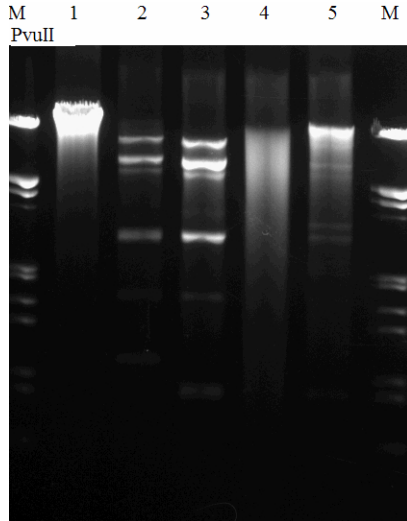


Şekil 4.26 *Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *PvuII* kesimi



Şekil 4.26 (devam) *Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *PvuII* kesimi

- | | | | |
|-----------|-------------|--------------|------------|
| 1. Marker | 6. ΦY4-X5 | 11. ΦY4-X12 | 16. ΦY4L-A |
| 2. ΦY4-X1 | 7. ΦY4-X6 | 12. Φ231-X17 | 17. ΦY4L-Z |
| 3. ΦY4-X2 | 8. ΦY4-X8 | 13. ΦV1-X19 | 18. ΦV2L-A |
| 4. ΦY4-X3 | 9. ΦY4-X9 | 14. ΦV2-X24 | 19. ΦV2L-Z |
| 5. ΦY4-X4 | 10. ΦY4-X10 | 15. ΦV2-X29 | 20. ΦV1L-A |



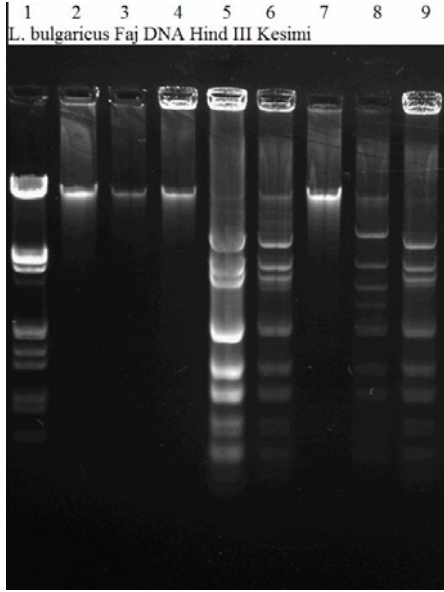
Şekil 4.27 *Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *PvuII* kesimi (tekrar)

1. ΦY4-X3(Kesim yapılmamış)
2. ΦY4-X1
3. ΦY4-X3
4. Φ231-X17
5. ΦY4L-Z

***Lb. bulgaricus* faj DNA' larının *Hind*III kesimi**

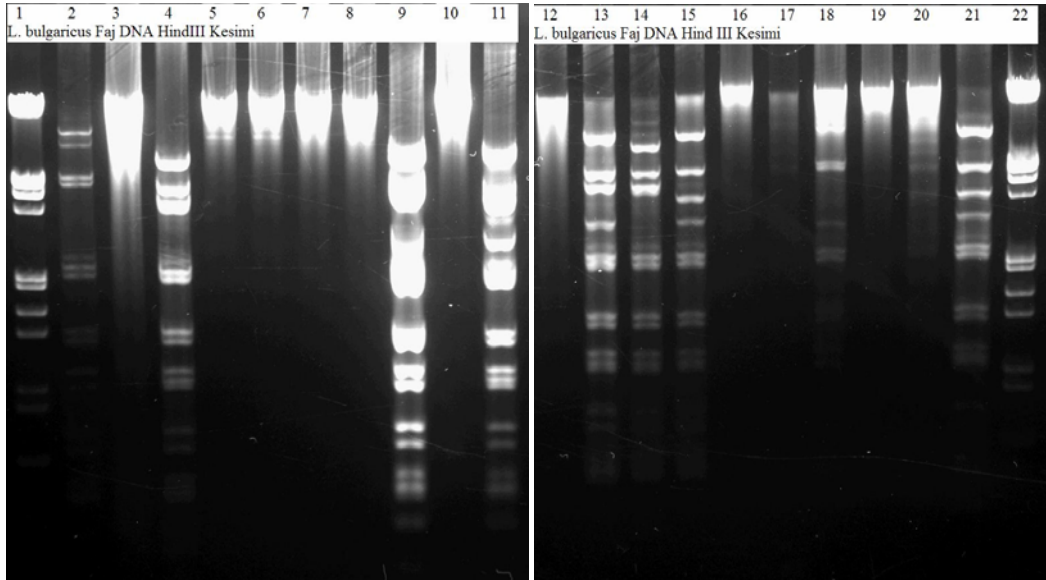
*Eco*RI ve *Pvu*II restriksiyon endonükleazlarla kesim sonucu *Lb. bulgaricus* fajları ancak 2 gruba ayrılmıştır. *Hind*III enziminin kullanımı sayesinde Y4-X2, Y4-X4, Y4-X5, Y4-X6, Y4-X8 ve Y4-X10 fajları dışında kalan diğer fajları da birbirlerinden ayırmak mümkün olabilmıştır. *Hind*III enziminin de, Y4-X2, Y4-X4, Y4-X5, Y4-X6, Y4-X8 ve Y4-X10 faj genomları üzerinde tanıma sekansının olmadığı tespit edilmiştir. Bu fajlara ek olarak konakçıları V2 *Lb. bulgaricus* ticari kültürü olan fajlarda da (ΦV2-X21, ΦV2-X22, ΦV2-X23 ve ΦV2-X26) kesim bölgesinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.28-4.29). Hem enzimin tanıma bölgesinin olmadığından hem de diğer bazı faj fragmentlerinin varlığından emin olmak amacıyla kesimler tekrarlanmıştır. Ayrı fragment dizilimine sahip fajlardan Y4-X1, Y4-X3, Y4-X9, Y4-X12, V1-X19, V2-X24, V2-X27 ve V1L-A faj DNA' ları tekrarlanan denemelerde referans olmaları açısından tekrar kesime alınmışlardır. Enzim miktarı 10 u'den 15 u'e, inkübasyon süresi de 2 saatten 3 saate çıkarılmıştır. Enzim miktarının ve inkübasyon süresinin uzaması Y4-X3, Y4-X9 ve Y4-X12 fajların fragment oluşumunu etkilemezken, 2. ve 3. tekrarlarda Y4-X1, Y4L-A, Y4L-Z, V2L-A ve V2L-Z faj genom fragmentleri ayırt edilememiştir. V1L-A faj genomunda ise şartlar aynı olmasına rağmen 2. denemede sonuç alınamamış, 3. tekrarda ise fragmentler görülmüştür (Şekil 4.30-4.31). Bu denemeler doğrultusunda ΦV2L-A genomunun da *Hind*III enzimi tarafından kesilemediği tespit edilmiştir. Kesime alınan tüm fajlar; faj fragment profillerine göre 8 grup oluşturmuştur. Bunlardan biri kesim yapılamayanların oluşturduğu bir gruptur. *Hind*III kesiminde fragment büyüklüklerinin toplanması ile faj genomlarının 29-37 kb arasında olduğu saptanmıştır.

1. Grup <u>ΦY4-X2</u> <u>ΦY4-X4</u> <u>ΦY4-X5</u> <u>ΦY4-X6</u> <u>ΦY4-X8</u> <u>ΦY4-X10</u> <u>ΦV2-X21</u> <u>ΦV2-X22</u> <u>ΦV2-X23</u> <u>ΦV2-X26</u> <u>ΦV2L-A</u>	2. Grup <u>ΦV1L-A</u> <u>ΦV2L-Z</u> 10746 4944 3499 2327 2169 1409 1331 1127 1092 1039 297 111	3. Grup <u>ΦY4-X1</u> 15483 6009 4944 2327 2169 1409 1331 1127 1092 1039 297 111	4. Grup <u>ΦV2-X27</u> 10746 4944 3499 2983 2169 2118 1409 1331 1127 1092 1039 297 111
Kesim yok	30 091 baz	37 338 baz	32 865 baz
5. Grup <u>ΦY4-X9</u> 10746 4606 2983 2169 2118 1409 1331 1127 1092 1039 297 111	6. Grup <u>ΦY4-X12</u> 10028 4606 3825 2983 2169 2118 1409 1331 1127 1092 1039 297 111	7. Grup <u>ΦV1-X19</u> 10746 4606 3825 2983 2169 2118 1409 1331 1127 1092 1039 297 111	8. Grup <u>ΦY4-X3, ΦV2-X24</u> <u>ΦV2-X25, ΦV2-X28</u> 10028 4606 3825 2169 2118 1409 1331 1127 1092 1039 297 111
29 028 baz	32 135 baz	32 853 baz	29 152 baz



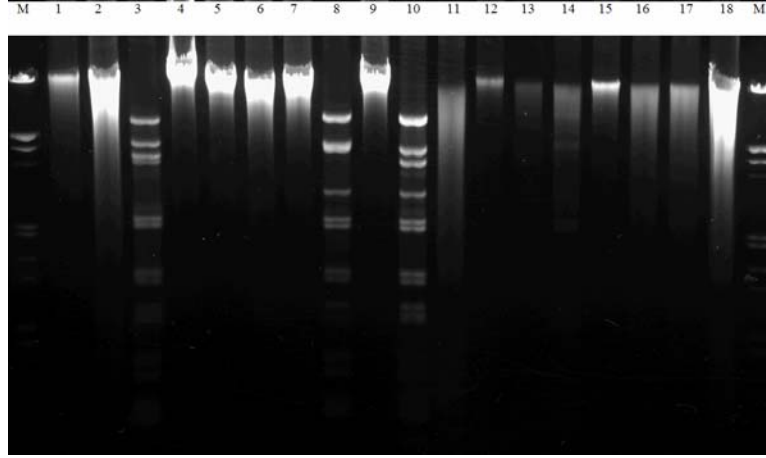
Şekil 4.28 *Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *Hind*III kesimi

- | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1. Marker | 3. ΦV2-X22 | 5. ΦV2-X24 | 7. ΦV2-X26 | 9. ΦV2-X28 |
| 2. ΦV2-X21 | 4. ΦV2-X23 | 6. ΦV2-X25 | 8. ΦV2-X27 | |



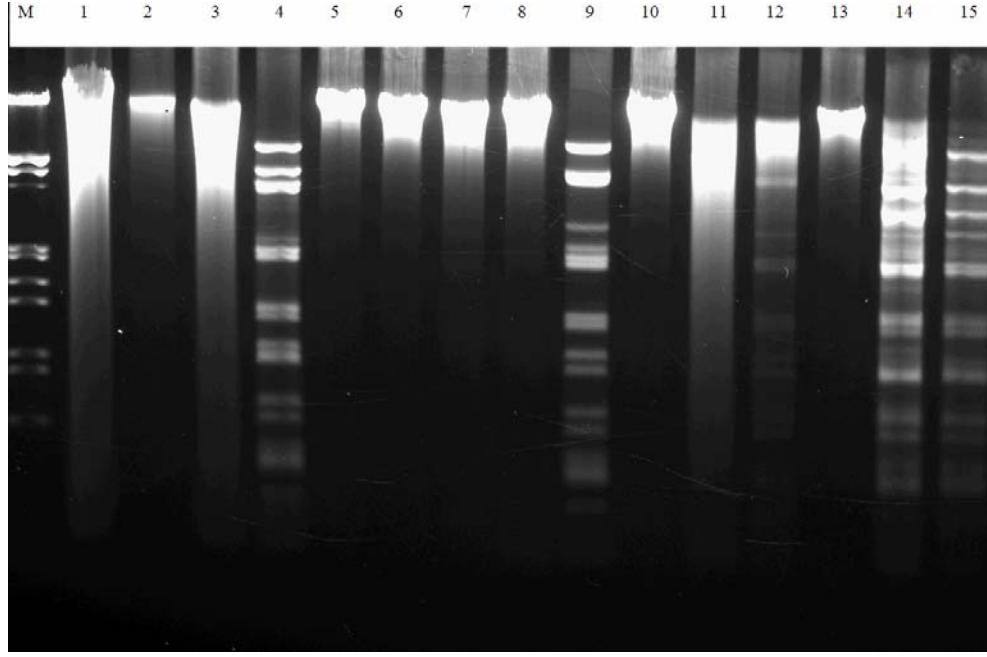
Şekil 4.29 *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül faj DNA'larının *Hind*III kesim sonuçları

1. Marker	7. ΦY4-X6	13. ΦV1-X19	18. ΦY4L-Z
2. ΦY4-X1	8. ΦY4-X8	14. ΦV2-X24	19. ΦV2L-A
3. ΦY4-X2	9. ΦY4-X9	15. ΦV2-X27	20. ΦV2L-Z
4. ΦY4-X3	10. ΦY4-X10	16. ΦV2-X29	21. ΦV1L-A
5. ΦY4-X4	11. ΦY4-X12	17. ΦY4L-A	22. Marker
6. ΦY4-X5	12. Φ231-X17		



Şekil 4.30 *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül faj DNA'larının *Hind*III kesim sonuçları (2. deneme)

M: Marker	6. ΦY4-X6	12. ΦV2-X29	18. ΦY4-X2 (kesim yapılmamış)
1. ΦY4-X1	7. ΦY4-X8	13. ΦY4L-A	
2. ΦY4-X2	8. ΦY4-X9	14. ΦY4L-Z	
3. ΦY4-X3	9. ΦY4-X10	15. ΦV2L-A	
4. ΦY4-X4	10. ΦY4-X12	16. ΦV2L-Z	
5. ΦY4-X5	11. Φ231-X17	17. ΦV1L-A	

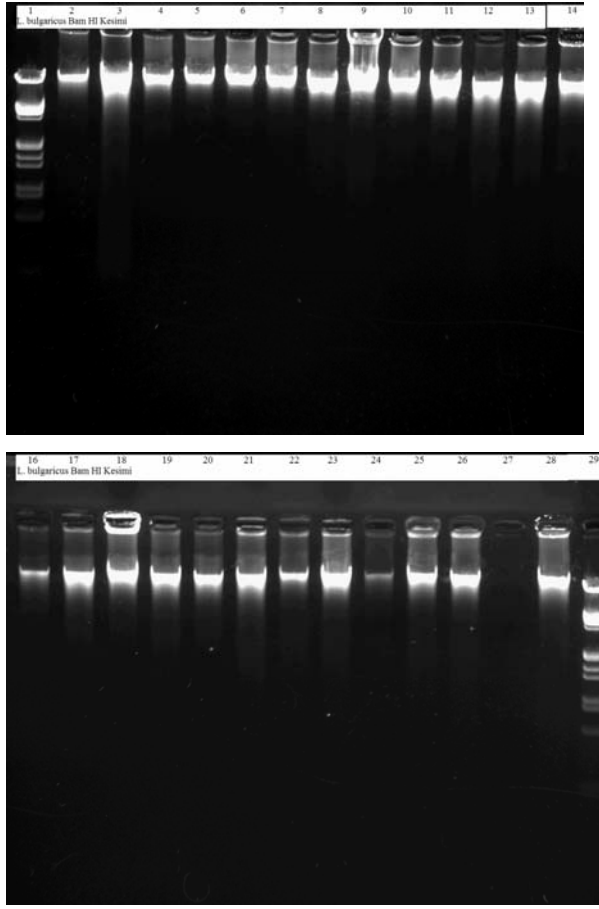


Şekil 4.31 *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül faj DNA'larının *Hind*III kesim sonuçları (3. deneme)

M: Marker	6. ΦY4-X5	12. ΦY4L-Z
1. ΦY4-X2 (kesim yapılmamış)	7. ΦY4-X6	13. ΦV2L-A
2. ΦY4-X1	8. ΦY4-X8	14. ΦV2L-Z
3. ΦY4-X2	9. ΦY4-X9	15. ΦV1L-A
4. ΦY4-X3	10. ΦY4-X10	
5. ΦY4-X4	11. Φ231-X17	

***Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *Bam*HI kesimi**

*Bam*HI restriksiyon endonükleaz enziminin, *S. thermophilus* fajlarında olduğu gibi *Lb. bulgaricus* faj genomları üzerinde de kesim dizilerinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.34).



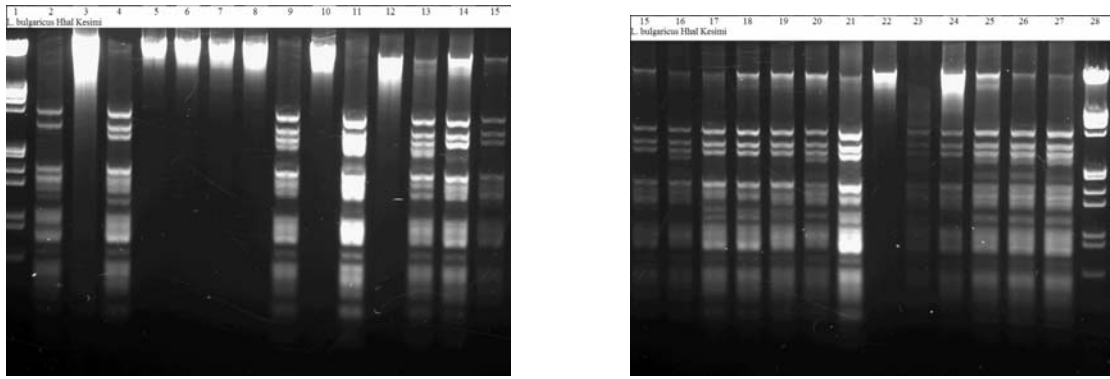
Şekil 4.32 *Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *Bam*HI kesimi

1. Marker	7. ΦY4-X6	13. ΦV1-X19	19. ΦV2-X26	25. ΦV2L-Z
2. ΦY4-X1	8. ΦY4-X8	14. ΦV2-X21	20. ΦV2-X27	26. ΦV2L-A
3. ΦY4-X2	9. ΦY4-X9	15. ΦV2-X22	21. ΦV2-X28	27. ΦLbA-Z
4. ΦY4-X3	10. ΦY4-X10	16. ΦV2-X23	22. ΦV2-X29	28. ΦV1L-A
5. ΦY4-X4	11. ΦY4-X12	17. ΦV2-X24	23. ΦY4L-Z	29. Marker
6. ΦY4-X5	12. Φ231-X17	18. ΦV2-X25	24. ΦY4L-A	

***Lb. bulgaricus* faj DNA'larının *Hha*I kesimi**

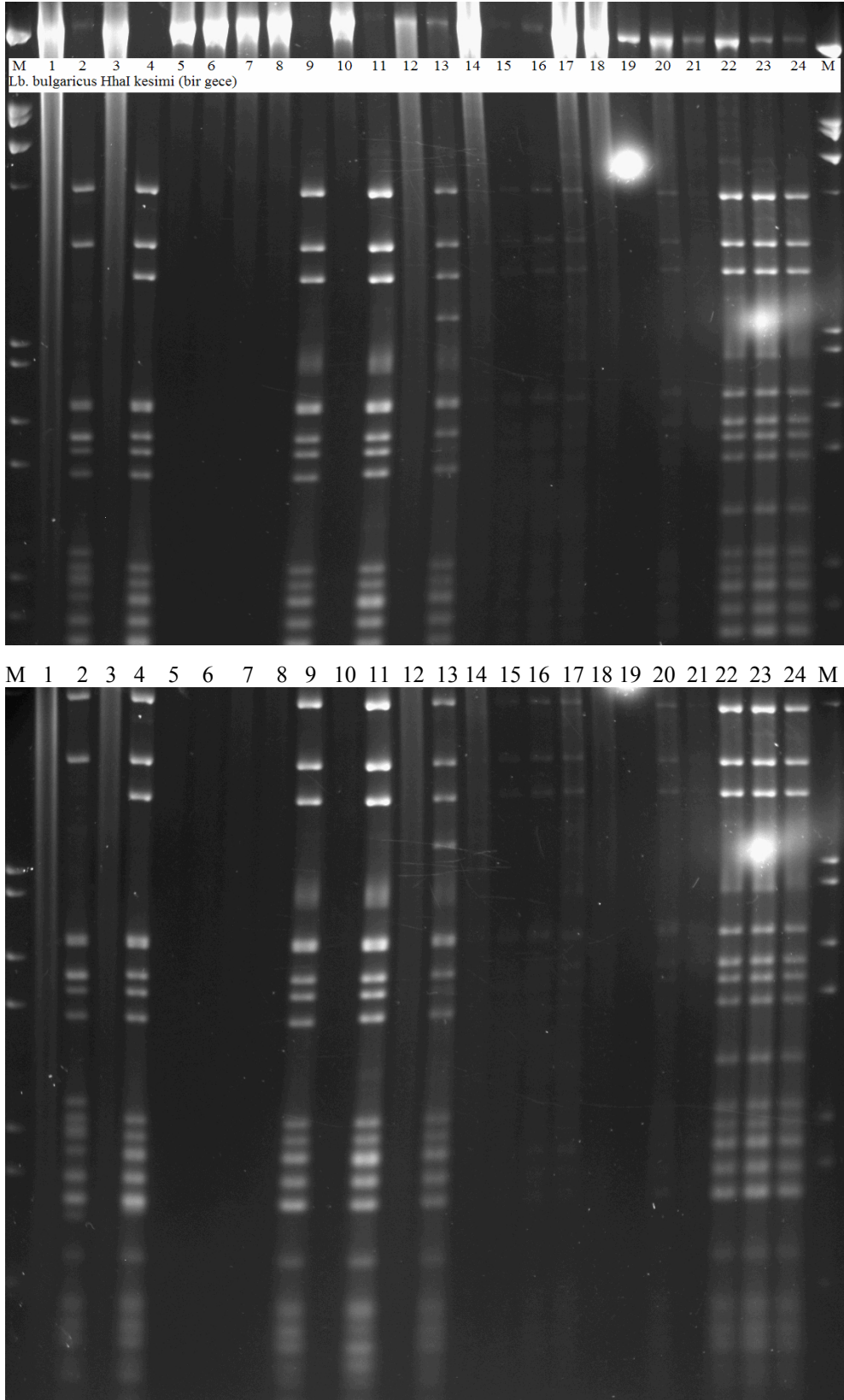
Diğer kesimlerde olduğu gibi öncelikle *Lb. bulgaricus* faj DNA'ları *Hha*I restriksiyon enzimi ile 37°C'de 2 saat süresince muamele edilmiş ancak genomların ilk üç fragmentleri dışında diğerlerinin iyi ayrılamaması nedeniyle ikinci bir deneme kurulmuştur. Enzim miktarı 15 u'e, inkübasyon süresi de 37°C'de 4 saate çıkarılmıştır.

Ancak elde edilen sonuç ilkinden farksız olmuştur (Şekil 4.32). Bunun üzerine reaksiyona giren enzim miktarı ve inkübasyon sıcaklığı aynı kalacak şekilde 3. bir kesim daha yapılmıştır. Oluşan fragmentlerin gözlenebilmesi için agaroz konsantrasyonu % 1.5 olan jel hazırlanmış ve 45 V da gece boyu yürütülmüştür. Bu işlem sonucu elde edilen jel Şekil 4.33’de verilmiştir. Y4-X1 fajının diğerlerinden farklı olduğu ilk bakışta dikkati çekmektedir. ΦY4-X3, ΦY4-X9 ve ΦY4-12 bir grupta, V1-X19 fajı da ayrı bir grupta yer aldığı görülmüştür. Çiğ süt izolatları olan ΦY4L-Z, ΦY4L-A, ΦV2L-A, ΦV2L-Z ve ΦV1L-A’nın da dördüncü grubu oluşturduğu saptanmıştır. Böylece *PvuII* ve *EcoRI* kesimleri sonucunda aynı gruplarda yer alan fajlar farklı gruplara dağılmıştır. *HhaI* enziminin de ΦY4-X2, ΦY4-X4, ΦY4-X5, ΦY4-X6, ΦY4-X8 ve ΦY4-X10 genomlarında kesim yapamadığı dikkat çekmiştir.



Şekil 4.33 *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül faj DNA’larının *HhaI* kesim sonuçları (2. deneme)

1. Marker	7. ΦY4-X6	13. ΦV1-X19	19. ΦV2-X26	25. ΦV2L-A
2. ΦY4-X1	8. ΦY4-X8	14. ΦV2-X21	20. ΦV2-X27	26. ΦV2L-Z
3. ΦY4-X2	9. ΦY4-X9	15. ΦV2-X22	21. ΦV2-X28	27. ΦV1L-A
4. ΦY4-X3	10. ΦY4-X10	16. ΦV2-X23	22. ΦV2-X29	28. Marker
5. ΦY4-X4	11. ΦY4-X12	17. ΦV2-X24	23. ΦY4L-A	
6. ΦY4-X5	12. Φ231-X17	18. ΦV2-X25	24. ΦY4L-Z	



Şekil 4.34 *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül faj DNA'larının *HhaI* kesim sonuçları (3. deneme)

M: Marker	6. ΦY4-X5	13. ΦV1-X19	20. ΦY4L-Z
1. ΦY4-X2 (kesim yapılmamış)	7. ΦY4-X6	14. ΦV2-X24	21. Φ Y4L-A
2. ΦY4-X1	8. ΦY4-X8	15. ΦV2-X25	22. ΦV2L-A
3. ΦY4-X2	9. ΦY4-X9	16. ΦV2-X26	23. ΦV2L-Z
4. ΦY4-X3	10. ΦY4-X10	17. ΦV2-X27	24. ΦV1L-A
5. ΦY4-X4	11. ΦY4-X12	18. ΦV2-X28	
	12. Φ231-X17	19. ΦV2-X29	

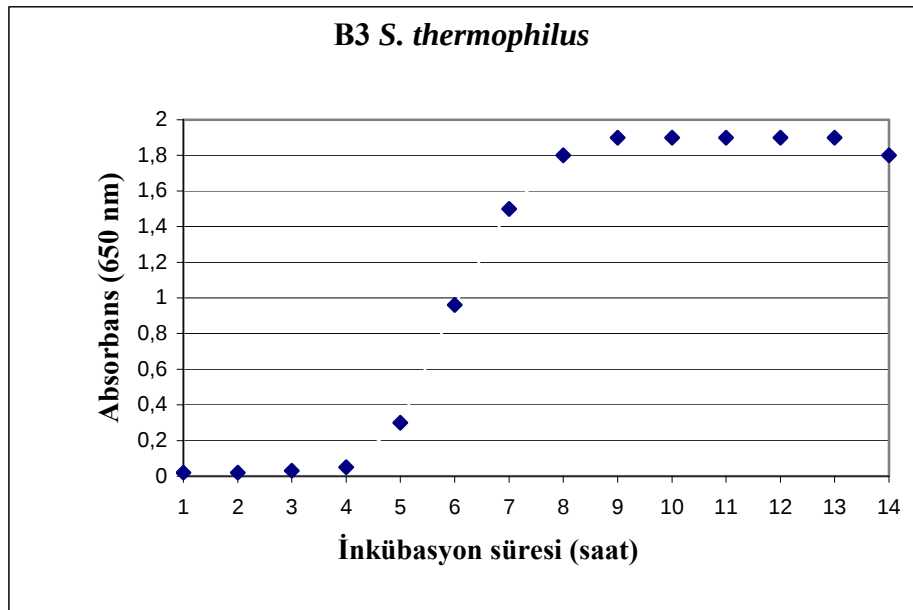
4. 3. Faj replikasyon parametreleri

4. 3. 1 Konakçı suşların gelişme eğrilerinin çıkarılması

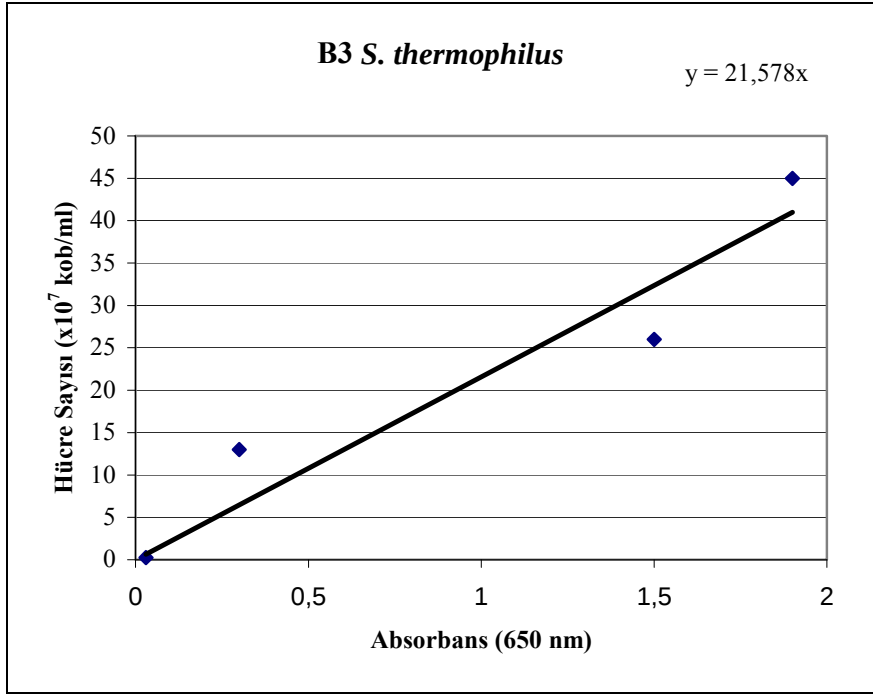
Fajın konakçısına veya diğer duyarlı bir suşa adsorbsiyon oranı, faj nükleik asidinin konakçıya infekte olduktan sonra olgun faj partiküllerinin oluşumuna kadar geçen latent periyot süresi, infekte olan bakteriden liziz ile salınan 1. kuşak faj sayısı (patlama büyüklüğü), fajın plak etkinliği ve plak morfolojisi faj gelişim parametreleri olup standart koşullarda yürütülen denemelerde belirlenir ve fajın daha iyi karakterize olmasını sağlar. Latent periyodun ve patlama büyüklüğünün belirlenmesi 1939'da Max Delbrück ve Emory Ellis tarafından geliştirilen tek aşamalı (one step) faj gelişim denemelerinden sonra mümkün olabilmektedir (Ellis and Delbrück 1939). Faj gelişim eğrileri çıkarılmadan önce fajın konakçısına % 90 oranında veya üzerinde adsorbe olması istenir. Gelişme evresinde sayısı (kob/ml) bilinen aktif konakçı hücreler ile titresi (pfu/ml) belli faj filtratı, faj multiplisitesi (MOI)= 1.0 (1:1) veya birçok halde önerildiği gibi 0.1 (1:10) olacak şekilde karıştırılıp belli bir sıcaklıkta uygun bir süre adsorbsiyon için bekletildikten sonra tek aşamalı faj denemeleri için gerekli işlemlere başlanır. İşte bu nedenle fajların konakçıların gelişme eğrileri çıkarılmış, logaritmik dönemdeki aktif hücre sayısı ile kültür ortamının absorbansı arasındaki ilişki belirlenmiştir. Bu şekilde MOI değeri için belirli faj sayısı ile karşılaştırılacak olan konakçı hücre sayısına, konakçı hücre süspansiyonunun absorbans değerine bakılarak karar verilmiştir.

S. thermophilus fajlarının konakçılarından B3 ve 709 kodlu endüstriyel suşlar ile *Lb. bulgaricus* fajlarına konakçı görevi yapan endüstriyel suşlardan V1 ve Y4 bakterileri sırasıyla M17 broth ve MRS broth besiyerlerinde uygun sıcaklıkta (43°C) geliştirilmiş, gelişme süresince 1 veya 2 saat aralıklarla kültürlerin 650 nm dalga boyunda (Spectronic 20) absorbans değerleri ölçülerek gelişimleri takip edilmiştir. Aynı zamanda *S. thermophilus* suşları için M17 agara, *Lb. bulgaricus* suşları için de MRS agara ekim yapılarak, gelişen bakterilerin hücre sayısındaki değişimler belirlenmiş ve suşların gelişim eğrileri çıkarılmıştır. Şekil 4.35, B3 *S. thermophilus* suşunun 650 nm de absorbans ölçümü ile elde edilen gelişim eğrisini, Şekil 4.36 ise aynı denemede optik dansiteye bağlı olarak hücre sayısının görülmesini sağlayan kalibrasyon eğrisini göstermektedir. 709 *S. thermophilus* ile yürütülen deneme sonuçları da, Şekil 4.37 ve 4.38’de verilmiştir. Herbir bakteri için denemeler üç kez tekrarlanmıştır.

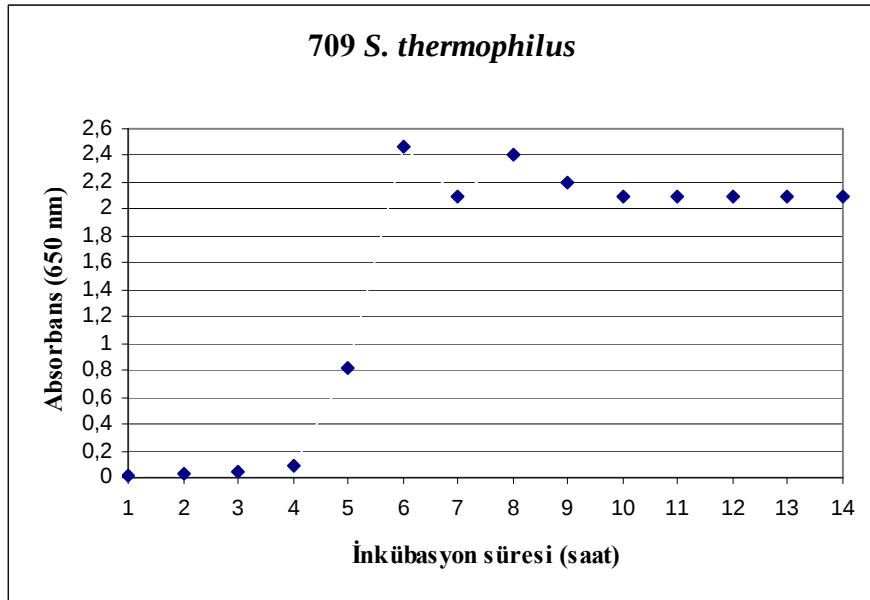
İnokülasyondan hemen sonra, sırasıyla 0.03 ve 0.04 absorbans (ektinksiyon) değerleri ile başlayan denemelerde, hem B3 hem de 709 kodlu konakçıların 3. saatten itibaren logaritmik gelişme fazına geçtikleri ve üremelerine bağlı olarak 0.5 absorbans değerine ulaştıklarında sayılarının yaklaşık 1×10^8 ile 2×10^8 kob/ml olduğu ve bundan sonra da hızla artmaya devam ettikleri görülmüştür (Şekil 4.36-4.38).



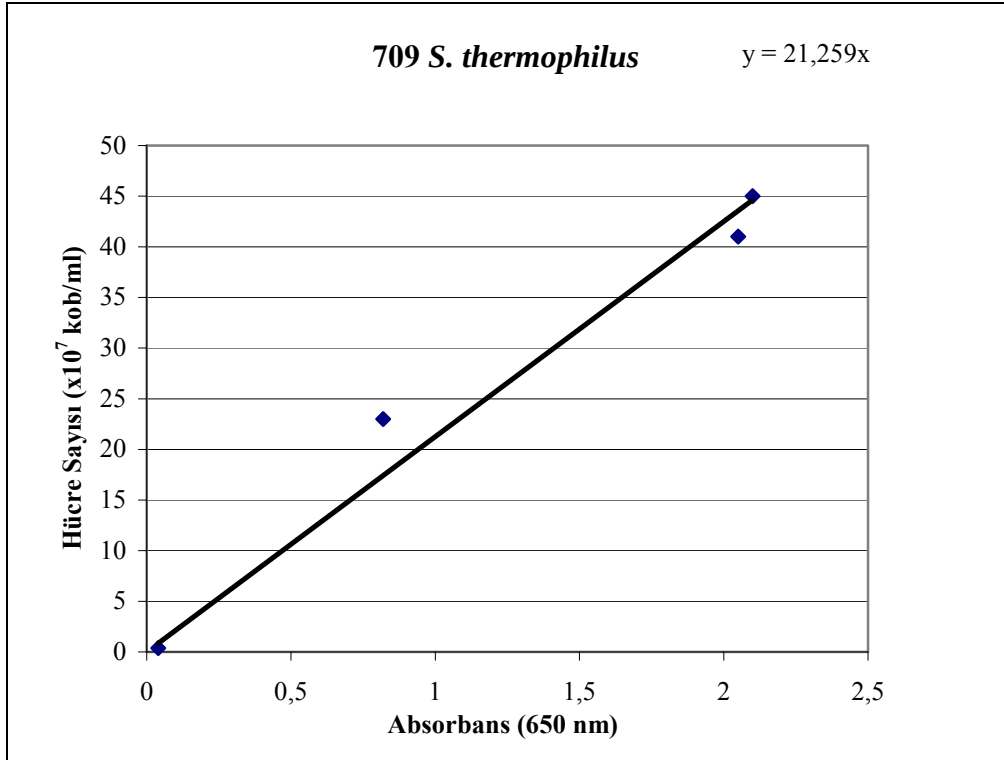
Şekil 4.35 B3 *S. thermophilus* suşunun gelişim eğrisi



Şekil 4.36 B3 *S. thermophilus* suşunun hücre sayısı

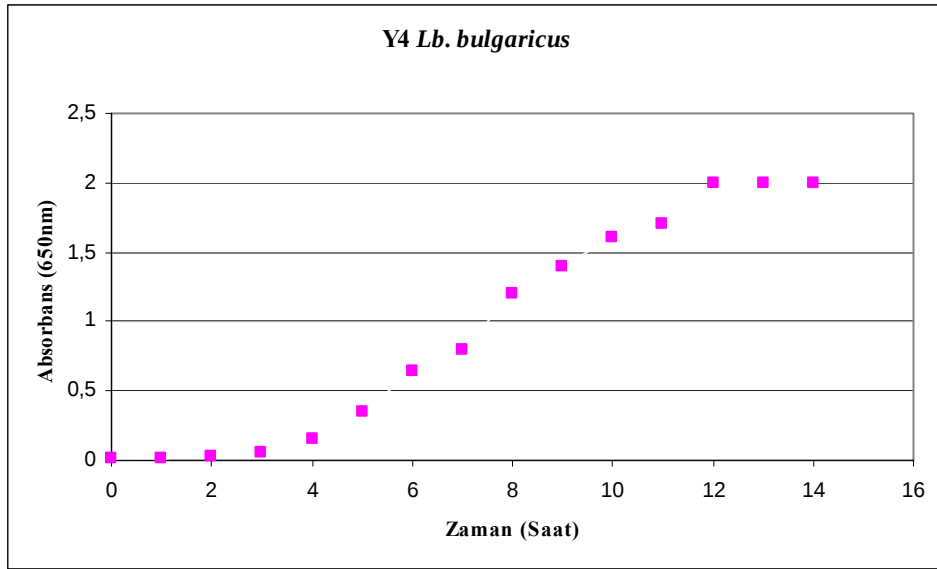


Şekil 4.37 709 *S. thermophilus* suşunun gelişme eğrisi

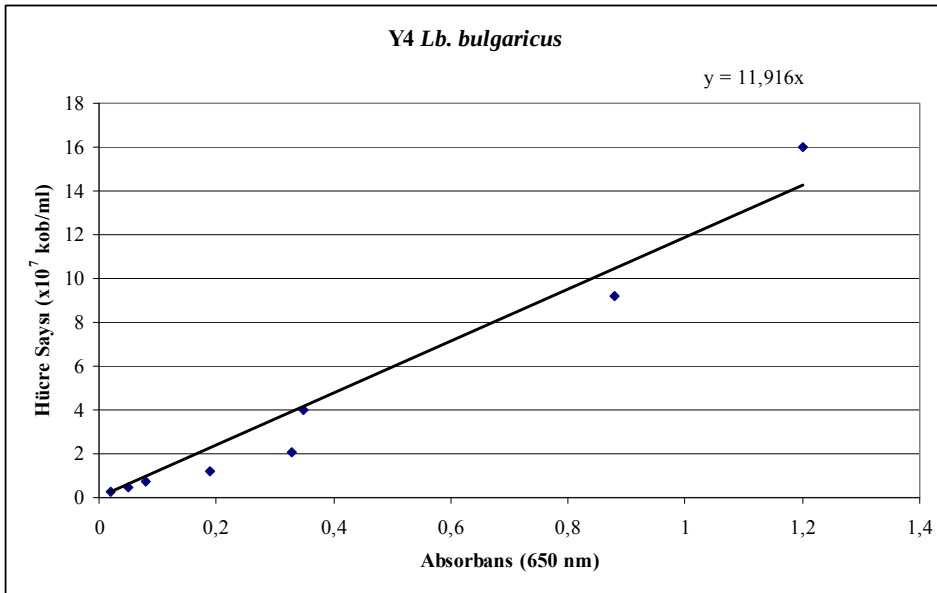


Şekil 4.38 709 *S. thermophilus* suşunun hücre sayısı

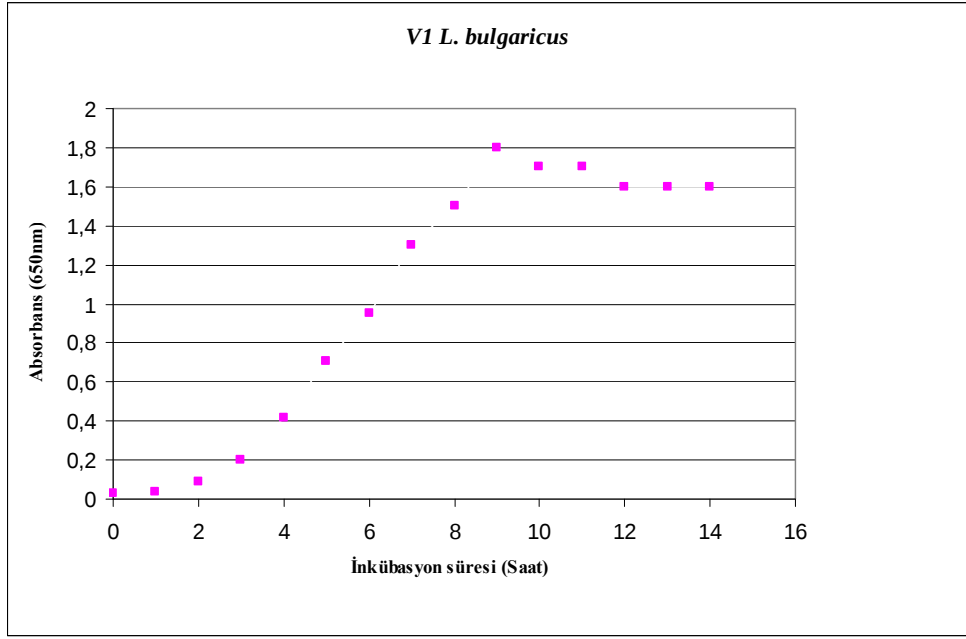
Lb. bulgaricus suşlarında ise durum biraz daha farklıdır. Y4 konakçısının logaritmik faza geçişi *S. thermophilus* suşlarına benzer şekilde, V1 suşunun ise bu faza geçişi hızlı görünse de her iki suşun üreme hızlarının yavaş olduğu Şekil 4.39 ve Şekil 4.41'den anlaşılmaktadır. Üremenin yavaş olmasına bağlı olarak faj çalışmalarında kullanılan ve yaklaşık 0.5 absorbans değerine gelen konakçıların hücre sayılarının da az olduğu ve yaklaşık 2.5×10^7 ile 6×10^7 kob/ml arasında seyrettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.40-4.42).



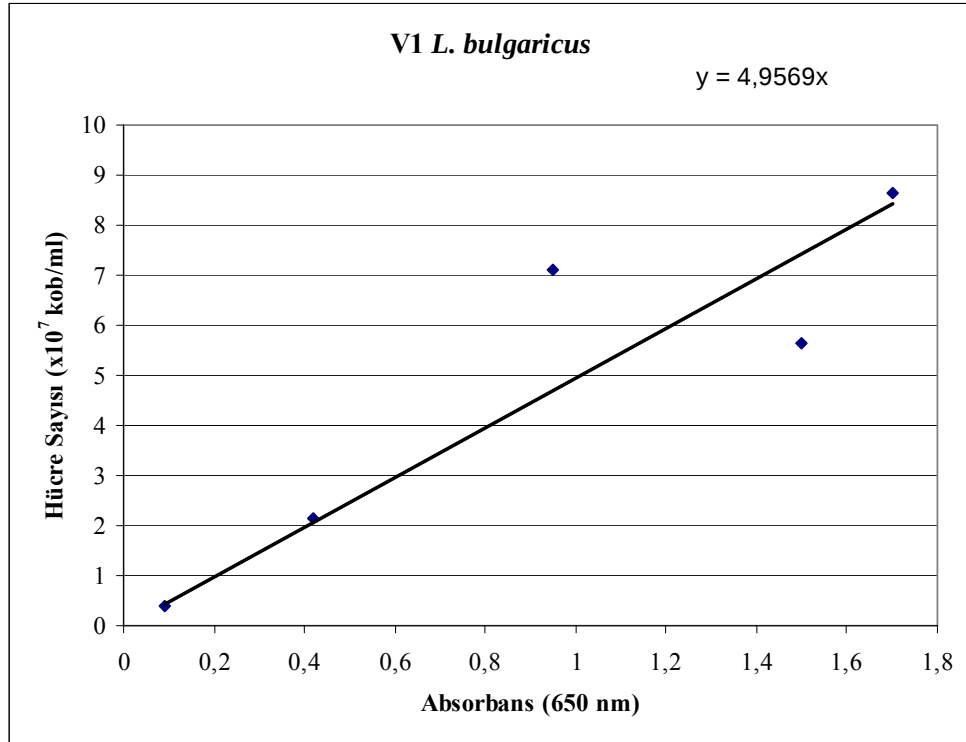
Şekil 4.39 Y4 *Lb. bulgaricus* suşunun gelişme eğrisi



Şekil 4.40 Y4 *Lb. bulgaricus* suşunun hücre sayısı



Şekil 4.41 V1 *Lb. bulgaricus* suşunun gelişme eğrisi



Şekil 4.42 V1 *Lb. bulgaricus* suşunun hücre sayısı

4.3.2 Latent dönem süresinin ve patlama büyüklüğünün belirlenmesi (Tek aşamalı gelişme testi)

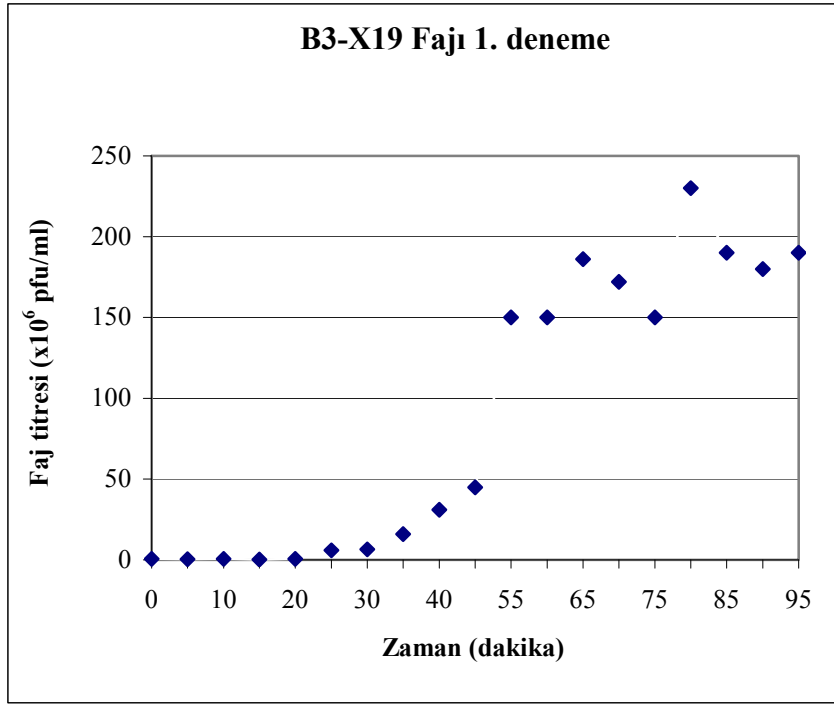
Replikasyon parametrelerinin belirleneceği fajlar seçilirken, hem her enzim kesiminde oluşan fragmentleriyle diğerlerinden farklı olmalarına hem de fajların farklı süt veya süt ürünlerinden izole edilmiş olmasına dikkat edilmiştir. Parametre çalışmaları için 709-X5 (Ayran), 231-X9 (Bulk), 231S-A1MÖ (pastörize süt), 2B3-A (çiğ süt), B3-X19 (yoğurt) *S. thermophilus* ve Y4-X12 (yoğurt) *Lb. bulgaricus* fajları seçilmiştir.

Fajların tek aşamalı gelişme eğrilerinin çıkarılması amacıyla faj ile konakçısı MOI değeri yaklaşık 0.1 olacak şekilde karıştırılmış, adsorbsiyonun tamamlanmasından sonra santrifüj işlemi ile adsorbe olmayan fajlar ayrılmıştır. Konakçıya adsorbe olmuş fajı içeren pelet ise 10 ml thM17 besiyerinde çözülmüş dilüsyonları hazırlandıktan sonra inkübasyona bırakılmıştır. 5'er dakika arayla dilüsyonlardan örnek alınmış ve faj titresi belirlenmiştir. *Lb. bulgaricus* fajı söz konusu olduğunda ise faj-bakteri peleti MRS broth da çözülmüş ve 10-15 dakika arayla örnek alınmıştır.

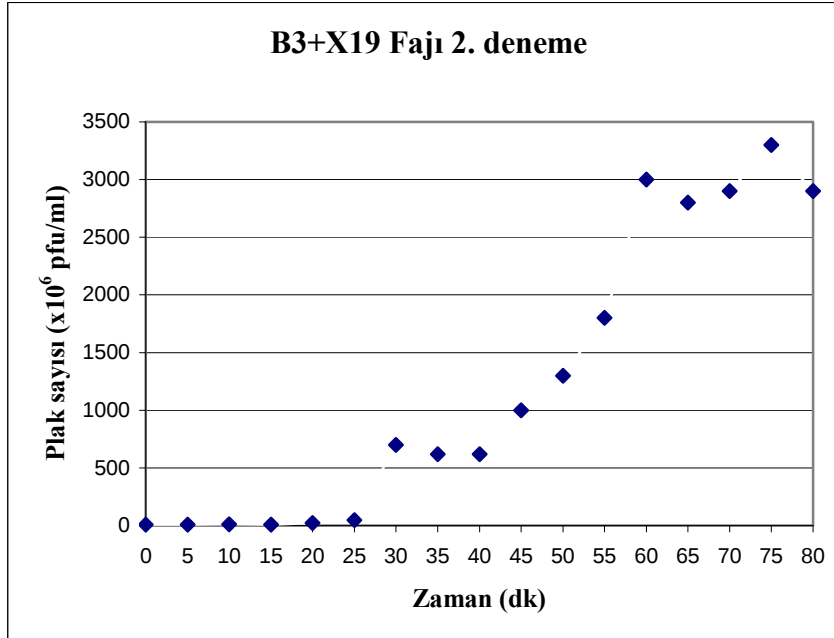
B3-X19 fajına ait tek aşamalı gelişme eğrileri Şekil 4.43, 4.44 ve 4.45'de verilmiştir. Bu fajın latent ve artış dönemi üç kez tekrarlanan denemelere göre sırasıyla 25, 25, 20 dk ve 35, 35, 35 dk olarak bulunmuştur. Ancak patlama büyüklüklerinin sırasıyla 401, 266 ve 143 faj partikülü olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca B3-X19 fajının latent dönem süresi spektrofotometrik olarak da belirlenmiş ve yine 20 dk olduğu saptanmıştır (Şekil 4.46). Patlama büyüklüğü 140 faj olarak saptanan Φ 231-X9'un da artış dönemi 35 dakika bulunmuşken, 35 dakikalık artış dönem süresinin hemen hemen aynı olduğu tespit edilmiş ve bu durum spektrofotometrik yöntemle de doğrulanmıştır (Şekil 4.47-4.48). Çiğ süttten izole edilen ve 2B3-A olarak kodlanan fajın latent dönem süresinin 15 dakika, artış döneminin ise diğer fajlar gibi 35 dakika ve patlama büyüklüğünün de 64 faj partikülü olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.49). Şekil 4.50'de de 231S-A1MÖ fajına ait tek aşamalı gelişme eğrisi verilmiştir. Latent dönem süresi 15 dk, artış dönemi 30 dk olan fajın patlama büyüklüğünün 264 faj partikülü olduğu tespit edilmiştir. 231S-A1MÖ fajının spektrofotometrik yöntemle de latent dönem süresi belirlenmeye

çalışılmışsa da çok sağlıklı bir eğri elde edilememiştir. Buna eğriye göre fajın latent döneminin 25 dk olduğu Şekil 4.51’de görülmektedir. Ancak Φ 709-X5 ve Φ 231S-A1MÖ’nin latent dönemlerinin tek aşamalı gelişme eğrilerinden hesaplanmasının doğru olacağı sırasıyla 20 ve 15 dk’lardan sonra plak sayısında görülen ani artıştan anlaşılmaktadır. Çalışılan bu fajlar arasında 620 faj partikülü ile en yüksek patlama büyüklüğüne sahip olan fajın 709-X5 olduğu saptanmıştır. Latent süresi ve artış dönemi ise diğerlerine oldukça benzer bulunmuştur (Şekil 4.52-4.53).

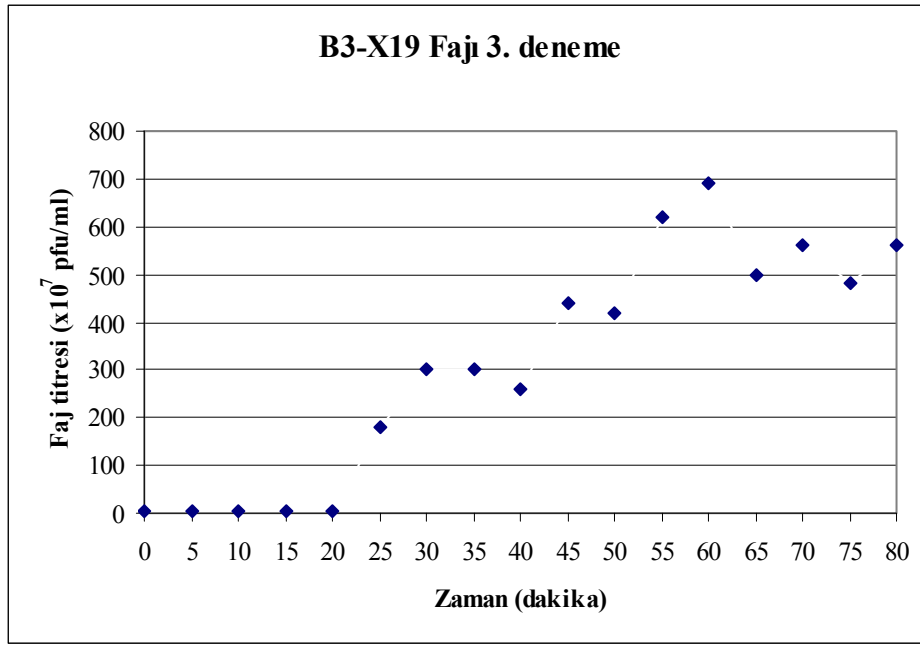
S. thermophilus fajlarının tek aşamalı gelişme eğrilerinin çıkarılması için 2 kez denemenin kurulması yeterli olmamıştır. B3-X19 fajında da görüldüğü gibi denemeler üç kez tekrarlanmıştır. Genellikle denemelerde latent ve artış dönem süreleri arasında belirgin farklar görülmezken patlama büyüklükleri dikkate değer biçimde artmış veya azalmıştır. Bazı denemelerde ise latent periyodun tespitine fırsat tanınmadan faj sayısının arttığı görülmüştür. Faj parametrelerinin belirlenmesi o türe özgül fajların genel karakterizasyonuna ilişkin önemli bilgiler ortaya koysa da, standart koşullarda yürütülen çalışmaların özellikle patlama büyüklüğü verileri bakımından çok da tutarlı sonuçlara götürmemesi ve de restriksiyon kesim şablonlarına göre ayrı gruplardan seçilen fajların bu parametrelerle farklılıklarının ortaya konabilmesinin neredeyse olanaksız olması sebebiyle *S. thermophilus* suşlarına nazaran daha yavaş gelişen ve daha kompleks besiyeri içeriğine ihtiyaç duyan *Lb. bulgaricus* fajlarından sadece biri bu fajları temsilen seçilmiş ve tek aşamalı gelişme eğrisi çıkarılmıştır (Şekil 4.55). Y4-X12 kodlu bu fajın latent dönem süresi 85 dakika, patlama büyüklüğü ise 140 faj partikülü olarak belirlenmiştir.



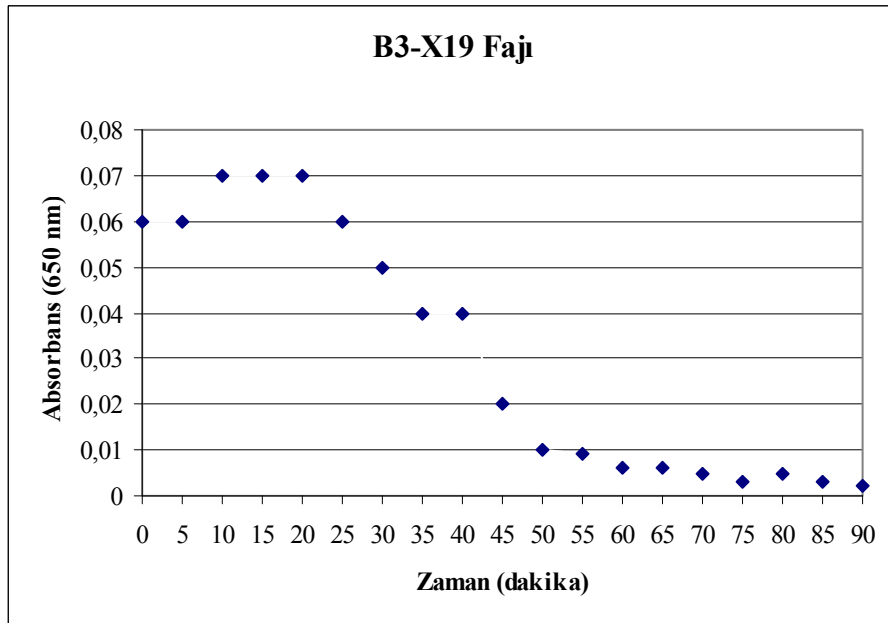
Şekil 4.43 B3-X19 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi (1. deneme)



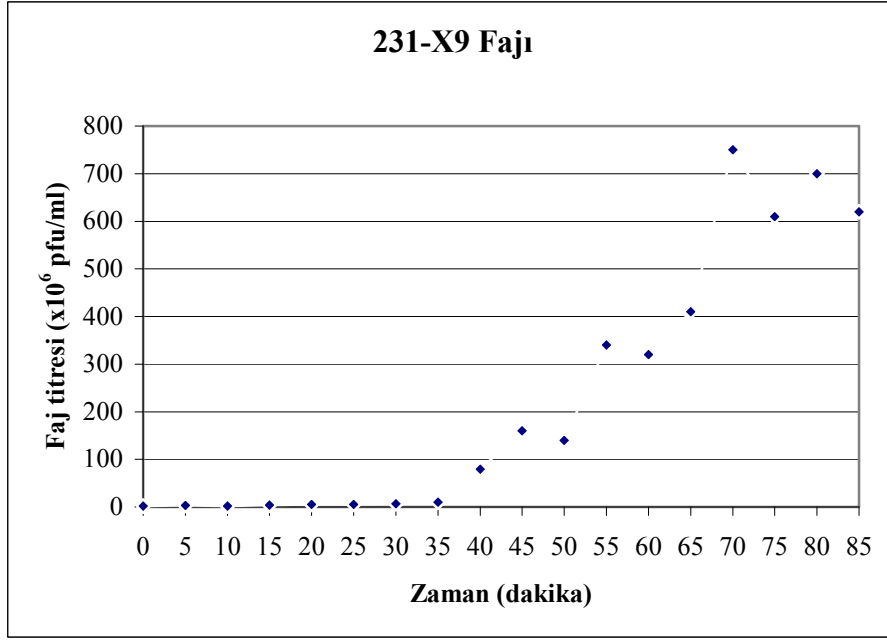
Şekil 4.44 B3-X19 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi (2. deneme)



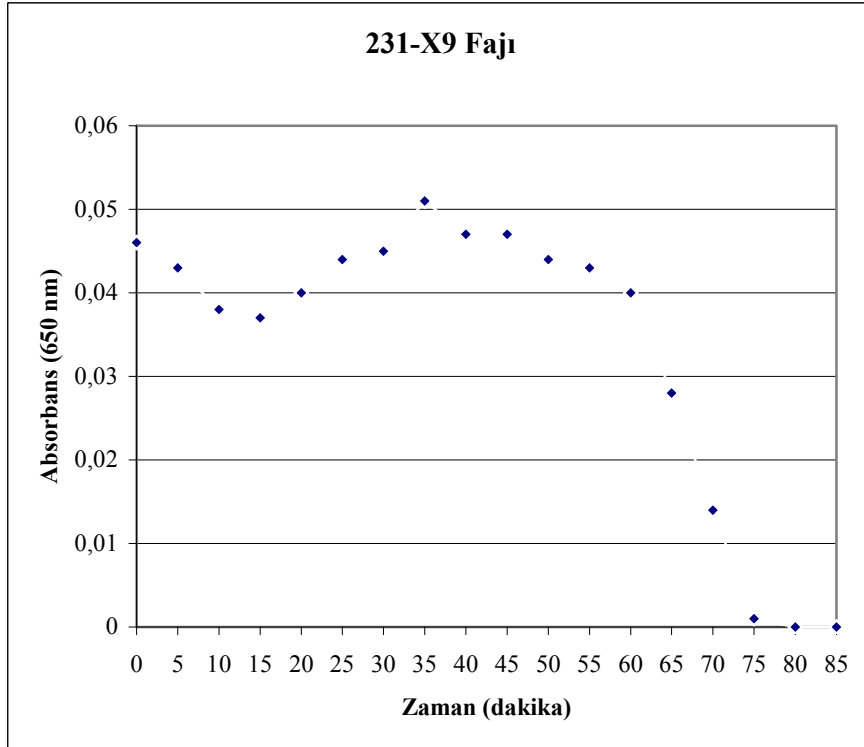
Şekil 4.45 B3-X19 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi (3. deneme)



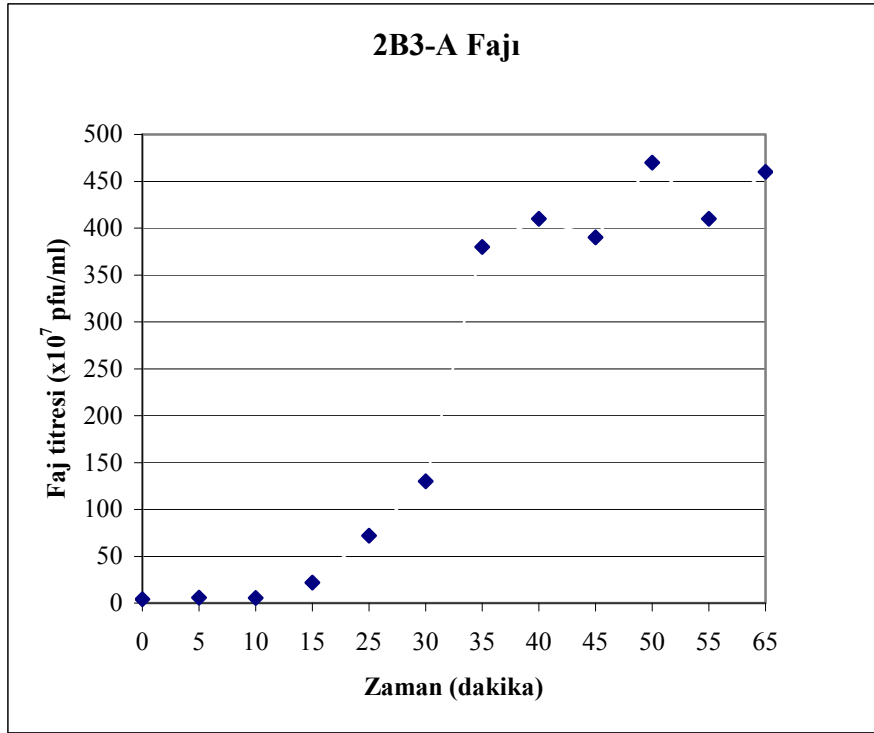
Şekil 4.46 B3-X19 fajının latent dönem süresi



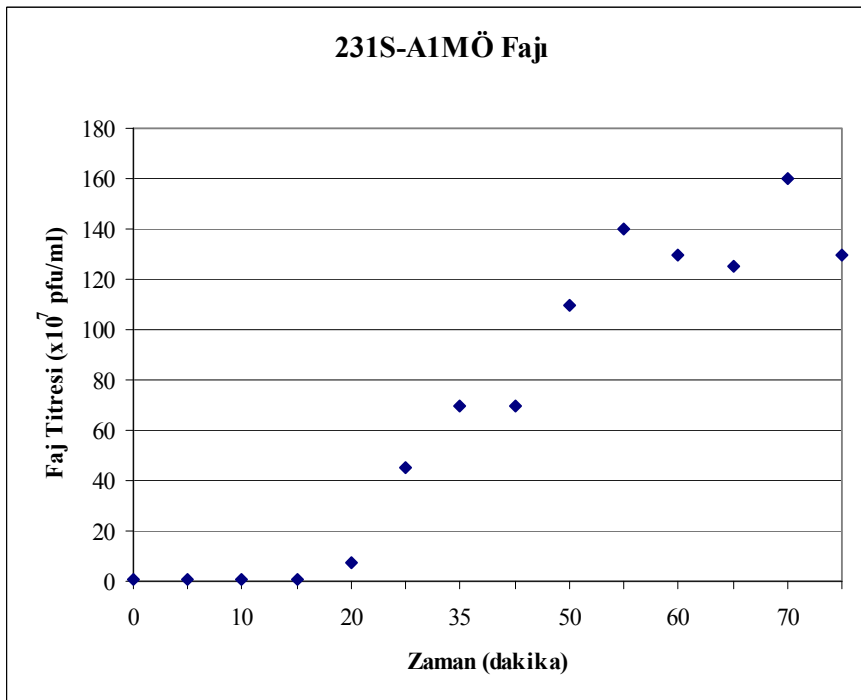
Şekil 4.47 231-X9 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi



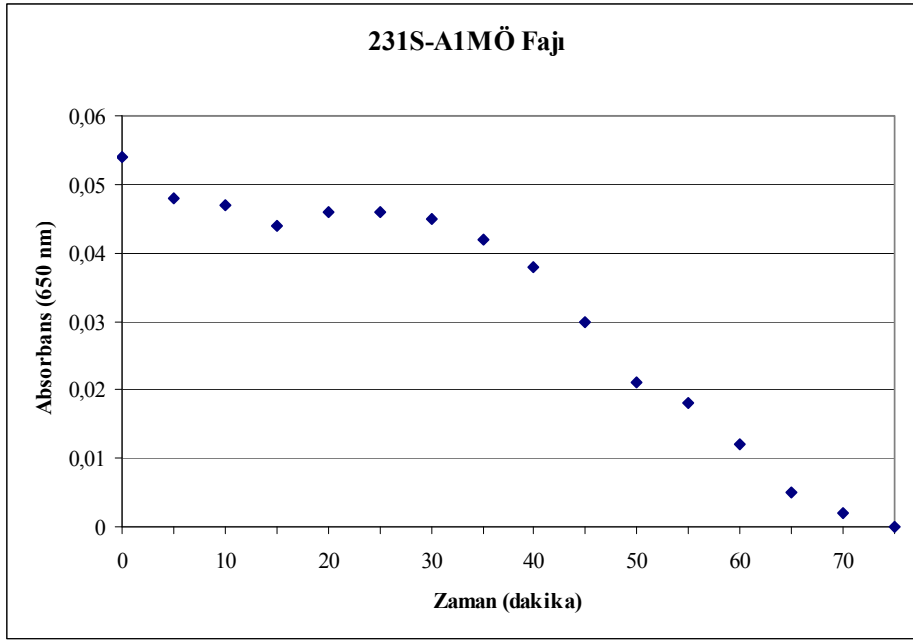
Şekil 4.48 231-X9 fajının latent dönem süresi



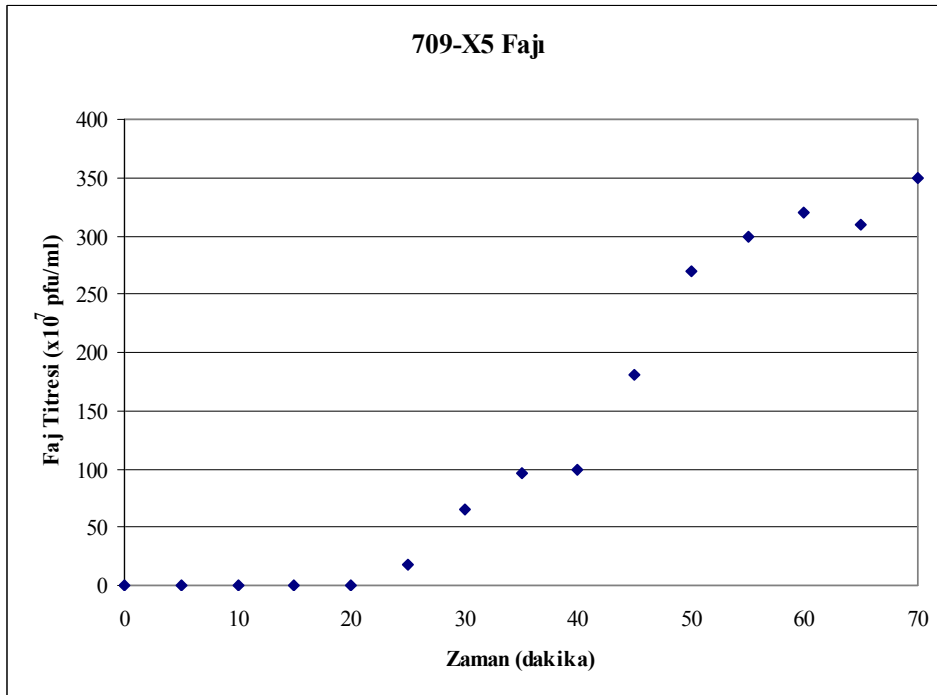
Şekil 4.49 2B3-A fajının tek aşamalı gelişme eğrisi



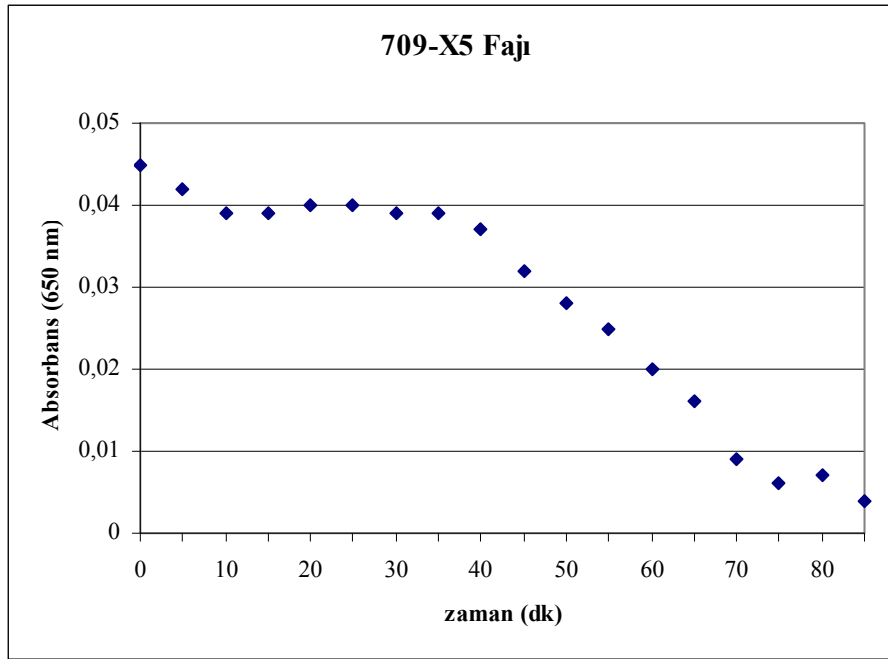
Şekil 4.50 231S-A1MÖ fajının tek aşamalı gelişme eğrisi



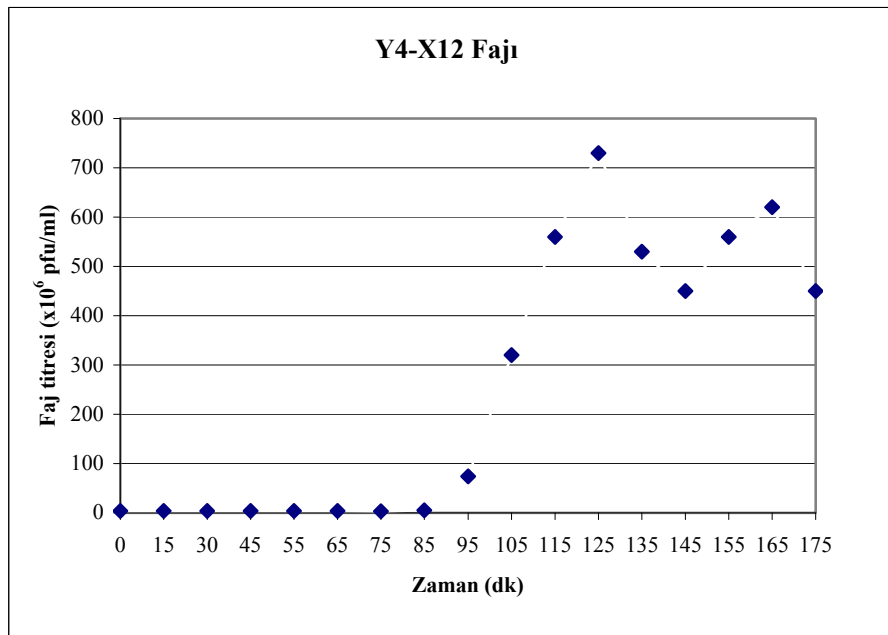
Şekil 4.51 231S-A1MÖ fajının latent dönem süresi



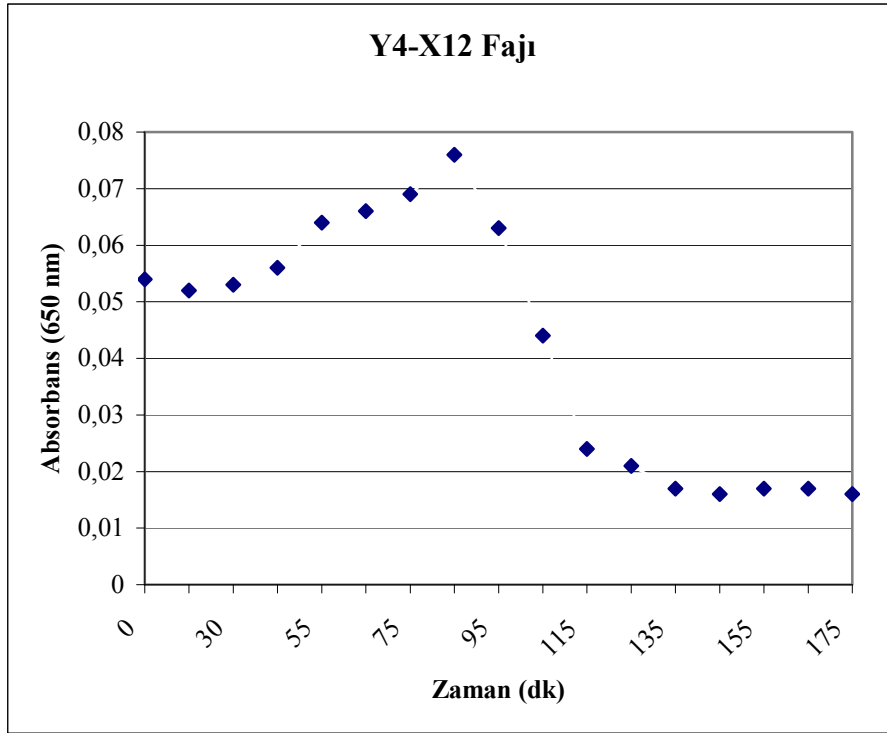
Şekil 4.52 709-X5 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi



Şekil 4.53 709-X5 fajının latent dönem süresi



Şekil 4.54 *Lb. bulgaricus* Y4-X12 fajının tek aşamalı gelişme eğrisi



Şekil 4.55 *Lb. bulgaricus* Y4-X12 fajının latent dönem süresi

4.3.3 Faj plak etkinlikleri (EOP), % adsorbsiyon oranları ve plak morfolojisi

Tek aşamalı gelişme eğrileri çıkarılan fajların, plak etkinlikleri, homolog ve heterolog konakçılarına adsorbe olma oranları hesaplanmış, oluşturdukları plakların morfolojisi tespit edilmiştir.

Fajların heterolog konakçılarında verdikleri titrenin, homolog konakçısında verdiği titreye oranlanması ile EOP değerleri hesaplanmıştır. *S. thermophilus* fajlarından 709-X5 ve 231-X9, heterolog konakçılarında birinde küçük diğeri ise büyük EOP değeri vermiştir. Φ231S-A1MÖ, ΦB3-X19 ve Φ2B3-A'nın ise her iki heterolog konakçıda kendi homolog konakçısından daha düşük titre verdiği için düşük EOP değerine sahip oldukları görülmüştür. Elde edilen değerler Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Adsorbsiyon oranlarının tespiti için, MOİ değeri 0.001 olacak şekilde faj, konakçısı ile karıştırılmıştır. Adsorbsiyonun gerçekleşebileceği sürenin dolumundan sonra, faj-bakteri karışımı santrifüj edilmiş ve süpernatantta bulunan adsorbe olmayan faj titresi saptanmıştır. Titre, hangi faj ile çalışılıyorsa o fajın homolog konakçısında belirlenmiştir. Çizelge 4.6'dan da görüldüğü üzere fajlar, hemen hemen aynı yüzdelerle hem homolog hem de heterolog konakçılara adsorbe olmuştur. B3, 709 ve 231 kodlu fajların tüm konakçılarda aynı plak morfolojisine sahip olduğu, plak çaplarının da 1-1.5 mm arasında değiştiği görülmüştür. *Lb. bulgaricus* Y4-X12 fajı ise, konakçı bakterinin petri plağında az veya çok üremesine bağlı olarak değişken plak çapı ve morfolojisi vermiştir.

Çizelge 4.5 *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül fajların plak etkinlikleri (EOP)

Faj Kodu	Konakçı Suş	Titre (pfu/ml)	EOP
Φ709-X5	709*	2.6×10^9	1
	231	2.7×10^9	1.03
	B3	2×10^9	0.76
Φ231-X9	709	2×10^8	1.6
	231*	1.2×10^8	1
	B3	3×10^7	0.25
Φ231S-A1MÖ	709	1.5×10^9	0.38
	231*	3.9×10^9	1
	B3	1×10^9	0.25
Φ2B3-A	709	2.5×10^8	0.83
	231	1.9×10^8	0.63
	B3*	3×10^8	1
ΦB3-X19	709	3.2×10^8	0.32
	231	3.1×10^8	0.31
	B3*	1×10^9	1
ΦY4L-X12	Y4Lb*	4×10^6	1
	231Lb	2×10^6	0.5
	V1Lb	1.1×10^6	0.28
	V2Lb	7.5×10^6	1.88
	<i>Lb. bulgaricus</i> ATCC 11842	9.5×10^6	2.38

*: fajın homolog konakçısı

Çizelge 4.6 *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül fajların homolog ve heterolog konakçılara adsorbe olma oranları

Faj Kodu	Başlagıç Faj Titresi	Konakçı	Adsorbe Olmayan Faj Titresi	% Adsorbsiyon
Φ709-X5	1x10 ⁶	709*	1.9x10 ⁴	98.1
		231	6x10 ³	99.4
		B3	2x10 ³	99.8
Φ231-X9	1.2x10 ⁶	709	6x10 ³	99.4
		231*	4x10 ³	99.6
		B3	2x10 ⁴	98
Φ231S-A1MÖ	1.7x10 ⁶	709	2.3x10 ⁴	97.7
		231*	2x10 ³	99.8
		B3	9x10 ³	99.1
Φ2B3-A	3x10 ⁶	709	2x10 ⁴	98
		231	2x10 ⁴	98
		B3*	6x10 ³	99.4
ΦB3-X19	1x10 ⁶	709	6x10 ³	99.4
		231	3x10 ³	99.7
		B3*	1x10 ³	99.9
ΦY4L-X12	4x10 ⁶	Y4L*	6.3x10 ³	99.8
		231L	6x10 ³	99.8
		V1L	1.9x10 ³	99.9
		V2L	3.6x10 ³	99.9
		<i>Lb. bulgaricus</i> ATCC 11842	1.6x10 ³	99.9

*: fajların homolog konakçısı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* Fajlarının Konakçı Dizgeleri, Restriksiyon Endonükleaz Analizleri, Protein Profilleri ve Faj Replikasyon Parametreleri Esas Alınarak Sınıflandırılması

5.1.1 Fajların konakçı özgüllükleri

Homolog konakçıları *S. thermophilus* B3, *Lb. bulgaricus* 231, V1 ve V2 olan tüm sırasıyla *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* fajları, biri starter kültür (St 20.1), diğerleri pastörize süt izolatu olan toplam 44 adet *S. thermophilus* suşu ile karşılaştırılmış, suşların tamamının bu fajlara dirençli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Başka çalışmalarda da aynı durumla karşılaşmıştır. Araştırmacılar 6 adet ticari ve 30 adet yerel *S. thermophilus* suşunu, homolog konakçıları 231, 709 ve B3 kodlu ticari *S. thermophilus* fajlar ile karşılaştırmışlar, suşların, fajlara duyarlılık göstermediğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte bu fajların, izole edildikleri 231, 709 ve B3 starter kültürleri üzerinde neredeyse eşit düzeyde titre verdikleri tespit edilmiştir (Tunail vd. 2002, Kaleli *et al.* 2004). Başka bir çalışmada ise, bu tez çalışmasında da kullanılmış olan 44 adet *S. thermophilus* suşu üzerinde, Tunail vd. tarafından oluşturulan faj koleksiyonundan alınan 709 ve 231 *S. thermophilus* ve Y4 *Lb. bulgaricus* fajlarının etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Suşların, *S. thermophilus* fajlarının tamamına direnç gösterirken; *Lb. bulgaricus* fajlarından Φ Y4-X5, Φ Y4-X6, Φ Y4-X7 ve Φ Y4-X8'in 447 kodlu *S. thermophilus* suşunu lize ettiği tespit edilmiştir (Kahraman 2006).

Suarez vd. (2002) de, Tunail vd. gibi ticari kültürler ile izole ettikleri 22 adet doğal *S. thermophilus* litik fajını, hem ticari kültürlerle hem de doğal suşlarla karşılaştırmıştır. Araştırmacılar fajların, ticari kültürlerin çoğunu lize ettiğini, 16 adet doğal suş arasından ise sadece 5'ine etkili olabildiklerini belirtmişlerdir.

Çalışmalarda kullanılan fajlar genellikle starter kültürler ile izole edilebilmektedir (Suarez *et al.* 2002, Tunail vd. 2002, Quiberoni *et al.* 2003a). Bu da starter kullanımına bağlı faj probleminin ortaya çıkmasını doğrulamaktadır. Acar (2002) tarafından çiğ sütlerden faj izolasyonu için 231, 709 ve B3 suşları kullanılmış, 2 adet fajın izolasyonu sadece B3 suşu ile başarılmış ancak daha sonra fajların, 231 ve 709 suşlarına da etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca A. Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü 67 nolu proje kapsamında çiğ sütlerden 5 adet, bulk kültürlerden 17 adet faj yine konakçı olarak starter kültürlerin kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca A. Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü'nde gerçekleştirilen kaşar peyniri üretimi ile ilgili bir projede (Gürsel vd. 2004), 72°C'de 1 dakika pastörize olmuş süttten, 231 *S. thermophilus* suşu ile bir faj izole edilmiştir. İzolasyon amacıyla 231 kodlu suş yanında B3 ve 709 kodlu suşlar da kullanılmıştır. Daha sonra bu fajın 709 ve B3 heterolog konakçılarında yüksek titre vererek gelişebildiği ve adsorbsiyon oranının da oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Luria ve Darnell (1967), genel olarak virüslerin, 32°C gibi çok düşük veya 70°C gibi yüksek sıcaklıklarda da inaktive olabileceklerini belirtmektedir. Ancak Binetti ve Reinhammer (2000), çalıştıkları *S. thermophilus* fajlarından bazılarının ancak 90°C'de 5 dk. tutulmaları durumunda inaktif olduklarını, Sozzi ve Maret tarafından çalışılan *S. thermophilus* fajlarından bir adedinin de, bir saat boyunca 65°C'ye tabi tutulması sonucu bile aktivitesini kaybetmediği, 72°C'de bir saat veya 90°C'de yirmi saniye tutulması durumunda ancak inaktif olduğunu saptamışlardır. Bu durumda 231S-A1MÖ olarak kodlanan fajın bu pastörizasyon normu ile aktif kalabilmesi ve fajların orijinlerinin çiğ sütler olduğunun düşünülmesi çok doğaldır.

Şu an Türkiye'de starter kültür üretimi yapabilen bir işletme olmadığından, süt fermentasyonlarda kullanılan kültürler diğer ülkelerden alınmaktadır. Firmalar yerel faj popülasyonunu bilmeden süt işletmelerine rotasyon programı önermektedirler. Örneğin, Wiesby (Almanya) firması tarafından üretilen ve birbirine alternatif olabilecek 231 ve 709 kodlu kültürlerin rotasyona sokulması mümkün değildir. Ayrıca Chr. Hansen Lab. (Danimarka) tarafından üretilen B3 kodlu *S. thermophilus* suşu da fajlara dirençli bir suş değildir (Tunail vd. 2002).

Bununla birlikte faj ve konakçı ekolojisinin bilinmesi veya bilinmemesi tartışmalıdır. Çünkü, İsviçre, Almanya ve Fransa'dan izole ettiği fajları yine aynı ülkelere izole ettiği *S. thermophilus* suşları ile karşılaştıran Krusch vd. (1987)'nin, fajların izole edildikleri ülkelere göre konakçı dizgesi vermesi ile Larbi vd. (1990)'un çok farklı coğrafyalardan topladığı fajların tamamının aynı konakçılara litik etkide bulması gibi birbiriyle çelişen araştırma bulguları vardır.

Bu tez kapsamında ayrıca Bölüm 4.1'de anlatıldığı üzere *Lb. bulgaricus* suşları, *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* fajları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.3-4.4). Lb 12 kodlu starter kültür dışında suşların tamamının *Lb. bulgaricus* fajlarına duyarlı olduğu görülmüştür. *S. thermophilus* fajları ile karşılaştırılmaları durumunda ise Lb 1313-1, Lb 1433-1 ve Lb 1312-1 suşlarının sırasıyla, ΦB3-X12 ve ΦB3-X13, ΦB3-X15, ΦB3-X19 türler arası heterolog fajlara dirençli olmadıkları anlaşılmıştır.

Çiğ sütlerden izole edilmiş *Lb. bulgaricus* suşlarını, aynı türün endüstriyel suşlarına özgül fajlarla karşılaştıran Tunail vd. (2002), 2001 ve 2004 kodlu suşlar hariç diğer suşların fajların tamamına, 3702 kodlu suşın ise fajlardan bir kısmına duyarlılık gösterdiklerini saptamışlardır. Aynı şekilde Kahraman (2006), tüm *Lb. bulgaricus* suşlarının, Y4 *Lb. bulgaricus* fajlarının tamamına duyarlı olduğunu; Özyurt (2005) da çalıştığı *Lb. bulgaricus* suşlarının, yine aynı türe özgül ancak çiğ sütlerden izole edilmiş fajlara direnç gösteremediğini tespit etmişlerdir.

Bu çalışmaların sonuçlarından, *Lb. bulgaricus* suşları söz konusu olduğunda kendi türüne ait fajlara dirençlilik gösteremedikleri, *S. thermophilus* fajlarına karşı da az da olsa duyarlı oldukları anlaşılmaktadır. Bu nedenle *Lb. bulgaricus* suşlarının Özyurt (2005) tarafından da belirtildiği gibi diğer özellikleri uygun olsa da starter kültür olarak kullanılmaları mümkün değildir. Ayrıca *Lb. bulgaricus* suşlarından Lb 1313-1, Lb 1433-1 ve Lb 1312-1'nin sırasıyla, St ΦX12-B3 ve St ΦX13-B3, St ΦX15-B3, St ΦX19-B3 fajlarına duyarlı olmaları, cinsler arası heterolog konakçıların varlığını teyit etmiştir. Çünkü, aynı duruma Özyurt (2005) ve Kahraman (2006)'nın çalışmalarında da rastlanmıştır. Bu çalışmalar dışında *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşlarının,

bunların fajlarına heterolog konakçı görevi yapabildiğine rastlanmamıştır. Ancak *E. coli* P2 temperent fajının, *E. coli* ve *Shigella* türleri dışında *Serratia* suşlarında da gelişebildiği; *Pastörella* fajlarının da *Salmonella* ve *Shigella* bakterilerini lize edebildiği rapor edilmiştir (Kahraman 2006). Bu da cinsler arasında heterolog konakçı olan türlerin var olabileceğini göstermektedir.

Konakçı özgüllüğü, süt işletmelerinde rotasyon programlarının belirlenebilmesi için çok önemli olmasına rağmen, faj taksonomisi açısından hiç bir önemi yoktur (Brüssow *et al.* 1994a). Bunun nedeni aynı konakçı spektrumuna sahip fajların farklı restriksiyon profili vermeleri veya farklı konakçılara etkili olanların aynı kesim profiline sahip olmasıdır. Ayrıca Prevots vd. (1989), genom üzerinde fajların konakçı özgüllüğünden sorumlu bölgenin çok küçük olması nedeniyle sınıflama için bir kriter olamayacağını belirtmiştir. Quiberoni vd. (2003a)'de çalıştıkları fajlardan aynı konakçıları lizize uğratan fakat üç farklı restriksiyon profili verenlerin, konakçı özgüllüklerini belirleyen gen modüllerinin korunduğunu; aynı restriksiyon profilini gösteren ama farklı konakçı dizgelerine sahip fajların genomlarında ise, nokta mutasyonların olduğunu düşünmüştür.

5.1.2 *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* fajlarının protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri

5.1.2.1 *Streptococcus thermophilus* fajları

B3, 231 ve 709 *S. thermophilus* suşuna özgül 26 adet fajın protein profilleri çıkarılmıştır. Fajların SDS-PAGE ile elde edilen jelleri incelendiğinde genel olarak hepsinin aynı büyüklükte protein bantlarına sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.1-4.2-4.3). Profillerdeki farklılıkların, bir iki protein bantının varlığına/yokluğuna veya yoğunluklarına bağlı olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda fajlar 8 gruba ayrılmıştır. Konakçılara göre ayırım yapılmak istenirse 709 fajlarının tamamı bir grup oluşturmaktadır. 231 ve B3 fajları ise kendi içlerinde 6'şar gruba ayrılmaktadır. ΦB3-

X13 ve ΦB3-X15’de profillerinde çok yoğun olarak göze çarpan 63.5 kDa’luk protein bantının altında ve üstünde diğerlerinde olmayan bantların varlığına rastlanmıştır. B3-X17, B3-X18 ve 231-X23 fajlarında diğer profillerde bulunan 52.1 kDa’luk protein bantının olmadığı tespit edilmiştir. İzolasyon kaynakları çiğ ve pastörize süt olan sırasıyla 1B3-A ve 2B3-A fajları ile 231S-A1MÖ fajında birbirlerine ve diğer fajlara çok benzer protein profilleri verdikleri dikkati çekmiştir.

Hepsinde ortak olan bantların yoğunluklarının birbirine çok yakın olması *Lb. bulgaricus* fajlarında olduğu gibi 2 veya 3 minör protein bantının tespitini zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte fajların majör yapısal protein büyüklüklerinin 30.6 ve 27.3 kDa olduğu açık bir şekilde görülmektedir.

Kivi vd. (1987), çalıştıkları 9 adet *S. thermophilus* fajının 63, 49, 42 ve 11 kDa büyüklüğünde majör, 145, 120, 87, 70 ve 30 kDa büyüklüğünde minör proteinlere sahip olduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları ile karşılaştırıldığında majör proteinlerin uyum sağlamadığı açıktır. Bununla birlikte 26 fajın hemen hemen hepsinde bulunan 149, 112, 82, 75 ve 65 kDa’luk protein bantlarının benzer olduğu görülmüştür. Ayrıca 9 adet fajın tamamında minör protein olan 30 kDa’luk bantın, bu tez kapsamında incelen fajlarda majör protein olması dikkat çekmiştir.

12 adet *S. thermophilus* fajını, gösterdikleri DNA homoloji miktarına göre üçe ayıran Neve vd., 3 farklı protein profili ile karşılaşmışlardır. İlk grupta 30.9 ve 24 kDa, ikinci grupta 30.9 ve 26.3 kDa, sonuncu grupta ise 39.8, 24 ve 14.8 kDa büyüklüğünde majör proteinlerin bulunduğu görülmüştür (Neve *et al.* 1989). Prevots vd. (1989) ise 26 adet *S. thermophilus* fajından üçünde 40 ve 23 kDa, geriye kalanlarda 29 ve 23 kDa büyüklüğünde iki adet yapısal proteine rastladıklarını belirtmişlerdir. Bu bulgular doğrultusunda 30.6 ve 27.3 kDa büyüklüğündeki iki majör proteine sahip B3, 231 ve 709 *S. thermophilus* fajlarının, Neve vd. tarafından oluşturulan ikinci gruba veya Prevots vd.’nin ikinci grubuna dahil edilebileceği mümkün gözükmemektedir.

A ve B grubu olarak ikiye ayrılan 9 adet *S. thermophilus* fajının gruplar içinde de farklı protein profili gösterdikleri belirtilmiştir. A grubunda bulunan fajların, 32 ve 27 kDa veya 31 ve 27.5 kDa; B grubunda bulunan fajların ise 43, 25 ve 15 kDa veya 43 ve 23.5 kDa büyüklüğünde majör proteinlere sahip oldukları tespit edilmiştir (Benbadis *et al.* 1990). Le Marrec vd. (1997), genomları cos-tipi olan fajlarda 32 ve 26 kDa, pac-tipi olan fajlarda ise 45, 25 ve 13 kDa'luk proteinlerin olduğunu saptamışlardır. Tremblay ve Moineau (1999) tarafından çalışılan *S. thermophilus* DT1 fajında da 32 ve 26 kDa'luk yapısal proteinlerin varlığından bahsedilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, ölçümlerde yapılabilecek küçük hataların dikkate alınmaması durumunda, 231, B3 ve 709 fajlarının literatüre geçmiş fajlarla çok benzer olduğu ortaya çıkmaktadır.

Tunail vd. (2002)'de bu çalışmada kullanılan fajların protein profillerini çıkarmışlardır. İki çalışma arasındaki fark herşeyden önce faj saflaştırma yönteminden kaynaklanmaktadır. Bu tez çalışmasında Sambrook vd. (1989) tarafından önerilen, bakteriden ve besiyerinden kaynaklanan safsızlıkları mümkün olduğu kadar uzaklaştırmayı amaçlayan yöntem kullanılmıştır. Diğer çalışmada ise fajlar, filtreden geçirildikten sonra santrifüj edilerek çöktürülmüştür. İki çalışmada elde edilen protein büyüklükleri karşılaştırıldığında çok fazla ve önemli olmasa da farklılıklar olduğu görülmektedir. Bunlar içinde en önemlisi, bantların yoğunluğuna bağlı olarak majör protein bantlarından birinin tespit edilemeyişi.

Bu tez çalışmasında moleküler düzeyde karakterizasyonuna ve sınıflandırılmasına çalışılan; konakçıları endüstriyel *S. thermophilus* suşları olan (B3, 709, 231) ve çeşitli süt ürünlerinden izole edilen 26 adet *S. thermophilus* fajının, aynı morfolojik yapıya sahip oldukları bilinmektedir (Acar 2002). Ayrıca, sadece *S. thermophilus* fajlarının değil, neredeyse tüm laktik fajların aynı morfotipe sahip oldukları artık netlik kazanmıştır (Mata *et al.* 1986, Cluzel *et al.* 1987, Benbadis *et al.* 1990, Fayard *et al.* 1993, Brüssow *et al.* 1994a, Auad *et al.* 1997, Auad *et al.* 1999, Acar 2002, Quiberoni *et al.* 2003a). Diğer taraftan, farklı litik spektrumlarına göre gruplandırılan fajların, uygulamada starterlerin rotasyona sokulmalarında büyük önem taşımalarına karşın, faj

taksonomisi açısından bir anlam taşımadığı sıkça belirtilmiştir (Prevots *et al.* 1989, Brüssow *et al.* 1994a, Brüssow and Bruttin 1995, Le Marrec *et al.* 1997, Quiberoni *et al.* 2003a). Bu nedenle faj sınıflandırmasında en fazla protein profillerine, restriksiyon endonükleaz kesim analizlerine ve kesim fragmentlerinin veya faj genomlarının hibridizasyonuna güvenilmektedir (Benbadis *et al.* 1990, Brüssow *et al.* 1994a, Brüssow *et al.* 1994b). Bununla beraber, fajların litik spektrumu ile enzim kesim şablonlarına göre yapılan gruplandırmalar arasındaki ilişkiler; protein profilleri, DNA fragment profilleri veya homolojiye göre yapılabilecek faj sınıflandırmaları üzerinde ısrarla çalışılmaktadır (Neve *et al.* 1989, Prevots *et al.* 1989, Larbi *et al.* 1990, Le Marrec *et al.* 1997, Quiberoni *et al.* 2003a).

Bu tez kapsamına alınan yerel *S. thermophilus* fajları aynı morfolojik yapıya ve çok benzer litik spektruma sahip oldukları gibi, fajların belirlenen protein profilleri de ne yazık ki Kivi vd. (1987) tarafından yapılan bir araştırmada olduğu gibi fajların gruplandırılmasında bir kriter oluşturamamıştır. O nedenle, bu fajların sınıflandırılmasında, son yıllarda oldukça kabul gören restriksiyon endonükleaz enzim kesim şablonlarından yararlanılmıştır.

Bu tez kapsamında 26 *S. thermophilus* faj DNA'sının kesimi için, dokuz adet restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılmıştır. Restriksiyon enzim kesimlerinde ne kadar çok enzim kullanılırsa, enzim sayısı kadar farklı gruplandırma çıkacağı ve herbir enzim için çok sayıda oluşacak grupların temel sınıflandırmayı zorlaştıracığı düşünülebilir. Ancak burada, ayrı enzimler ile elde edilen enzim kesim şablonlarına göre oluşturulan gruplar karşılaştırılarak, en fazla sayıda gruplandırmaya olanak tanıyan enzim kesim şablonları esas alınmış ve diğer enzim kesim şablonlarının destekleyici, pekiştirici veya tekrar ayırdedici gruplarından yararlanılmıştır. Herşeyden önce, kesimde kullanılan *Bam*HI enziminin genomlar üzerinde tanıma dizisinin olmadığı tespit edildiğinden ve farklı firma ürünü olan iki *Pst*I enzimi ile yapılan kesimlerden sonuç alınamadığından, bu enzimler değerlendirmeye dahil edilememiştir. *Hind*III enzimi de kısmi kesimler gerçekleştirdiğinden, bazı sonuçlar gösterse de başarısız olmuştur. Fajlar; *Eco*RI ile kesim şablonlarına göre 5 grupta, *Eco*RV ile 9

grupta, *PvuII* ile 4 grupta, *ClaI* ile 4 grupta ve *HhaI* ile de 8 grupta toplanmışlardır. Enzimlerden *EcoRV* kesim şablonları en fazla gruplandırmaya olanak sağladığından, faj sınıflandırmasında bu enzimin kesimleri esas alınmıştır. Buna göre; 8 adedi tek fajların yer aldığı, biri ise geri kalanların toplandığı toplam 9 grup oluşmuştur. Φ B3-X12, diğer 17 fajla birlikte ikinci grupta yer alırken; Φ B3-X11 birinci grubu; Φ B3-X15 üçüncü grubu; Φ B3-X19 dördüncü grubu; Φ B3-X20 beşinci grubu; Φ 231-X6 altıncı grubu; Φ 231-X23 yedinci grubu; Φ 231S-A1MÖ sekizinci grubu ve Φ 709-X1 de dokuzuncu grubu oluşturmuştur. Şekil 4.10, *EcoRV* kesimi sonucu oluşan fragmentlere göre *S. thermophilus* fajlarının filogenetik uzaklıklarını göstermektedir. *EcoRV* kesim şablonları, *EcoRI* kesim şablonlarına oldukça benzer bulunmuştur. *EcoRV* kesimlerinde olduğu gibi Φ 231S-A1MÖ, Φ B3-X17, Φ 231-X23 fajları kendi başlarına birer grup oluşturmuştur. Dördüncü grubu oluşturan Φ B3-X20 ile Φ 231-X6 *EcoRV* kesimleri ile ayrı birer faj olarak tanımlanmış, *EcoRV* ayrıca *EcoRI* ile 21 fajın toplandığı aynı fragment profiline sahip beşinci gruptan Φ 709-X1, Φ B3-X11 ve Φ B3-X12 'nin farklı fragment profilleriyle ayırdedilmesini sağlamıştır.

Faj DNA'larının *PvuII* enzimi ile kesim şablonları; Φ 709-X1, Φ B3-X15 ve Φ B3-X19 fajlarının ayrı gruplarda olduğunu teyit etmesi bakımından yapılan sınıflamaya destek vermiştir. Her ne kadar *HindIII* kesimleri kısmi kesimler olarak gerçekleşmişse de, yine de Φ B3-X19, Φ B3-X20 ve Φ 231S-A1MÖ fajlarının farklı fragment profilleriyle diğerlerinden ayırt edilir olması önemli bulunmuştur.

ClaI ile ilk defa 18 fajın toplu olarak bulunduğu ikinci gruptan Φ B3-X14'ün, *HindIII* ise Φ 709-X5 ile Φ 231-X4'ün farklılıklarını ortaya koyması açısından dikkate değer bulunmuştur. *HhaI* kesim sonuçları; Φ 709-X1, Φ B3-X20 ve Φ 231-X6'nın sadece kendilerinin bulunduğu ayrı birer grup oluşturduklarını pekiştirmiştir. Bu enzim ayrıca ilk defa Φ 231-X7 ve Φ 231-X8'in çoğunluğun bulunduğu ikinci gruptan ayırdedilmesine vesile olmuştur.

Sonuç olarak, *EcoRV* enzim kesim şablonlarına göre elde bulunan 26 *S. thermophilus* fajının dokuz grupta toplandığı tespit edilmiştir. Ancak, birinci grupta toplanan 18 fajın da özdeş olmayabilecekleri gözardı edilmemelidir. *ClaI*, *HindIII* ve *HhaI* enzim kesim şablonlarına göre yapılan gruplandırmalardan, özellikle 5 faj DNA genomunun ikinci grupta yer alan faj genomlarından farklı olabileceği, kesin olmasa da ihtimal dahilindedir.

Neve vd. (1989), çalıştıkları 12 adet *S. thermophilus* fajını gösterdikleri homolojiye ve yapısal proteinlerine göre 3 gruba ayırmıştır. 8 farklı konakçı dizgesine sahip olan fajların genomları *HindIII* enzimi ile reaksiyona sokulmuş, elde edilen fragment profillerinin genel olarak konakçı dizgeleri ile korelasyon gösterdiği açıklanmıştır. Bununla beraber, aynı konakçı dizgesine sahip fajların farklı profil verdiği veya farklı konakçıları lize eden fajların benzer kesim profiline sahip oldukları da bildirilmiştir. Bununla birlikte restriksiyon analizleri baz alınarak bir sınıflama yapılamamıştır. Bu tez çalışmasından elde edilen verilerin Neve vd. ile karşılaştırılması mümkün değildir. Çünkü çalışılan fajların daha önce de bahsedildiği gibi çok benzer konakçı dizgeleri bulunmaktadır.

EcoRI ve *EcoRV* restriksiyon endonükleaz enzimi ile yapılan kesimler sonucu 26 adet *S. thermophilus* fajından 23 adedinin her iki enzimle de aynı fragment profilini verdikleri belirtilmiştir (Prevots *et al.* 1989). Fajlardan bazılarının *EcoRV* kesimi ile oluşan fragmentlerinin, Φ B3-X12'ye ait fragmentlerden bazılarına benzer bulunması üzerine her iki fajın *EcoRI* kesimleri karşılaştırılmış, fakat birbirinden farklı profiller olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada *EcoRI* kesimi sonucu oluşan 5 farklı profilin, *EcoRV* ile kesim yapılması durumunda 9'a çıktığı tespit edilmiştir. Böylece bir grup içinde toplanan fajların aslında birbirlerinden farklı olduğu görülebilmektedir.

Larbi ve arkadaşları, beş farklı ülkeden izole edilen dokuz adet *S. thermophilus* faj genomunun restriksiyon haritalarını çıkarmak için *AvaI*, *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII*, *SacI*, *Sall*, *PvuII*, *Xho I*, *KpnI* ve *SmaI* enzimlerini kullanmışlardır. Ancak enzimlerden *KpnI* ve *SmaI*'nin genomlar üzerinde tanıma dizilerinin olmadığı görülmüştür. Fajların

*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III ve *Pvu*II enzim kesimlerinden, iki farklı kesim şablonu elde edilmiş ve fajlar 2 gruba ayrılmıştır (Larbi *et al.* 1990). *Bam*HI enzimi bu tez kapsamında da kullanılmış ancak genomlar üzerinde kesim bölge veya bölgelerinin olmadığı saptanmıştır. Ayrıca hem *Hind*III hem de *Pvu*II enzimleri ile 4'er farklı fragment dizilimi elde edilmiştir.

Başka bir çalışmada 7 adet *S. thermophilus* faj DNA'sı, *Hind*III, *Pvu*II ve *Hha*I restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiştir. Hibridizasyon çalışmaları sonucunda çalıştıkları fajları tek bir homoloji grubuna dahil eden araştırmacılar, farklı konakçı dizgesine sahip iki adet fajın (Φ 11 ve Φ 57), *Hind*III enzimi ile kesim şablonlarının aynı; *Pvu*II enzimi ile oluşan kesim şablonlarının farklı olduğunu belirtmişlerdir. (Benbadis *et al.* 1990). Bu çalışmada kullanılan fajlar ise aynı konakçı dizgesine sahip olmalarına rağmen farklı enzimlerle farklı fragment dizilimleri göstermişlerdir.

Brüssow vd. (1994a), 40 adedi yoğurttan 41 adedi peynir fermentasyonundan 81 adet *S. thermophilus* fajı izole etmişlerdir. Bu fajların, konakçı dizgeleri, serolojik özellikleri ve DNA homolojileri incelenmiştir. *Pvu*II ve *Eco*RI enzimleri kullanılarak yoğurt kaynaklı 40 faj izolatından 11 ayrı restriksiyon şablonu; 41 peynir kaynaklı fajdan ise 35 farklı kesim profili alınmıştır. Yoğurt kaynaklı faj genomlarında tespit edilen ortak fragmentler olmuştur. Buna göre bir fajın, 2 serotipten veya 2 litik gruptan hangisine ait olduğu bulunabilmiştir. Fakat aynı şey peynir kaynaklı fajlar için geçerli olamamıştır. Bu nedenle peynir üretiminden izole edilmiş fajların enzim kesim profillerine göre sınıflandırılmaları mümkün olmamıştır. Bu nedenle araştırmacılar kesim şablonlarının belirlenmesinin faj taksonomisi açısından önem taşımadığı kanaatine varmışlar ve bu kadar fazla faj çeşitliliğinin, restriksiyon şablonu tanımlanmış bir faj genomunda oluşabilecek küçük eklemeler ve ayrılmalardan (rekombinasyonlardan) kaynaklandığını belirtmişlerdir (Brüssow *et al.* 1994a). Dolayısı ile bundan sonra gerçekleştirilen çalışmalarda asıl amaç restriksiyon profilleri değil bu profillerdeki hibridizasyon oranlarının tespiti olmuştur. Nitekim, Brüssow ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada Sfi18 faj DNA'sına ait 2.2 kb'lık *Eco*RI fragmentin, SFi21, SFi11 ve BaS19 faj DNA'larında da bulunan 2.2 kb'lık *Eco*RI fragmentleri ile homoloji

gösterdiği tespit edilmiştir. SFi11 ve SFi18 faj DNA'larında bulunan 2.2 kb'lık *EcoRI* fragmentlerinin dizi analizleri yapılmış ve 2207 nükleotit pozisyonundan sadece üçünde farklılık olduğu dolayısıyla kodlanan sadece üç adet aminoasidin değiştiği görülmüştür. SFi11 faj DNA'sından alınan 2.2 kb'lık fragmentin, koleksiyonda bulunan 41 adet faj ile homoloji gösterip göstermediğine bakılmış ve fajlardan % 59'unun, hibridizasyon sinyali verdiği görülmüştür. Aynı şekilde, ΦSFi21 ve ΦBaS19 DNA'sında bulunan 2.2 kb'lık fragmentin de dizi analizi yapılmış ve SFi18 faj DNA'sının 2.2 kb'lık fragmentiyle karşılaştırıldığında; iki farklı nükleotit bulunduğu, sekansın % 99.8 korunduğu görülmüştür (Brüssow *et al.* 1994b). Bu çalışmada kullanılan 26 adet faj arasında farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildiklerinde de oluşan fragmentlerden ortak olanları bulunmaktadır. Brüssow ve diğer araştırmacıların yaptığı çalışmalar doğrultusunda, eldeki fajların genomlarında nokta mutasyonların olup olmadığının anlaşılması ve taksonomik olarak cins ve tür olarak tanımlanan fajlara göre durumlarının ne olduğunun anlaşılabilmesi için oluşan fragmentlerin faj fonksiyonlarından hangisinden sorumlu olduğunun bulunması, homoloji miktarının tespit edilmesi gerekmektedir. Ancak bu sonuçlar doğrultusunda fajların gerçekten sınıflandırılabilceği anlaşılmaktadır. Bununla beraber bu çalışmada gelinen nokta, koleksiyondaki yerel fajlarımızın hiç değilse özdeş olmadıklarını göstermesi ve aynı litik spektruma sahip oldukları halde genomik farklılıklarının ortaya konmuş olması açısından önemlidir.

Faj genomlarındaki çeşitliliğin nedenini oluşturan belirli genlerin ve DNA fragmentlerinin var olup olmadığını araştıran Le Marrec vd. (1997), 30 adet faj DNA'sını, *EcoRV*, *HindIII* ve *PvuII* enzimleri ile kesime almış ve 11 adet farklı restriksiyon profili elde etmiştir. Araştırmacılar, "pac" tipi olan O1205 fajının üç majör ve "cos" tipi olan 7201 fajının ise iki majör yapısal proteininden birini kodlayan genler ile *EcoRV* fragmentleri arasında hibridizasyon olup olmadığını araştırmışlardır. O1205 fajına ait genler ile tüm "pac" tipi fajlar arasında homoloji saptanmışken, "cos" tipi fajlarla hibridizasyon sağlanamamıştır. Tüm faj genomlarının, DNA homolojisi göstermesine karşın; farklı proteinleri kodlayan belirli DNA bölgeleri arasında homoloji olmadığı saptanmıştır. Homoloji sonuçları doğrultusunda araştırmacılar

çalıştıkları fajları, DNA' larının cos veya pac tipi paketleme tipine sahip olmasına bağlı olarak ikiye ayırmışlardır.

EcoRV kesimi sonucu elde edilen profillerde benzerliğin yüksek olması Le Marrec vd. (1997)'ne bu fajların aynı atadan geldiklerini düşündürmüştür. Bazı profillerde 9 fragmentten 7'sinin, bazılarında da 13 adet fragmentten, 12'sinin eşit büyüklükte olduğu gözlenmiştir. Aynı mantıkla bu tez çalışmasında elde edilen profillerin karşılaştırılması durumunda *EcoRV* kesiminde 11 fragmentten 9 adedinin, *PvuII* kesiminde ise 7 fragmentten 6 adedinin benzer olduğu görülmektedir.

Bir başka araştırmada, 11 adet *S. thermophilus* faj DNA'sı *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri ile kesime sokulmuştur. Hibridizasyon çalışmaları sonucunda da çalışılan fajlar arasında, DNA homolojisinin olduğu tespit edilmiş ve bu fajların genetik açıdan birbiriyle yakın olduğu belirtilmiştir (Quiberoni *et al.* 2003a).

Fajların genom büyüklükleri, elektron mikroskopunda büyüklüğü bilinen bir faj ile karşılaştırılarak tespit edilebilmektedir (Benbadis *et al.* 1990). Ancak araştırmacıların çoğu restriksiyon enzimleri ile kesim sonrası oluşan fragmentlerin büyüklüklerini toplayarak faj genomlarının molekül ağırlıklarını hesaplamayı tercih etmişlerdir. Bugüne kadar çalışılan *S. thermophilus* fajlarının genom büyüklüklerinin 31 ile 45 kb arasında değiştiği görülmektedir (Benbadis *et al.* 1990, Larbi *et al.* 1990, Brüssow *et al.* 1994a, Brüssow and Bruttin 1995, Prevots *et al.* 1989, Le Marrec *et al.* 1997, Quiberoni *et al.* 2003a). Bu tez kapsamında kullanılan fajların genom büyüklükleri ise *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII* ve *ClaI* enzimleri ile oluşan fragmentleri toplanarak hesaplanmış ve yaklaşık 41-45 kb olarak bulunmuştur.

Tükel vd. (2003), bu tez çalışması kapsamında da kullanılmış olan *S. thermophilus* B3, 709, 231 ve *Lb. bulgaricus* Y4, V1, V2 ve 231 suşlarına özgül fajları sadece *EcoRI* enzimi ile muamele ederek restriksiyon profillerini çıkarmıştır. Bu çalışmada herşeyden önce *EcoRI* kesimi sonucunda *S. thermophilus* fajlarının 5 farklı fragment dizilimine sahip olduğu ve her birinde 7 adet fragment olduğu tespit edilmiştir. Diğer çalışmada

ise 2 veya 4 fragment oluşumundan bahsedilmektedir. Ayrıca tespit ettikleri en büyük fragmentin büyüklüğünün 21.2 ile 27.6 kb arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Oysa bu çalışmada faj genomlarının tamamının yaklaşık 18 ve 15 kb büyüklüğünde fragmentlere sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca bu tez çalışmasında çok net bir şekilde farklı profillere sahip olduğu tespit edilen fajların (Şekil 4.8) diğer çalışmada aynı gruplarda yer aldıkları görülmüştür. Oluşan fragmentlerden bazılarının benzer olduğu saptanmıştır. Φ231-X3'e ait 4.8 kb ve Φ231-X6'ya ait 4.6 kb'lık fragmentler her iki çalışmada da karşımıza çıkmaktadır.

Araştırmacılar, *EcoRI* enzimi ile oluşan fragment büyüklüklerini toplayarak faj genomlarının molekül ağırlıklarının 25.8-47.3 kb arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise aynı fajların genom büyüklüklerinin 41-45 kb olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç diğer enzim kesimlerinden oluşan fragment toplamları tarafından da desteklenmiştir.

Elde edilen bu veriler doğrultusunda *S. thermophilus* suşlarına özgül 26 adet fajın hem protein profilleri hem de restriksiyon endonükleaz kesim şablonları dikkate alınarak ortak bir sınıflandırılmaya gidilmeye çalışılmıştır. B3, 231 ve 709 *S. thermophilus* fajları, farklı restriksiyon enzimleri ile farklı fragment dizilimleri gösterebilirler de, sadece majör proteinleri dikkate alındığında bunun mümkün olamayacağı anlaşılmıştır. Çünkü bu fajların tamamı 30.6 ve 27.3 kDa büyüklüğünde iki adet majör proteine sahiptir. Bununla birlikte fajlar, 112 kDa'luk ilk yoğun bantlarından sonra gelen 104, 103, 97 ile 94.4 ve 52.1 kDa'luk protein bantlarının varlığı veya yokluğuna göre 8 gruba ayrılmışlardır. Bu grupların restriksiyon kesim sonuçları ile karşılaştırılması durumunda; hemen hemen her enzim kesiminde farklı fragment dizilimi veren ΦB3-X19'un protein profilinin de diğerlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte B3-X19 fajı gibi her enzim kesiminde farklı kesim profili veren Φ231S-A1MÖ'nün, 231-X6, 231-X7 ve tüm 709 fajları ile aynı protein şablonuna sahip olduğu görülmüştür. Aynı şekilde *EcoRV* restriksiyon enzim kesimi sonucu ayrı gruplarda bulunan 231-X23 ve B3-X18 fajlarının, aynı protein profiline sahip olduğu saptanmıştır. Bu durumun aksine *EcoRV* kesimi ile 18 fajdan oluşan grup, 7 farklı

protein şablonu vermiştir. Fajlar arasında farklı kesim dizgesine sahip bir fajın aynı zamanda farklı protein profili göstermesi, bu iki kriter arasındaki ilişkinin yakalanabileceğini düşündürmüştür. Ancak bu konuda kesin bir şey söyleyebilmek için faj genom fargmentlerinin birbirleriyle homoloji gösterip göstermediğinin belirlenmesi gerekmektedir. Böyle düşünülmesinin nedeni daha önce yapılmış olan çalışmalarda birbirleriyle homoloji gösteren fajların, birbirlerine benzer iki veya üç majör proteine sahip olduklarının belirtilmesidir (Neve *et al.* 1989, Benbadis *et al.* 1990, Brüssow *et al.* 1994a, Le Marrec *et al.* 1997). Bununla birlikte Kivi vd. (1987), çalıştıkları 9 adet *S. thermophilus* fajında birbiriyle aynı 4 adet majör protein varlığından bahsederken, Brüssow (2001), süt endüstrisinde kullanılan suşlara özgül fajları pac- veya cos-tipi paketlenme mekanizmasına sahip olmalarına göre ikiye ayırmış ve bu fajların sırasıyla 2 ve 1 adet kapsid proteini içerdiklerini belirtmiştir. Tüm bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, fajların genomik yapılarının daha detaylı incelenmesinin gerekliliği daha iyi anlaşılmaktadır. Ayrıca fajların konakçı dizgelerinin moleküler düzeyde belirleyici olmadığı Prevots vd. (1989), bu çalışma sonuçları ile de tekrar doğrulanmıştır. Çünkü fajların tamamının farklı protein profili veya kesim şablonu gösterecekleri de aynı konakçı dizgesine sahip oldukları belirlenmiştir.

5. 1. 2. 2 *Lactobacillus bulgaricus* fajları

Lb. bulgaricus Y4, V1 ve V2 suşları ile çiğ süt ve çeşitli süt ürünlerinden izole edilen toplam 24 adet fajın sahip oldukları yapısal proteinler belirlenmiştir. Y4 fajlarının 100.8, 65 ve 50 kDa'luk, V1 ve V2 fajlarının ise 101.07, 64.2 ve 49.5 kDa büyüklüğünde minör proteinlere sahip oldukları saptanmıştır. Ancak bu farklılıklar sadece ölçümlerden kaynaklanmıştır ve minör proteinlerinin özdeş olduğu düşünülmüştür. Aynı durum majör proteinler içinde geçerlidir. Y4 fajları için 29.6, 29.2 ve 26.2 kDa olarak bulunan değerler, V1 ve V2 fajlarında 30.17, 29.9 ve 27.2 kDa bulunmuştur. Fajların dahil oldukları gruplar ve sahip oldukları minör ve majör proteinler aşağıdaki gibidir.

ΦY4-X1, ΦY4-X6	ΦY4-X2, ΦY4- X10, ΦV1-X19, ΦV2-X21, ΦV2-X22, ΦV2-X26 ΦV2-X27	ΦY4-X3 ΦY4-X4	ΦY4-X5, ΦY4-X8, ΦY4-X9, ΦY4-X12, ΦV2-X23	ΦV2-X24, ΦV2-X25, ΦV2-X28
100.8	100.8	100.8	100.8	100.8
50	65	50	65	65
29.6	50	29.2	50	50
26.2	29.6	26.2	29.2	29.6
	29.2		26.2	26.2
	26.2			

1986 yılında Mata ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile başlayan araştırmalarda; *Lb. bulgaricus* ve *Lb. lactis* suşlarına özgül bir çok faj, protein kompozisyonları, restriksiyon kesim profilleri, DNA–DNA hibridizasyon ve serolojik test sonuçlarına göre sınıflandırılmıştır (Mata *et al.* 1986, Trautwetter *et al.* 1986, Lahbib-Mansais *et al.* 1988, Sechaud *et al.* 1988, Lahbib-Mansais *et al.* 1992, Auad *et al.* 1999).

Lb. bulgaricus lizogenik suşlarından izole edilen mv1 ve mv4 temperent fajlarının 34 ve 18 kDa, *Lb. lactis* LL-H suşuna özgül LL-H fajının ise 34 ve 19 kDa büyüklüğünde iki adet majör proteine sahip olduğu bildirilmiştir. Fajlardan sadece birinin (Φ52), 19 kDa’luk tek bir majör bantı bulunmaktadır. Bunlardan ayrı bir grup olarak karşımıza çıkan ve üç fajdan oluşan grupta ise majör proteinlerin 31 ve 23 kDa büyüklüğünde olduğu görülmüştür. Bu tez kapsamında çalışılan fajların bu gruplardan sadece 3. gruba benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca protein profillerinde görülen minör proteinler de karşılaştırılmış ancak benzerlik bulunamamıştır.

Chow vd. (1988) tarafından yapılan başka bir çalışmada, bu araştırmalardan farklı olarak daha küçük bantların (19.5 ve 12.2 kDa) majör proteinler olarak karşımıza çıktığı görülmüştür

Tunail vd. (2002)’de *S. thermophilus* fajları gibi *Lb. bulgaricus* fajlarının da protein profillerini çıkarmışlardır. En büyük yoğun bantı 120 kDa olarak bulan araştırmacıların bu tez çalışmasında silik olarak karşımıza çıkan proteinlerin büyüklüklerinden farklı

bantları yoğun bant olarak verdikleri görülmüştür. Bu iki çalışma arasındaki farkın faj saflaştırma yönteminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Açıktır ki, fajların konakçılarından kalmış olan proteinler, profilleri tamamen değiştirmiştir. Bununla birlikte küçük ama yoğun olan bantlardan bir adedinin (~28 kDa) bu çalışma ile uyum sağladığı görülmüştür.

S. thermophilus fajları gibi, konakçıları endüstriyel V1, V2, Y4 *Lb. bulgaricus* olan, çiğ süt dahil çeşitli süt ürünlerinden izole edilen 24 adet *Lb. bulgaricus* fajı (Çizelge 3.2) da, 6 restriksiyon enziminin (*EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII*, *HindIII*, *HhaI*, *BamHI*) kesim şablonlarına göre sınıflandırılmaya çalışılmıştır. Zamanla bu 24 faj, Φ 231-X17, Φ V2-X29 ve ATCC 11842 konakçısı ile çiğ süttten izole edilmiş olan Φ LbA-Z'nin katılımıyla 27'ye yükselmiştir. Ne var ki, faj DNA'larının kesiminde 6 endonükleaz kullanılmasına karşın, çok da verimli sonuçlar alınamamıştır. Öncelikle *BamHI*, aynı *S. thermophilus* faj DNA'larında olduğu gibi *Lb. bulgaricus* faj DNA'larını da, tanıma dizilerinin bulunmaması nedeniyle kesememiştir. *EcoRV* enzimi ile büyük olasılıkla DNA miktarına ve DNA-enzim etkileşimine bağlı olarak kesim sonucu alınamamıştır. Diğer çalışmalarda bu enzimle kesime hiç rastlanmadığından *EcoRV* ile sonuç alınamamasına bir açıklama getirmek oldukça güçtür. Bununla birlikte *EcoRI*, *PvuII*, *HindIII* ve *HhaI* enzimleri ile elde edilen kesim şablonlarından fajlar bir miktar da olsa gruplandırılabilmiştir. *EcoRI* ile kesim sonucunda, 6 fajın üç fragmentlik kesim şablonu ile bir grupta, diğer 20 fajın ise dört fragmentlik bir şablon ile diğer bir grupta yer aldığı saptanmıştır. *PvuII* enzim kesim sonuçları ise, *EcoRI* sonuçlarını doğrular nitelikte bulunmuştur. Φ Y4-X2, Φ Y4-X4, Φ Y4-X5, Φ Y4-X6, Φ Y4-X8 ve Φ Y4-X10; kesilemedikleri için diğer fajlardan ayrılmış, diğer fajlar ise *EcoRI* kesimlerinde olduğu gibi aynı profili vermişlerdir. Yalnız Φ 231-X17 ile kesim sonucu alınamamıştır. *HindIII* ile yine Φ Y4-X2, Φ Y4-X4, Φ Y4-X5, Φ Y4-X6, Φ Y4-X8 ve Φ Y4-X10 kesilemediği gibi, bunlara ek olarak V2-X21, V2-X22, V2-X23, V2-X26 ve V2L-A fajları da eklenmiştir. Kesim şablonlarının sonuçları; DNA 'sı kesilemeyenlerin de bir grup oluşturmasıyla diğer fajların 7 farklı kesim şablonu göstererek sonuçta tüm fajların sekiz grupta toplanmasını sağlamıştır. Bu en fazla grup sayısını ortaya çıkaran kesim olduğundan, fajların şimdilik bu şekilde sınıflandırılmasının uygun olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte fajları 4 grupta toplayan; birinci grupta Φ Y4-X1'i;

ikinci grupta $\Phi Y4-X3$, $\Phi Y4-X9$ ve $\Phi Y4-X12$ 'yi; üçüncü grupta yine yalnızca tek bir fajı ($\Phi V1-X19$) ve dördüncü grupta da çiğ süt izolatlarını ($\Phi Y4L-A$, $\Phi Y4L-Z$, $\Phi V2L-A$, $\Phi V2L-Z$ ve $\Phi V1L-A$) içeren *HhaI* kesimini de faj sınıflamasında bir başka başlangıç olarak dikkate almak gerekebilir. Ancak şurası da açıktır ki, fragment homolojisi çalışılmadan veya faj DNA'larının direkt dizi analizlerine girilmeden yapılan bu sınıflandırmaların, başlangıç olarak kabul edilebileceği gözönüne alınmalıdır. Ancak, aynı morfoloji gösteren ve litik spektrumları da çok benzer olan, ayrıca protein profillerine göre de sınıflandırılması pek mümkün olmayan termofilik fajların restriksiyon analizleri sonucu bu kadar bile ayrılabilir olmaları, onların birbiriyle aynı olmadıklarının bir göstergesidir. Fabrikalarda kültür rotasyon sistemlerinde identik olmayan fajlara karşı direncin test edilmesi önemli olduğundan, koleksiyon fajlarının bu kadar ayrımı bile uygulamada anlam ifade etmektedir. Ayrıca, bu sonuçlardan yola çıkılarak dizi analizlerinin ve homoloji çalışmalarının sürdürülmesi de mümkün olabilecektir.

EcoRI kesimi sonucu iki profil elde edilmiş ve bu profili temsil eden $Y4-X4$ ve $Y4-X24$ fajlarının genom büyüklükleri sırasıyla 22 ve 35.6 kb bulunmuştur. *PvuII* restriksiyon enziminin bütün genomlar üzerinde aynı büyüklükte fragment oluşturacak şekilde kesim yaptığı, genom büyüklükleri 29 kb bulunan fajların birbirinden ayıramadığı görülmüştür. *PvuII* enzimi, *EcoRI* enziminin $X4$ fajı ile temsil edilen grubunda ($\Phi Y4-X2$, $\Phi Y4-X4$, $\Phi Y4-X5$, $\Phi Y4-X6$, $\Phi Y4-X8$ ve $\Phi Y4-X10$) kesim yapmamıştır. *HindIII* ve *HhaI* enzimleri ile kesim yapılmaya çalışıldığında yine aynı durumla karşılaşmıştır. Buradan bu 6 fajın bu enzimlerle tanımlanmasının mümkün olmadığı ortaya çıkmaktadır. Diğer fajlara gelince *HindIII* enzimi tarafından 7, *HhaI* enzimi tarafından seçilebildiği kadarıyla 4 gruba ayrılmışlardır. Hem *HindIII* enzimi hem de *HhaI* enzimi çiğ sütlerden izole edilen fajların ayrı bir grup olarak karşımıza çıkmasını sağlamıştır. *HindIII* enzimi ile kesimden elde edilen fragmentler toplandığında genomların büyüklüklerinin tamamının birbirine çok yakın ve 29-32 kb arasında olduğu ve *PvuII* ile elde edilen genom büyüklüğü ile uyum sağladığı görülmüştür. Burada tek sorun, *EcoRI* kesiminde $\Phi Y4-X24$ ile temsil edilen grubun genom büyüklüğünün çok büyük çıkmasıdır ki, bu durumun kısmi kesimlerden veya enzimlerin yıldız aktivitelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Lb. bulgaricus ve *Lb. lactis* suşlarına özgül, ikisi temperent olmak üzere toplam 16 adet fajın, *EcoRI* ve *PstI* enzimleri ile kesim profillerinin ve hibridizasyon oranlarının çıkarılması amacıyla yapılan bir çalışmada, fajların genom büyüklükleri 32 kb–37 kb arasında bulunmuştur. *EcoRI* ve *PstI* kesimi sonucunda; Φ mv1 ile Φ mv4, Φ P18 ile Φ P21 ve Φ P19 ile Φ P22 DNA'larının, birbiriyle aynı kesim profili verdiği, geriye kalan 10 adet fajın da her birinin kendine özgül fragment dizilimine sahip olduğu bildirilmiştir. Birbirine çok benzer restriksiyon profili ve % 100 homoloji gösteren mv1 ve mv4 temperent fajlarının DNA büyüklüklerinin arasında da sadece 1 kb'lık bir fark olduğu saptanmıştır. Farklı fragment profili veren c3, c5 ve lb4 faj DNA'larının ise diğer faj genomları ile hibrid molekül oluşturmadığı saptanmıştır (Mata *et al.* 1986). Bu tez çalışmasında ise çiğ süt izolatları dahil 24 adet *Lb. bulgaricus* Y4, V1 ve V2 fajının *EcoRI* ile kesim sonucunda sadece iki farklı profil verdiği görülmüştür (Şekil 4.20-4.21) İki farklı profilde bulunan fragment büyüklükleri toplanmış ve fajların genom büyüklükleri yaklaşık olarak 22 ve 35 kb bulunmuştur. *PstI* enzimi ise *S. thermophilus* faj genomlarının kesiminde sağlıklı sonuç vermediğinden kullanılmamıştır.

Başka bir araştırmada *Lb. lactis* LL23 suşuna özgül virulent LL-H faj genomunun restriksiyon profilinin ve haritasının çıkarılması amacıyla, *Sall*, *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *HindIII*, *PvuII*, *HpaI*, *SmaI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. *XhoI* ve *KpnI* endonükleazlar da denenmiş ancak genom üzerinde tanıma dizilerinin olmadığı anlaşılmıştır. Kesim sonucu oluşan fragment büyüklüklerinin toplamından LL-H genom büyüklüğünün 34 kb olduğu belirlenmiştir (Trautwetter *et al.* 1986, Sechaud *et al.* 1988).

Mata vd. tarafından oluşturulan ve karakterize edilen 16 adet *Lb. bulgaricus* ve *Lb. lactis* fajına yenileri eklenmiştir. Yeni izole edilen fajlar mv4 genomu dahil *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII* ve *SmaI* restriksiyon enzimleri ile kesime alınmışlardır. Temperent fajlardan ikisinin (Φ 37 ve Φ 38) her bir enzim için birbiriyle özdeş restriksiyon profili verdiği, 50 ve 51 kodlu faj DNA'larında ise *EcoRI*, *BamHI* ve *PstI* kesimleri sonucu oluşan fragmentlerden bazılarının aynı olduğu tespit edilmiştir. Diğer faj DNA'ları ise, ayrı ayrı kesim profili vermişlerdir. DNA hibridizasyon çalışmaları

sonucunda, mv4 fajı ile yeni litik fajlar arasında yaklaşık % 60-70, temperent fajlar arasında ise % 80 homoloji olduğu saptanmıştır. Bu araştırmaya ait bulgularının aksine, tez kapsamında çalışılan 24 faj, *EcoRI* ile sadece iki farklı profil vermiş ve *BamHI* enzimi ile ise kesilememiştir. Lahbib-Mansais vd. tarafından yapılan bu çalışmada genomların *EcoRI* ile oluşan fragmentleri tezdeki 2 kesim profili ile karşılaştırılmış ancak genomlar arasında uyum görülmemiştir (Lahbib-Mansais *et al.* 1988).

İsviçre tipi peynirin, peyniraltı suyundan izole edilen *Lb. bulgaricus* CH2 suşuna özgül ch2 kodlu fajın genom büyüklüğü, elektron mikroskobu kullanıldığında, 37 ± 1.6 kb; *EcoRI*, *PstI* ve *PvuII* restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu oluşan fragmentlerin büyüklükleri toplanmasıyla hesaplandığında ise 35 kb olarak hesaplanmıştır (Chow *et al.* 1988). Auad vd. (1999) da *Lb. bulgaricus* CRL539 suşundan izole edilen lb539 kodlu temperent fajının pac tipi DNA büyüklüğünün yaklaşık 35 kb olduğunu tespit etmişlerdir. Quiberoni ve arkadaşları ise *Lb. bulgaricus* YSD V, Ab₁, LB-lb3 suşlarına özgül sırasıyla BYM, YAB ve lb3 kodlu fajların, lineer çift sarmal DNA'larının 31-34 kb arasında olduğunu belirtmişlerdir (Quiberoni *et al.* 2004).

Tükel vd. (2003), bu çalışmada kullanılan *S. thermophilus* fajları gibi *Lb. bulgaricus* fajlarını da *EcoRI* enzimi ile kesime almışlardır. Araştırmacılar, *EcoRI* kesiminden elde ettikleri fragmentlerin toplamından genom büyüklüklerinin 21 ve 72.2 kb arasında olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada aynı fajlara ait genomlar, *EcoRI*, *PvuII* ve *HindIII* enzimleri ile kesime alınmış, *EcoRI* ve *PvuII* enzimlerinin kesim yaptığı büyük grubun hep aynı fajlardan oluştuğu bulunmuş, genom büyüklükleri de *PvuII* ve *HindIII* enzimleri ile doğrulanmıştır. $\Phi Y4-X2$, $\Phi Y4-X4$, $\Phi Y4-X5$, $\Phi Y4-X6$, $\Phi Y4-X8$ ve $\Phi Y4-X10$, 22 kb büyüklükteki genomlara sahipken, fajların geri kalanının genom büyüklüğü 29-32 kb civarında olduğu bulunmuştur. Buna göre bu çalışma sonuçları ile çelişen Tükel vd. (2003)'nin çok geniş sınırlar içinde saptadıkları genom büyüklükleri tartışılır hale gelmiştir. Araştırmacıların elde ettiği bulgular diğer verilerle uyum göstermediği gibi en önemlisi tekrarı olan buradaki sonuçlara da ters düşmektedir.

S. thermophilus fajları gibi *Lb. bulgaricus* fajları da sahip oldukları protein profilleri ve restriksiyon kesim şablonları birlikte düşünüldüğünde sınıflandırmanın mümkün olup olmayacağı araştırılmıştır, ancak kesim şablonlarına göre farklı gruplarda yer alan fajların birbiriyle özdeş protein profilleri vermesi nedeniyle başarılamamıştır. Fajlardan Y4 *Lb. bulgaricus* suşuna özgül Φ Y4-X2, Φ Y4-X4, Φ Y4-X5, Φ Y4-X6, Φ Y4-X8 ve Φ Y4-X10'a ait, kullanılan restriksiyon enzimlerinden (*EcoRI*, *PvuII*, *HindIII*, *HhaI*) hiçbirisi ile kesim şablonu elde edilememiştir. Bunlardan Y4-X6 fajının, *HindIII* ve *HhaI* kesimi ile diğer 18 fajdan ayrılan Y4-X1 ile aynı protein profili verdiği görülmüştür. Aynı şekilde Φ Y4-X4'ün, Φ Y4-X3 ile; Φ Y4-X5 ile Φ Y4-X8'in, Y4-X9, Y4-X12 ve V2-X23 fajı ile; Φ Y4-X2 ile Φ Y4-X10'un, Φ V2-X24, Φ V2-X25 ve Φ V2-X28 hariç geriye kalan fajların tamamı ile identik proteinlere sahip oldukları tespit edilmiştir. Bununla birlikte *HindIII* kesimi ile farklı profiller gösteren fajların bazılarının (Φ Y4-X1, Φ V1-X19, Φ Y4-X9) aynı zamanda birbirlerinden farklı protein şablonlarına sahip olmaları, fajların genom ve protein yapıları arasında bir ilişki kurulabileceğini düşündürmüştür. Ancak, Φ V1-X19 ile Φ V2-X27'nin, Φ Y4-X9 ile Φ Y4-X12'nin *HindIII* kesim şablonları birbirinden farklı olsa da aynı protein profiline sahip oldukları görülmüştür. Mata vd. (1986) tarafından yapılan bir çalışmada, *Lb. bulgaricus* ve *Lb. lactis* suşlarına özgül fajların bu çalışmada olduğu gibi aynı restriksiyon profili verselerde farklı majör protein bantlarına sahip olabildikleri belirtilmiştir. Protein profilleri, restriksiyon kesimleri ile paralellik göstermezken, birbirleriyle yüksek oranda hibridize olan genomların aynı protein bantlarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle Bölüm 5.1.2.1'de değinildiği gibi bu ilişkinin kurulabilmesi ve kesinlik kazanabilmesi için daha detaylı araştırmaların yapılması gerekmektedir. *S. thermophilus* fajları gibi, *Lb. bulgaricus* fajlarının da aynı konakçı dizgesine sahip olmalarından dolayı, litik spektrumun bu fajların sınıflandırılmasında belirleyici olmadığı ortaya çıkmaktadır.

5.1.3 Faj replikasyon parametreleri

5.1.3.1 Latent dönem süresinin ve patlama büyüklüğünün belirlenmesi (Tek aşamalı gelişme testi)

S. thermophilus suşlarına özgül Φ B3-X19, Φ 231-X9, Φ 2B3-A, Φ 231S-A1MÖ ile Φ 709-X5'in ve *Lb. bulgaricus* suşlarına özgül fajlardan Y4-X12'nin tek aşamalı gelişme eğrileri çıkarılarak, fajların latent ve artış dönem süreleri ile patlama büyüklükleri belirlenmiştir. Bu fajlar arasında özellikle B3-X19 ile 231S-A1MÖ, restriksiyon endonükleaz analizlerine göre hep diğerlerinden farklı ve tek başlarına grup oluşturmuşlardır. *Hind*III restriksiyon enzimi ile kesim sonucu ise Φ B3-X19, Φ 231-X9, Φ 709-X5 ve Φ 231S-A1MÖ'nin farklı gruplarda yer aldıkları tespit edilmiştir.

Bölüm 4.3.2'de B3-X19 fajına ait 3 adet tek aşamalı gelişme eğrisi görülmektedir (Şekil 4.43-4.44-4.45). Her denemede latent dönem süresi 25, artış dönemi süresi ise 35 dakika olarak bulunmuştur. Ancak patlama büyüklüğünün 143 ile 401 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Aslında patlama büyüklüğünün ve latent dönemin, belirli ve sabit koşullarda her bir faj türüne özgül olduğu, ancak kullanılan konakçıya, konakçının bölünme periyoduna, ortama ve sıcaklığa bağlı olarak değişiklik gösterebildiği belirtilmiştir (Ellis and Delbrück 1939). 3 ayrı günde B3-X19 fajına ait tek aşamalı gelişme eğrilerinin çıkarılması amacıyla kurulan denemelerde, 2 farklı inkübatörün kullanılması söz konusu olmuştur. Birisi yeni diğeri eski olan bu inkübatörlerin sıcaklıklarını koruyabilme özellikleri aynı olmadığından ve *S. thermophilus* fajları için 5 dakika arayla örnek alındığından, konakçıların sıcaklık değişiminden etkilendikleri düşünülebilir. Ayrıca aktif kültürler kullanılsa bile zaman zaman konakçıların üreme hızlarının değiştiği de görülmüştür. Denemelerin kontrollü koşullar altında gerçekleşmesi gerektiğini belirten Ellis ve Delbrück'ün, inkübasyon sıcaklıklarının 16.6°C, 25°C ve 37°C'ye ayarlanmış denemelerinde; patlama büyüklüğünde değişim olmazken, sıcaklık düşmesine bağlı olarak latent dönemin 30 dk.'dan 180 dk.'ya çıktığı tespit edilmiştir. Ellis ve Delbrück, *E. coli*'ye özgül fajın tek aşamalı gelişme

denemelerini üç farklı günde tekrarlamaları sonucunda, plak sayılarında farklılıklar görölse de, hep aynı eğriyi elde etmişlerdir. Bunun da ancak tüm preparatların aynı koşullar altında hazırlanması ve saklanması durumunda mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Yaptıkları tüm çalışmalar sonucunda, latent dönem süresinin; sabit koşullar altında elde edilen minimum değeriyle bu değerin iki katı arasında değişiklik gösterebildiğini tespit etmişlerdir (Ellis and Delbrück 1939).

ΦB3-X19'un minimum patlama büyüklüğü değeri 143 olarak kabul edilirse, Ellis ve Delbrück tarafından belirtildiği gibi farklı denemelerde bu büyüklüğün 266 bulunması doğal olmaktadır. Aynı durum minimum değer eğer 266 kabul edilirse 401 bulunması da kabul edilebilir olacaktır. Ancak çalışmamızda patlama büyüklükleri arasında 4 kat fark bulunmaktadır. Bu farklılığın varlığı doğal olarak oluşan plak sayısından kaynaklanmaktadır. Ellis ve Delbrück (1939) ile Luria ve Darnell (1967), plak büyüklüğünün agar konsantrasyonuna bağlı olduğunu, agarın fazla olması durumunda plak büyüklüğünün azaldığını belirtmişlerdir. Dolayısıyla plak varlığının görünür olması da besiyerindeki agar miktarı ile ilişkilidir. Çalışılan yüzeyin düz olmaması ilk tabaka agarın Petri plağında eşit miktarda dağılımına engel olmaktadır. Daha sonra ikinci agar tabakasının dökülmesiyle Petri'de bir tarafta daha fazla besiyeri dolayısıyla agar birikimi söz konusudur ki bu bazen oluşan plakların görülmesine bile engel olmaktadır. Bu durum hemen hemen her deneme ve çalışılan her Petri kutusu için geçerlidir. Dolayısıyla bir faja ait her tek aşamalı gelişme eğrisi denemesinde aynı patlama büyüklüğü değerinin bulunamamasının bir diğer nedeninin de agar miktarı olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 5.1'de görüldüğü üzere *S. thermophilus* fajlarının artış dönem sürelerinin hemen hemen aynı ve 30-35 dakika olduğu tespit edilmiştir. Ancak latent dönem süreleri 15- 35 dakika arasında değişmektedir. Çiğ ve pastörize süt izolatu olan sırasıyla 2B3-A ve 231S-A1MÖ fajlarının latent dönem sürelerinin 15'er dakika olduğu, Φ231-X9'un ise 35 dakika ile en uzun latent döneme sahip faj olduğu tespit edilmiştir. En düşük patlama büyüklüğüne sahip faj, 64 faj partikülü ile Φ2B3-A iken; en yüksek patlama büyüklüğüne sahip faj 620 faj partikülü ile Φ709-X5'dir. Bulunan bu değerler

ile diğer çalışmalar karşılaştırıldığında latent dönem sürelerinde ve patlama büyüklüklerinde çok fark olmadığı görülmektedir. Larbi vd. (1990) ile Tremblay ve Moineau (1999), çalıştıkları *S. thermophilus* fajların hepsinin latent dönem sürelerini 25 dakika, patlama büyüklüklerini ise sırasıyla 88 ile 56 ve 276 olarak bulmuştur. Yine *S. thermophilus* fajları ile çalışan Suarez vd. (2002) artış dönem sürelerini 140-200 dakika olarak belirtmişlerdir. Patlama büyüklüklerinin de 300-600 faj partikülü arasında değiştiğini saptamışlardır. Bu tez kapsamında çalışılan fajlardan Φ 709-X5'in ise artış dönemi 35 dakika gibi kısa bir süre de olsa patlama büyüklüğünün 620'ye ulaştığı görülmüştür. Dolayısıyla Suarez vd. tarafından çalışılan yüksek artış dönemlerine sahip fajların patlama büyüklüklerinin de yüksek olmasına karşın; bu çalışmada kullanılan *S. thermophilus* fajlarından 709-X5'in 35 dk gibi kısa bir artış dönemi olsa da, patlama büyüklüğünün 620 faj partikülü olarak belirlenmesi ilginç gelmiştir.

Lb. bulgaricus fajlarından Y4L-X12 fajının ise latent dönemi 85 dakika, patlama büyüklüğü ise 140 faj partikülü olarak bulunmuştur. *Lb. bulgaricus* fajları ile gerçekleştirilen diğer bazı denemelerde, latent dönemlerinin 40 ve 60 dakika (Chow *et al.* 1988, Lahbib-Mansais *et al.* 1992); bazılarında ise 40 veya 30 dakikadan az olduğu belirtilmiştir (Suarez *et al.* 2002, Quiberoni *et al.* 2004). Ayrıca, bu araştırmalarda tespit edilen patlama büyüklüklerinin 23 ile 130 faj partikülü arasında değiştiği görülmüştür. Bu durumda, tez kapsamında çalışılmış olan bu fajın hem latent döneminin hem de patlama büyüklüğünün diğerlerine göre daha fazla olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.1 *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* fajlarının latent ve artış dönem süreleri ile patlama büyüklükleri

Faj Kodu	Latent Dönem (dakika)	Artış Dönemi (dakika)	Patlama Büyüklüğü (Faj)
Φ B3-X19	25	35	143-266-401
Φ 2B3-A	15	35	64
Φ 231-X9	35	35	140
Φ 231S-A1MÖ	15	30	264
Φ 709-X5	20	35	620
Φ Y4L-X12	85	40	140

5.1.3.2 Faj plak etkinliği, adsorbsiyon oranı ve plak morfolojisi

Faj plak etkinliği, fajların konakçıları üzerinde oluşturabildiği plaklar olarak tanımlanabildiği gibi (Ellis and Delbrück 1939); fajın farklı bir konakçada verdiği titrenin homolog konakçısında verdiği titreye oranlanması ile de hesaplanmaktadır. Genellikle direnç sistemi aktarılan veya bu sistemlere sahip konakçılarda geliştirilen fajların titrelelerindeki değişimleri takip etmek amacıyla bu değerler belirlenmektedir (Sanders and Klaenhammer 1980).

Çizelge 4.5’de görüldüğü üzere fajların homolog ve heterolog konakçılarındaki titreler verilmiş ve bu değerlerin oranlanmasıyla fajların farklı konakçılardaki plak etkinlikleri belirlenmiştir. Fajın homolog konakçısındaki EOP değeri 1 kabul edilmiştir. Φ709-X5’in kendi homolog konakçısı ile kıyaslandığında heterolog konakçılarından 231 *S. thermophilus* suşunda daha fazla plak etkinliği (1.03) gösterirken, B3 suşunda düşük plak etkinliği (0.76) göstermiştir. Aynı şekilde Φ231-X9 heterolog konakçılarından 709 suşunda 1.6 EOP değerine ulaşmışken, B3 heterolog konakçısında 0.25 gibi düşük bir plak etkinliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Φ231S-A1MÖ, Φ2B3-A ve ΦB3-X19 *S. thermophilus* fajları ise diğer iki fajdan farklı olarak heterolog konakçılarındaki plak etkinliği homolog konakçılardan daha düşük titre verdiklerinden EOP değerleri de 1’den düşük çıkmıştır. *Lb. bulgaricus* Y4L-X12 fajı da, Φ709-X5 ve Φ231-X9 gibi, heterolog konakçılarındaki plak etkinliği V2 ve referans *Lb. bulgaricus* suşlarında, kendi homolog konakçısından daha yüksek plak etkinliği gösterirken; 231 ve V1 *Lb. bulgaricus* heterolog konakçıları üzerinde daha düşük titreye sahip olduğundan EOP değerleri de 1’in altında ve sırasıyla 0.5, 0.28 çıkmıştır. EOP değerinin 1’den az çıkması fajın heterolog konakçısında bu fajın gelişimine engel olan direnç mekanizmalarından birinin varlığına işaret eder. Faj adsorbsiyonunun ve DNA enjeksiyonunun engellenmesi, abortif enfeksiyon, restriksiyon/modifikasyon sistemleri faj direnç mekanizmaları olarak karşımıza çıkmaktadır (Moineau 1999, Forde and Fitzgerald 1999, Coffey and Ross 2002). EOP değerinin 1’in altında çıkması, kullanılan heterolog konakçılarda adsorbsiyonun veya DNA enjeksiyonunun engellenmesi tipinde bir direnç mekanizması varlığından kaynaklanmamaktadır. Böyle düşünülmesinin nedeni Çizelge 4.6’dan da görüleceği

üzere fajların neredeyse tüm konakçılara adsorbe olma oranlarının % 99 ve her konakçıda gelişebiliyor olmasıdır (Çizelge 4.5). Fajların EOP değerleri, restriksiyon-modifikasyon sistemi aktarılan veya bu mekanizmayı taşıyan suşlarda belirlenmektedir (Sanders and Klaenhammer 1980). Bu nedenle suşların restriksiyon-modifikasyon tipinde direnç sistemlerine sahip olup olmadıklarının araştırılması gerektiği düşünülmüştür. Tunail vd. (2002), çalıştıkları *Lb. bulgaricus* yerel suşlarından ikisinin (2001 ve 2004 suşları), 30 adet *Lb. bulgaricus* fajına karşı dirençlilik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Fajların her iki suşa değişik oranlarda adsorbe olabildiğini tespit eden araştırmacılar, suşlarda faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi tipinde direnç mekanizması olduğunu bulmuşlardır. Başka bir çalışmada ise çalışılan doğal *S. thermophilus* suşlarından ikisinde (MR27a ve St 7.6) plazmidde kodlu adsorbsiyonun engellenmesi tipinde direnç mekanizması olduğu belirtilmiştir (Tükel *et al.* 2004). Kivi vd (1987) ise *S. thermophilus* fajlarının plak etkinlikleri ile farklı konakçılara adsorbe olma oranlarını belirlemiştir. Bu araştırmanın sonunda fajlardan bazılarının çok yüksek yüzde ile konakçı olarak kullanılan suşlara adsorbe olabildiği ancak plak oluşturamadığı, bazılarının hem homolog hem de heterolog konakçılarda hemen hemen aynı titreyi vermelerine karşın en yüksek EOP değerini her birine heterolog olan başka bir konakçıda verdiği, bazılarının ise heterolog konakçılarına homolog konakçılardan daha yüksek yüzde ile bağlandıkları görülmüştür. Dolayısıyla araştırmacılar konakçı olarak kullanılan suşların restriksiyon-modifikasyon sistemlerinin incelenmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Bu tez çalışmasında ise yukarıda bahsedilen çalışmadaki kadar değişim olmasa da, fajların heterolog ve homolog konakçılarına hemen hemen aynı yüzdeyle bağlanmalarına karşın heterolog konakçılar üzerinde daha az veya daha yüksek EOP değerleri verdikleri görülmüştür.

Ayrıca heterolog konakçılarda elde edilen titrenin düşüklüğünün Petri'de agar miktarının fazlalığından kaynaklanabileceği de dikkate alınmalıdır. Bu durumdan farklı olarak *S. thermophilus* suşlarına göre *Lb. bulgaricus* suşları agar ortamında daha zor gelişmektedir. Dolayısıyla her zaman faj plağının görülmesi mümkün olamamakta ve her denemede aynı titreye sahip faj kullanılsa bile farklı titreler elde edilebilmektedir.

Aynı durum her iki cinse ait fajların plak morfolojileri ve büyüklükleri için de geçerlidir. *S. thermophilus* konakçıları üzerinde tüm *S. thermophilus* fajları; *Lb. bulgaricus* suşlarında ise tüm *Lb. bulgaricus* fajları aynı tip plak oluşturmaktadır. Plakların çaplarının 0.5-1.5 mm arasında değiştiği ve sınırlarının belli olduğu morfolojik bir yapıya sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu değişimin, Petri üzerindeki agarlı bölümün fazla olup olmamasına, konakçı suşun üreme miktarına ve birkaç faj plağının yan yana geliyor olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Konakçı suşun az üremesi durumunda ki bu duruma daha çok *Lb. bulgaricus* suşlarında rastlanmaktadır, fajların plak çapları çok büyük gibi algılanmaktadır. Ancak farklı zamanlarda elde edilen sonuçlardan yukarıda bahsedilen bulguların en doğru bulgular olduğu sonucuna varılmıştır.

Fajlar için plak morfolojisinin, genellikle karakteristik bir özellik ve faj genetiği üzerine yapılan çalışmalarda belirleyici olduğu belirtilmiş olsa da (Ellis and Delbrück 1939, Luria and Darnell 1967), bu çalışmada kullanılan fajların her konakçıda verdiği plak yapısının aynı olması ve bu fajların protein profillerinin çok benzer olma durumu, restriksiyon endonükleaz kesimlerine göre ise de bazen aynı bazen farklı gruplarda yer almaları, plak yapısının genetik açıdan aslında önemli olmadığını düşündürmektedir. Ellis ve Delbrück (1939) ile Luria ve Darnell (1967), latent dönem ve patlama büyüklüğünün fajlar için çok belirleyici özellikler olduğunu belirtse de yukarıda değinilen nedenlerden dolayı çok da belirleyici olmadığı görülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında replikasyon parametreleri belirlenecek fajlar, homolog konakçıları geliştirildikten sonra, heterolog konakçıları ile karşılaştırılarak EOP, % adsorbsiyon oranları ve plak morfolojileri belirlenmiştir. Benbadis vd. (1990) ise, çalıştıkları *S. thermophilus* fajlarını hem homolog hem de heterolog konakçıda hazırlayarak plak etkinliği değerlerini hesaplamıştır. Benbadis vd., fajın kendi homolog konakçısında hazırlanması durumunda, heterolog suşta EOP değerini 3×10^{-5} bulmuş; heterolog suşta hazırlanması durumunda ise homolog konakçasındaki EOP değerinin 3×10^{-6} 'ya düştüğünü görmüştür. Bu sıradışı geri dönüşümlülüğün, fajın konakçılara farklı oranda tutunuyor olmasından kaynaklanmadığını aksine konakçılarda

restriksiyon/modifikasyon sistemlerinin varlığının göstergesi olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak Auad vd. (1998), çalıştıkları lizogenik *Lb. bulgaricus* CRL 539 suşundan mitomisin C ile indükleyerek elde ettikleri lb539 temperent fajının, *Lb. lactis* CNRZ 326 suşunda üç kez geliştirilmesinden sonra EOP değerinin 9.4×10^{-4} 'den 1.6'ya yükseldiğini; LL-H litik fajının ise farklı konakçıda geliştirilmesinden sonra EOP değerinin 1.7'ye çıktığını saptamışlardır.

6. SONUÇLARA İLİŞKİN ÖNERİLER

1. Yerel *S. thermophilus* suşlarının türe özgül test edilen fajlarına ve karışık kültür olarak kullanılmaları halinde partneri olan *Lb. bulgaricus*'un fajlarına fevkalade dirençli oldukları, bu özellikleriyle üstün starter potansiyeli gösterdikleri anlaşılmıştır. *Lb. bulgaricus* suşlarının ise fajlarına çok duyarlı oldukları, hatta partnerinin (*S. thermophilus*) kimi fajlarına heterolog konakçı davranışı sergiledikleri saptanmıştır. Starter seçimi amacıyla *Lb. bulgaricus* suşlarında faj direncin test edilmesinin birincil kriter olarak ele alınmasının önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar ayrıca işletmelerde görülen faj problemlerinin daha fazla *Lb. bulgaricus* suşlarından kaynaklandığına işaret etmektedir.

2. Faj-konakçı özgüllüğünde en önemli ve ilginç sonuç, *S. thermophilus* fajlarının cinsler arası heterolog konakçı kullanma özellikleridir. Şimdiye değin literatürde rastlanmayan bu davranışı Özyurt (2005) ve Kahraman (2006) da çalışmalarında belirtmişlerdir. Bu tez çalışması ile de termofilik fajların cinsler arası heterolog konakçı kullandıkları teyit edilmiştir.

3. Termofilik fajların çiğ sütlerden izole edilebilmeleri, ayrıca yerel ve endüstriyel suşlarda lizogeniye rastlanmaması (Kaleli *et al.* 2004, Kahraman 2006) yoğurt işletmelerinde bulk üretimi sırasında ortaya çıkan fajların çiğ süt kaynaklı olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan Φ231S-A1MÖ'nün pastörize süttten izole edilmiş olması, pastörizasyon normlarının, fajların inaktivasyonu için her zaman yeterli olmadığını göstermektedir.

4. Tez kapsamında protein profilleri çıkarılan *S. thermophilus* fajlarını majör proteinlerine göre sınıflandırmak mümkün olmamıştır. Minör proteinlerine göre bazı ufak farklılıklar sergileyen ve bu şekilde birbirlerinden ayırdedilen fajlar bulunsa da ve kendi içlerinde 8 gruba ayrılırsalar da; protein profilleri ile restriksiyon enzim kesimlerine göre gruplandırma arasında şu aşamada (homoloji çalışmaları yapılmadığından) bir korelasyondan söz etmek olanaklı değildir. *S. thermophilus*

fajlarının, iki majör protein bantı (30.6 ve 27.3 kDa) ile hem Neve vd. (1989)'un üç farklı protein bandına göre yaptıkları sınıflamada 2. grupta, hem de Prevots vd. (1989)'nin iki farklı protein profiline göre yaptıkları sınıflamada yine 2. grupta yer alabilecekleri anlaşılmıştır.

Lb. bulgaricus fajları da; 30.17 kDa, 29.9 kDa, 27.2 kDa (V1 ve V2 fajları) ve 29.6 kDa, 29.2 kDa ve 26.2 kDa (Y4 fajları) ağırlıkta hemen hemen aynı majör protein bantları vermişlerdir. Bu bantlar diğer araştırmacıların verileriyle birebir örtüşmemektedir. *Lb. bulgaricus* fajları ile elde edilen majör protein bantları, daha önce iki majör protein bantı (34 kDa, 19 kDa) ile yine iki majör proteinin (32 kDa, 23 kDa) saptandığı çalışma (Mata *et al.* 1986) sonuçlarına oldukça yakın bulunmasına karşın yerel *Lb. bulgaricus* fajları 3 majör protein bandıyla şimdiye kadar belirlenen protein profillerinden ayrılarak farklı bir grup oluşturmuştur. Minör proteinlere göre çok küçük farklılıklarla birbirinden ayırdedilen ve 5 grupta toplanan fajların, restriksiyon endonükleaz kesimlerine göre oluşturulan gruplar arasındaki ilişkiyi görebilmek aynı gerekçe ile olanaklı değildir.

5. Fajların farklılıklarını en iyi ortaya koyan yöntem faj genomlarının restriksiyon endonükleazlarla kesimi olmuştur. Çok sayıda (9) enzimin kullanıldığı analizlerde *Bam*HI enziminin *S. thermophilus* faj genomunu kesmek için tanıma dizilerine sahip olmadığı anlaşılmış, diğer 8 enzimden en iyi sonuçlar *Eco*RI ve *Eco*RV ile alınmıştır. Ancak *Cla*I, *Hind*III ve *Hha*I enzim kesim şablonları da bazı yorumlara imkan tanımıştır. Faj genomlarının en fazla ayrımını sağlayan *Eco*RV kesimlerine göre *S. thermophilus* fajları 18 fajın topluca yer aldığı bir grup ve her birinin ayrı bir grup oluşturduğu 8 grup olmak üzere toplam 9 gruba ayrılmıştır. Ayrıca büyük grubu oluşturan fajların da aynı olmayabileceği, içlerinden en az 5 fajın (Φ B3-X14); (Φ 709-X5, Φ 231-X9); (Φ 231-X7, Φ 231-X8) daha; sırayla *Cla*I, *Hind*III ve *Hha*I enzim kesimleri sonuçlarına göre ayırdedilebileceği sonucuna varılmıştır.

Lb. bulgaricus faj genomları, *Bam*HI enziminin tanıma dizileri bulunmadığı için kesilememiştir. Diğer kullanılan 5 enzimden *Hind*III kesim şablonları 8 grubun ayırddedilmesine imkan vermiştir. 7 farklı kesim şablonuyla 13 faj 7 ayrı grupta yer alırken, 11 faj da kesimi gerçekleştirilemeyen grupta toplanmıştır. Ancak kesilemeyenler grubunda bulunan 11 fajdan 6'sının genom benzerliği *Eco*RI ve *Pvu*II ile kesin olarak ortaya konmuş sonuç olarak tüm *Lb. bulgaricus* fajlarının 9 grupta değerlendirilmesinin daha doğru olacağı düşünülmüştür.

Faj koleksiyonunda yer alan fajların bu sınıflandırma ile pratikte starter direncinin test edilmesine hizmet sunarken diğer taraftan da bu fajlar arasındaki homoloji çalışmalarının yürütülmesi hatta DNA dizi analizlerinin yapılarak kesin farklılıklarının ortaya konması gerekmektedir. Bunun sonucunda restriksiyon endonükleazlarla kesimin güvenilirliği test edilebileceği gibi, kesim fragmentlerinin homolojisi ile de protein profilleri arasındaki korelasyon varlığı veya yokluğu ortaya konabilecektir.

6. Bu çalışma sonucunda *S. thermophilus* fajlarında genom büyüklükleri 41-45 kb arasında saptanmıştır. Bu değerler daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen 31-45 kb değerlerine (Benbadis *et al.* 1990, Larbi *et al.* 1990, Brüssow *et al.* 1994a, Brüssow and Bruttin 1995, Prevots *et al.* 1989, Le Marrec *et al.* 1997, Quiberoni *et al.* 2003a) oldukça yakın bulunmuştur. Genom büyüklükleri 29-32 kb arasında saptanan *Lb. bulgaricus* fajları da literatür verileriyle (Chow *et al.* 1988, Auad *et al.* 1999, Quiberoni *et al.* 2004) uyum göstermektedir. Yalnızca aynı fajlarla çalışan ve *Eco*RI kesimiyle sonuca giden Tükel vd. (2003)'nin değerleriyle bağdaşmamaktadır ki bu durum Tükel vd.'nin sonuçlarını tartışmaya açmaktadır.

7. Faj parametrelerinin belirlenmesi için fajların farklı izolasyon materyaline ve farklı restriksiyon gruplarına göre seçilmiş olmaları faj gruplandırmasını destekler nitelikte farklı sonuçlar yaratmamıştır. Ellis ve Delbrück (1939) ile Luria ve Darnell (1967)'in; latent dönem ve patlama büyüklüğünün fajlar için çok belirleyici parametreler olduğunu belirtmelerine karşın, deneme sonuçları bu parametrelerin aslında önem atfedildiği kadar belirleyici olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte bu faj

parametrelerinin belirlenmesi; koleksiyondaki fajların daha iyi tanımlanmasını sağlamış, belirlenen EOP değerleri ve % adsorbsiyon oranları ileride yürütülecek olan faj direnç mekanizmalarının araştırılması için önemli doneler ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

- Acar, E. 2002. Yoğurt starter kültür fajlarının elektron mikroskobu ile morfolojik karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 102 s, Ankara.
- Accolas, J. P. and Spillmann, H. 1979. The morphology of six bacteriophage of *Streptococcus thermophilus*. J. Appl. Bacteriol. 47; 135-144.
- Ackermann, H. W. 1987. Bacteriophage taxonomy in 1987. Microbiol. Sci., 4; 214-218.
- Ackermann, H. W. 1991. Phagentexonomie 1990: Stand and Probleme Bioforum 11/91, 419-426.
- Ackermann, H. W. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Arch. Virol., 146: 843-857.
- Ackermann, H. W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. Res. Microbiol., 154: 245-251.
- Ackermann, H. W. 2005. Bacteriophage Classification. 68-86pp. In: Bacteriophages Biology and Applications. Eds: E. Kutter and A. Sulakvelidze. CRC Press, USA, 510p.
- Ackermann, H. W. 2006. Classification of Bacteriophage. 8-16 pp In: The Bacteriophage 2nd. Ed: R. Calendar. Oxford University Press, USA, 761p.
- Akçelik, M. 1991. *Streptococcus lactis*' de faj dirençliliğinin plazmidlerle olan ilişkisi ve faj dirençlilik plazmidlerinin faja duyarlı suşlara aktarım olanakları üzerinde çalışmalar. Doktora tezi. A. Ü. F. B. E. Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 163 s., Ankara.
- 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 (4); 215-217.
- Arda, M. 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, 548 s., Ankara
- Arendt, E. K., Van De Guchte, M., Coffey, A. G., Daly, C. and Fitzgerald, G. F. 1993. Molecular genetics of bacteriophages of lactic acid bacteria. Lait, 73; 191-198.
- Auad, L., Ruiz Holgado, A. A. P., Forsman, P., Alatossava, T. and Raya, R. R. 1997. Isolation and characterization of a new *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* temperate bacteriophage. J. Dairy Sci., 80: 2706- 2712.

- Auad, L., Peril, M. A. A., Ruiz Holgado, A. A. P. and Raya, R. R. 1998. Evidence of a restriction/modification system in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326. *Current Microbiology*. 36; 271-273.
- Auad, L., Raisanen, L., Raya, R. R. and Alatossava, T. 1999. Physical mapping and partial genetic characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bacteriophage lb539. *Arch. Virol.*, 144; 1503-1512.
- Aydar, L. Y. and Tunali, N. 1995. Isolation and electron microscopic investigation of lactic phages which isolated from Turkey. *Milchwissenschaft* 50 (6), 312-316.
- Benbadis, L., Faalen, M., Slos, P., Fazel, A. and Mercenier, A. 1990. Characterization and comparison of virulent bacteriophages of *Streptococcus thermophilus* isolated from yogurt. *Biochimie*, 72; 855-862.
- Benbadis, L., garel, J. R. and Hartley, D. L. 1991. Purification, properties and sequence specificity of SsII, a new type II restriction endonuclease from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (12): 3677-3678.
- Billing, E. 1969. Isolation of growth and preservation of bacteriophage. In “ Methods in Microbiology. Eds. J. R. Norris, D. W. Robins pp. 315-329 ”. Academic Press, 369 p., London.
- 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 (4): 509-515.
- Birge, E. A. 2000. *Bacterial and Bacteriophage Genetics*. 4th Edition. Springer-Verlag New York, 559 p, USA.
- Blumenthal, R. M. and Cheng, X. 2002. Restriction-Modification Systems, 177-226pp. In: *Modern Microbial Genetics*, 2nd Eds Uldis N Streips and Ronald E. Yasbin. A John Willey&Sons, Inc., Publication. New York. 655p.
- Bruttin, A., Desiere, F., d’Amico, N., Guerin, J. P., Sidoti, J., Huni, B., Lucchini, S. and Brüssow, H. 1997. Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63; 3144-3150.
- Brüssow H., Frémont M., Bruttin A., Sidoti J., Constabla A. and Fryder V. 1994a. Detection and Classification of *Streptococcus thermophilus* Bacteriophages Isolated from Industrial Milk Fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (12), 4537-4543.
- Brüssow H., Probst, A., Fremont, M. and Sidoti, J. 1994b. Distinct *Streptococcus thermophilus* bacteriophages share an extremely conserved DNA fragment. *Virology*, 200: 854-857.

- Brüssow, H. and Bruttin, A. 1995. Characterization of a temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage and its genetic relationship with lytic phages. *Virology*, 212; 632-640.
- Brüssow, H. 2001. Phages of dairy bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55: 283-303.
- Brüssow, H. and Desiere, F. 2001. Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages. *Molecular Microbiol.*, 39 (2); 213-222.
- Brüssow, H., Canchaya, C. and Hardt, W. D. 2004. Phages and evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Molecular Biology Reviews*, 68 (3); 560-602.
- Brüssow, H. and Kutter, E. 2005. Phage Ecology (130-156). In: *Bacteriophages Biology and Applications*. Eds: E. Kutter and A. Sulakvelidze. CRC Press, USA, 510p.
- Brüssow, H. 2006. Prophage Genomics. 17-25 pp. In: *The Bacteriophage 2nd. Ed*: R. Calendar. Oxford University Press, USA, 761p.
- Brüssow, H. and Desiere, F. 2006. Evolution of Tailed Phages: Insights from Comparative Phage Genomics 26-36pp. In: *The Bacteriophage 2nd. Ed*: R. Calendar. Oxford University Press, 761 p, USA.
- Brüssow, H. and Suarez, J. E. 2006. *Lactobacillus* phages 653-657pp. In: *The Bacteriophage 2nd. Ed*: R. Calendar. Oxford University Press, 761 p, USA.
- Budde-Niekiehl, A. and Teuber, M. 1987. Electron microscopy of the adsorption of bacteriophages to lactic acid streptococci. *Milchwissenschaft*, 42 (9); 551-554.
- Bushuk, W., Hay, R. L., Larsen, N. G., Sara, R. G., Simmons, L. D. and Sutton, K. H. 1997. Effect of mechanical dough development on the extractability of wheat storage proteins from bread dough. *Cereal Chemistry*, 74; 389-395.
- Cann, A.J. 2001. *Principles of Molecular Virology*. 3rd Edition. Elsevier Academic Press, 339p, USA.
- Capra, M. L., Quiberoni, A. and Reinheimer, J. A. 2004. Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. *Letters in Appl. Microbiol.*, 38; 499-504.
- Chow, J., Batt, C. A. and Sinskey, A. J. 1988. Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage ch2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (5); 1138-1142.
- Cluzel, P. J., Veaux, M., Rousseau, M. and Accolas, J. P. 1987. Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Research*, 54; 397-405.

- Coffey, A. and Ross, R. P., 2002. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 303-321.
- Davidson, B. E., Powell, I. B. and Hiller, A. J. 1990. Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 87; 79-90.
- Demiralp, H., Çelik, S. and Köksel, H. 2000. Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing. *Eur Food Res Technol.*, 211; 322-325.
- Desiere, F., Pridmore, R. D. and Brüssow, H. 2000. Comparative genomics of the late gene cluster from *Lactobacillus* phages. *Virology*, 275; 294-305.
- Desiere, F., Lucchini, S., Canchaya, C., Ventura, M. and Brüssow, H. 2002. Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82; 73-91.
- Durlu, F. and Tunail, N. 1991. Resistance of commercial cheese starter cultures to domestic bacteriophages in Turkey. The Third International Congress on Food Industry 4-8 November 1991. Kuşadası Türkiye. " Food Additives Proceeding" p. 125-139.
- Durlu-Özkaya, F., İç, N. ve Tunail, N. 1999. Termofilik fajlara dirençli yoğurt kültürleri ve rotasyon. *Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi*. XI. KÜKEM-Biyoteknoloji Kongresi Özel Sayısı 23 (2), 7-8.
- Duplessis, M. and Moineau, S. 2001. Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Molecular Microbiology*, 41 (20); 325-336.
- Ellis, E. K. and Delbrück, M. 1939. The growth of bacteriophage. In: *Papers on Bacterial Viruses*, Selected by G. S. Stent (1960). Methuen and Co Ltd. London. 365 p.
- Fayard, B., Haefliger, M. and Accolas, J. P. 1993. Interaction of temperate bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* with lysogenic affect phage DNA restriction pattern and host ranges. *J. Dairy Research*, 60; 385-399.
- Forde, A. and Fitzgerald, G. F. 1999. Bacteriophage defence system in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 89-113.
- Forsman, P. 1993. Characterization of a prolate-headed bacteriophage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, and its DNA homology with isometric-headed phages. *Arch. Virol.*, 132; 321-330.

- Foschino, R., Perrone, F. and Galli, A. 1995. Characterization of two virulent *Lactobacillus fermentum* bacteriophages isolated from sour dough. J. Appl. Bacteriol., 79; 677-683.
- Garen, A. and Kozloff, L. M. 1959. The Initiation of Bacteriophage Infection. (203-233pp). In: The Viruses, Volume 2 Plant and Bacterial Viruses. Eds: F. M. Burnet and W. M. Stanley. Academic Press, New York, 397 p.
- Garvey, P., Sinderen, D., Twomey, D. P. Hill, C. and Fitzgerald, G. F. 1995. Molecular genetics of bacteriophage and natural phage defence system in the genus *Lactococcus*. Int. Dairy Journal, 5: 905-947.
- Gautier, M. and Chopin, M. C. 1987. Plasmid-determined systems for restriction and modification activity and abortive infection in *Streptococcus cremoris*. Appl. Environ. Microbiol., 53 (5); 923-927.
- Geis, A., El Demerdash, H. A. M. and Heller, K. J. 2003. Sequence analysis and characterization of plasmids from *Streptococcus thermophilus*. Plasmid, 50; 53-69.
- Guimont, C., Henry, P. and Linden, G. 1993. Restriction/modification in *Streptococcus thermophilus*: isolation and characterization of a type II restriction endonuclease *Sth455I*
- Guttmann, B. S. and Kutter, E. M. 2002. Bacteriophage Genetics (85-126 pp.), In: Modern Microbial Genetics, 2nd Eds Uldis N Streips and Ronald E. Yasbin. A John Willey&Sons, Inc., Publication. New York. 655p.
- Guttman, B., Raya, R. A. and Kutter, E. 2005. Basic Phage Biology. (29-66 pp) In: Bacteriophages Biology and Applications. Eds: E. Kutter and A. Sulakvelidze. CRC Press, USA, 510p.
- Gürsel, A., Şanlı Karademir, E., Acar, E., Karagözlü, C., Çetin, T. and Benli, M. 2002-2004. Yağ içeriği azaltılan kaşar peynirlerinde ekzopolisakkarit üreten klütür kullanımıüzerine bir araştırma. A. Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, TÜBİTAK/TOVAG Projesi.
- Hendrix, R. W. 2002a. Bacteriophages: Evolution of the majority. Theoretical Population Biology. 61; 471-480.
- Hendrix, R. W. 2002b. Bacteriophage λ and Its Relatives. 127-144 pp. In: Modern Microbial Genetics, 2nd Eds Uldis N Streips and Ronald E. Yasbin. A John Willey&Sons, Inc., Publication. New York. 655p.
- Hendrix, R. W., Hatfull, G. F. and Smith, M. C. M., 2003. Bacteriophages with tails: chasing their origins and evolution. Research in Microbiology, 154; 253-257.

- Hendrix, R. W. 2003. Bacteriophage genomics. *Current Opinion in Microbiology*, 6; 506-511.
- Hill C., 1993. Bacteriophage and Bacteriophage Resistance İn Lactic Acid Bacteria, *Fems Microbiol. Rev.*, 12, 87-108.
- ICTV <http://phene.cpmc.columbia.edu/Ictv>
- Kahraman, E. 2006. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* suşlarında lizogeninin araştırılması. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Y. Lisans Tezi (basılmamış), Ankara.
- Kaleli, D. 2001. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* virulent fajlarının izolasyonu ve yoğurt starter kültürleri üzerine litik etkilerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi (basılmamış). A. Ü. Z. F. Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- Kaleli, D. ve Tunail, N. 2001. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* virulent fajlarının izolasyonu ve yoğurt starter kültürleri üzerine litik etkilerinin belirlenmesi. XII.Biyoteknoloji Kongresi Bildiriler Kitabı, 286 s., 17-21 Eylül 2001.
- Kaleli, D., Tunail, N. and Acar, E. 2004. Virulent bacteriophages of *S.thermophilus* and lysogeny. *Milchwissenschaft*, 59 (9/10); 487-491.
- Kivi, S., Peltomäki, T., Luomala, K. and Sarimo, S. S. 1987. Some properties of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Fotra Microbiology*, 32; 101-106.
- Klaenhammer, T. R. and Sanozky, R. B. 1985. Conjugal transfer from *Streptococcus lactis* ME2 of plasmids encoding phage resistance, nisin resistance and lactose fermenting ability: Evidence for a high-frequency conjugative plasmid responsible for abortive infection of virulent bacteriophag. *J. General Microbiol.*, 131; 1531-1541.
- Klug, W. S. and Cummings, M. R. 2000. *Concepts of Genetics*, 6th Edition, Prentice Hall, USA, 816 p.(Çeviri Editörü Cihan Öner)
- Krusch, U., Neve, H., Luschei, B. and Teuber, M. 1987. Characterization of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by host specifity and electron microscopy. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 39 (3); 155-167.
- Laemmli U. K., Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685, (1970).
- Lahbib-Mansais, Y., Mata, M. and Ritzenthaler, P. 1988. Molecular taxonomy of *Lactobacillus* phages. *Biochimie*, 70; 429-435.

- Lahbib-Mansais, Y., Boizet, B., Dupont, L., Mata, M. and Ritzenthaler, P. 1992. Characterization of a temperate bacteriophage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and its interactions with the host cell chromosome. J. General Microbiol., 138; 1139-1146.
- Lamothe, G., Levesque, C., Bissonette, F., Cochu, A., Vadeboncoeur, C., Frenette, M., Duplessis, M., Tremblay, D. and Moineau, S. 2005. Characterization of the cro-ori region of the *Streptococcus thermophilus* virulent bacteriophage DT1. Appl. Environ. Microbiol., 71 (3); 1237-1246.
- Larbi D., Colmin C., Rousselle L., Decaris B. and Simonet JM. 1990. Genetic and Biological Characterization Of Nine *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Bacteriophages, *Lait*, 70, 107-116.
- Le Marrec, C., Sinderen, D., Walsh, L., Stanley, E., Vlegels, E., Moineau, S., Heinze, P., Fitzgerald, G. and Fayard, B. 1997. Two groups of bacteriophages *Streptococcus thermophilus* can be distinguished on the basis of mode of packaging and genetic determinants for major structural proteins. Appl. Environ. Microbiol., 63 (8); 3246-3253.
- Lerner, K. L. and Lerner, B. W. 2003. World of Microbiology and Immunology. Gale Group. 701p. USA
- Lu, Z., Breidt Jr, F., Fleming, H. P., Altermann, E. and Klaenhammer, T. R. 2003. Isolation and characterization of *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ΦJL-1 , from a cucumber fermentation. Int. J. Food Microbiol., 84; 225-235.
- Luria, S. E. and Darnell, J. E. 1967. General Virology. 2nd Edition. John Wiley&Sons, Inc. USA, 512 p.
- Maniloff, J. and Ackermann, H. W. 1998. Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the order *Caudovirales*. Arch. Virol., 143 (10); 2051-2063.
- Mata, M., Trautwetter, A., Luthaud, G. and Ritzenthaler, P. 1986. Thirteen virulent and temperate bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* belong to a single DNA homology group. Appl. Environ. Microbiol., 52 (4); 812-818.
- Matthews, C. K. 1971. Bacteriophage Biochemistry. Van Nostrand Reinhold Ltd. Canada. 373 p.
- Matthews, R. E. F. 1985. Viral taxonomy for the nonvirologist. Ann. Rev. Microbiol., 39; 451-474.
- McGrath, S., van Sinderen, D. and Fitzgerald, G. F. 2002. Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 12: 3-15.

- Mikkonen, M., Dupont, L., Alatossava, T. and Ritzenthaler, P. 1996. Defective site-specific integration elements are present in the genome of virulent bacteriophage LL-H of *Lactobacillus delbrueckii*. Applied and Environmental Microbiology, 62 (5): 1847-1851.
- Moineau, S., Walker, S. A., Holler, B. J., Vedamuthu, E. R. and Vandenberg, P. A. 1995. Expression of a *Lactococcus lactis* phage resistance mechanism by *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 61 (7); 2461-2466.
- Moineau S. 1999. Applications Of Phage Resistance In Lactic Acid Bacteria, Antonie Van Leeuwenhoek, 76, 377-382.
- Neve, H., Krusch, U. and Teuber, M. 1989. Classification of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from yoghurt and Swiss-type cheese. Appl. Microbiol. Biotechnol., 30; 624-629.
- Neve, H. 1996. Bacteriophage. In “ Dairy Starter Cultures. Eds. T. M. Cogan, J. P. Accolas pp. 157-189 ” VCH-Verlag, Weinheim.
- Öner, Z. 1986. Peynir ve peyniraltı suyunda bulunan laktik streptokokların özgül fajlarının aranması ve konakçıları belli bazı laktik fajlara karşı özgüllüklerinin saptanması. A. Ü. Fen. Bil. Ens. Doktora Tezi, Ankara.
- Öztürk, S. İ., Erdağ, B., Oğraş, T. T. ve Mandacı, S. 2002 Moleküler Biyoloji Yöntemleri Uygulamalı Eğitim Kursu (Basılmamış), 13-17 Mayıs 2002, TÜBİTAK, MAM, Gen Mühendisliği, Gebze.
- Özyurt, Ş. 2005. Doğal (yerel) *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarında endüstriyel öneme sahip özelliklerin araştırılması. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Y. Lisans Tezi (basılmamış), Ankara.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. 1993. Microbiology. Wm. C. Brown Communication, Inc., 2nd. Edition, 912 p., USA.
- Prevots F., Relano P., Mata M. and Ritzenthaler P. 1989. Close Relationship Of Virulent Bacteriophages Of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* At Both The Protein and The Dna Level, *J. General Microbiol.*, 135, 3337-3344.
- Quiberoni, A., Auad, L., Binetti, A. G., Suarez, V. B., Reinheimer, J. A. and Raya, R. 2003a. Comparative analysis of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from a yoghurt industrial plant. Food Microbiology, 20: 461-469.
- Quiberoni, A., Guglielmotti, D. M. and Reinheimer, J. A. 2003b. Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. Int. J. Food Microbiol., 84: 51-62.

- Quiberoni, A., Guglielmotti, D. M., Binetti, A. and Reinheimer, J. A. 2004. Characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages and the physicochemical analysis of phage adsorption. J. Appl. Microbiol., 96; 340-351.
- Rasic, J. and Kurmann, A. J. 1978. Yoghurt. Technical Dairy Publishing House, 466 p., DK-2720 Vanlose, Copenhagen, Denmark.
- Reinbold, G. W. and Reddy, M. S. 1973. Bacteriophage for *Streptococcus thermophilus*. Dairy Industries, 413-416.
- Reinbold, G. W., Reddy, M. S. and Hammond, E. G. 1982. Ultrastructures of bacteriophages active against *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus helveticus*. Journal of Food Protection, 45 (2); 119-124.
- Reyes-Gavillan, C. G., Limsowtin, G. K. Y., Sechaud, L., Veaux, M. and Accolas, J. P. 1990. Evidence for a plasmid-linked restriction-modification system in *Lactobacillus helveticus*. Appl. Environ. Microbiol., 56 (11); 3412-3419.
- Riemelt, I., Bartel, B. and Malcran, M. 1996. Milchwirtschaftliche Mikrobiologie. B. Behr's Verlag GmbH., 382 p., Hamburg.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sanders, M. E. 1988. Phage resistance in lactic acid bacteria. Biochimie, 70; 411-421.
- Sanders, M. E. and Klaenhammer, T. R. 1980. Restriction and modification group N Streptococci: Effect of heat on development of modified lytic bacteriophage. 40 (3); 500-506.
- Schlegel, H. G. 1985. Allgemeine Mikrobiologie. 6. Überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, 559 s., New York.
- Schouler, C. 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria phages. Lait, 76; 81-89.
- Sechaud, L., Cluzel, P. J., Rousseau, M., Baumgartner, A. and Accolas, J. P. 1988. Bacteriophages of lactobacilli. Biochimie, 70; 401-410.
- Simmer, M. and Secko, D. 2003. Restriction endonucleases: molecular scissors for specifically cutting DNA. The Science Creative Quarterly. Issue Two (www.bioteach.ubc.ca/quarterly)
- Sing, W. D. and Klaenhammer, T. R. 1990. Characteristics of phage abortion conferred in lactococci by the conjugal plasmid pTR2030. J. General Microbiol., 136; 1807-1815.

- Solow, B. T. and Somkuti, G. A. 2001. Molecular properties of *Streptococcus thermophilus* plasmid pER35 encoding a restriction modification system. *Current Microbiol.*, 42; 122-128.
- Sozzi, T., Maret, R. and Poulin, J. M. 1976. Study of plating efficiency of bacteriophages of thermophilic lactic acid bacteria on different media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32 (1); 131-137.
- Suárez, V. B., Quiberoni, A., Binetti, A. G. and Reinheimer, J. A. 2002. Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries. *J. Food Protection*, 65 (10), 1597-1604.
- Summers, W. C. 2005. Bacteriophage Research: Early History (5-23). In: *Bacteriophages Biology and Applications*. Eds: E. Kutter and A. Sulakvelidze. CRC Press, USA, 510p.
- Şanlıbaba, P. 1999. *Lactococcus* cinsine ait suşlarda faj dirençlilik sistemlerinin tanımlanması. Yüksek lisans tezi (basılmamış). A. Ü. Z. F. Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- Şanlıbaba, P. 2003. Laktokok fajlarının; gelişme parametreleri, kapsid proteinleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak sınıflandırılması. Doktora tezi (basılmamış). A. Ü. Z. F. Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. 1989. *Yogurt: Science and Technology*, Pergamon Press, Oxford, 431 p.
- Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. 1999. *Yoghurt Science and Technology*. 2nd. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC. USA. 623 p.
- Tremblay, D. M. and Moineau, S., 1999. Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage DT1 of *Streptococcus thermophilus*. *Virology* 255, 63-76.
- Tikhonenko, A. S. 1970. *Ultrastructure of bacterial viruses*. Plenum Publ. Corp., New York, NY.
- Trautwetter, A., Ritzenthaler, P., Alatossava, T. and Mata, M. 1986. Physical and genetic characterization of the genome of *Lactobacillus lactis* bacteriophage LL-H. *J. Virology*, 59 (3): 551-555.
- Tunail, N. ve Aşkın, O. 1991. Çiğ sütlerden laktik streptokok bakteriyofajlarının izolasyonu ve yerli laktik streptokok suşları ile ticari starterlerin faj dirençliliklerinin belirlenmesi. *Doğa Dergisi*, 15 (3); 785-791.
- Tunail, N., Demirtaş, D. ve Durlu-Özkaya, F. 2000. Yoğurt Fabrikalarında Görülen Bakteriyofaj Problemi, Nedenleri ve Çözüm Önerileri. Alınmıştır “ Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu

- Tebliğler Kitabı. Eds. M. Demirci pp. 113-125 ” Rebel Yayıncılık, 595 s., Tekirdağ.
- Tunail, N., Ayhan, K., Akçelik, M. Durlu Özkaya, F., Doğan, H.B., Kaleli, D., Tükel, Ç. ve Acar, E. 1997-2002. Yoğurt fabrikalarında faj probleminin çözümüne yönelik araştırmalar. TÜBİTAK/TARP-2106 Nolu Proje.
- Tunail, N., Açık, L. Acar, E., Özyurt, Ş., Kahraman, E., Çelebi, A. 2002-2006. Yerel (doğal) *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* ile özgül fajlarının edüstriyel öneme sahip özellikler açısından tanımlanarak alternatif starterlerin belirlenmesi. A. Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü 67 nolu proje.
- Tuncer, Y. 2000. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MPL56 suşunda faj-almaç bölgeyi maskeleyen plazmid kodlu materyalin tanısı. Yüksek lisans tezi (basılmamış). A. Ü. Z. F. Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- Tükel, Ç., Halkman, H. B., Akçelik, M. and Tunail, N. 2003. Characterization of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus*. Commun. Fac. Sci. Univ. Ank. Series C, 20; 1-14.
- Tükel, Ç., Akçelik, M. and Tunail, N. 2004. Analysis of bacteriophage adsorption inhibition resistance mechanism in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* MR27a and St 7.6. Milchwissenschaft, 59 (9/10); 487-491.
- Yaygın, H. ve Kılıç, S. 1993. Süt Endüstrisinde Saf Kültür. Altındağ Matbacılık, 107 s., İzmir.
- Yaygın, H. ve Toklu, G. Ş. 2000. Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültürler. Alınmıştır “Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı. Eds. M. Demirci pp. 37-46 ”. Rebel Yayıncılık, 595 s., Tekirdağ.
- Yılmaz, R. 2002. Çiğ ve pastörize sütlerden yerel yoğurt starter suşlarının izolasyonu, tanımlanması ve bunların karakterizasyonu. Doktora tezi (Basılmamış). Hacettepe Üniv. FBE Gıda Müh. ABD. 161 s.
- Yoon, S. S., Kim, J. W., Breidth, F. and Fleming, H. P. 2001. Characterization of a lytic bacteriophage and molecular cloning of a lysin gene in *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol., 65; 63-74.

EK-1 ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ ve ÇÖZELTİLER

Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Sodyum klorür	8.5g
Distile su	1000ml

Sodyum klorür distile su içerisinde çözülmüş, tüplere 9'ar ml olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 121° C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

M17 Agar (Merck)

Ticari olarak bulunan besiyerinden, 1 litre distile suda 42.5 g dehidre M17 Broth (Merck) çözülmüş ve sıvı besiyeri olarak hazırlanan bu besiyerine 15 g agar katılarak 121° C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. PH 7.2 ± 0.2 olan besiyeri steril petri kutularına dağıtılmıştır.

Modifiye M17 Broth (Krusch vd. 1987)

Fiton pepton	5.0 g
Poly pepton	5.0 g
Maya ekstraktı	2.5 g
Et ekstraktı	5.0 g
Laktoz	5.0 g
Askorbik asit	0.5 g
Sodyum-β-gliserofosfat	9.5 g
1M MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0 ml
1M CaCl ₂	1.2 ml
Distile Su	1000 ml

M17 Broth (Terzaghi ve Sandine 1975), daha iyi bir bakteri gelişimi sağlamak için modifiye edilmiştir. Bu modifikasyonda sodyum-β-gliserofosfat miktarı 9.5 g'a indirilmiş, laktoz miktarı 8 g'a yükseltilmiş ve 1M CaCl₂ çözeltisinden 1 litre için 1.2

ml ilave edilmiştir. Tüm bileşenler distile suda çözündürüldükten sonra tüplere dağıtılmış ve 121° C’de 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 7.2 ± 0.2).

Modifiye M17 Agar (Krusch vd. 1987)

M17 Broth besiyerine % 1.5 agar ve % 0.8 laktoz katılarak elde edilmiş ve 121° C’de 15 dakika sterilize edildikten sonra steril petri kutularına dağıtılarak kullanılmıştır (pH 7.2 ± 0.2).

Modifiye M17 Yumuşak Agar (Krusch vd. 1987)

(thM17 Yumuşak Agar)

Fiton pepton	2.4 g
Poly pepton	2.4 g
Maya ekstraktı	2.0 g
Kasamino asit	2.4 g
Et ekstraktı	3.3 g
Askorbik asit	0.4 g
Sodyum-β-gliserofosfat	12.7 g
1M MgSO ₄	1.3 ml
Agar	6.0 g
Elliker Broth (Difco)	16 g
Distile su	1000 ml

Tüm bileşenler katıldıktan sonra kaynatmak suretiyle agar eritilip tüplere 3’er ml olacak şekilde dağıtılmıştır. 121° C’de 15 dakika sterilizasyondan sonra tüplere aseptik şartlarda 0.1 ml steril Skim Milk ilave edildikten sonra kullanılmıştır (pH 7.2 ± 0.2).

MRS Broth (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 52.2 g alınmış ve 1 litre distile su içerisinde çözülmüş, 10'ar ml olacak şekilde tüplere dağıtıldıktan sonra 118° C'de 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 5.7 ± 0.2).

MRS Agar (Merck)

Ticari olarak bulunan MRS Broth besiyerinden 52.2 g alınıp 1 litre distile suda çözülmüş ve 15 gram agar katılarak 118° C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra % 10 steril 1M CaCl₂ katılmış ve steril petri kutularına dağıtılmıştır (pH 5.7 ± 0.2).

MRS Yumuşak Agar

Ticari olarak bulunan MRS Broth besiyerinden 52.2 g alınıp 1 litre distile suda çözülmüş ve 6 g agar katılarak önce kaynatmak suretiyle agarın erimesi sağlanmış, daha sonra tüplere 3'er ml olacak şekilde dağıtılıp 118° C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra 0.1 ml steril 1 M CaCl₂ katılarak kullanılmıştır (pH 5.7 ± 0.2).

Skim Milk (Pınar A.Ş., Oxoid)

Skim Milk	100 g
Distile Su	1000 ml

Skim Milk distile su içerisinde iyice çözüldükten sonra 10'ar ml olacak şekilde tüplere dağıtılmış ve 110° C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

2.0 SM (Faj tamponu) (Sambrook vd. 1989)

NaCl	5.8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g
1 M Tris.Cl (pH 7.5)	50 ml
% 2 jelatin çözeltisi	5 ml
Bidistile Su	1000ml

Faj tamponu 121° C’de 15 dakika süreyle otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanabilir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esra ACAR SOYKUT

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 31.07.1976

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Aydınlıkevler Lisesi, (1993)

Lisans :Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, (1998)

Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, (2002)

Yüksek Lisans Tez Konusu : Yoğurt Starter Kültür Fajlarının Elektron Mikroskobu ile Morfolojik Karakterizasyonu

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yılı

2002-2003 Onay Gıda ve Araştırma Servisleri A.Ş. Ankara, Gıda Mühendisi

2000-2001 Hotel Keykan Ankara, Hijyen ve Sanitasyon Kontrolü, Gıda Mühendisi

1998-1999 Migros TÜRK T.A.Ş. Ankara 3M Mağazası.

Yayınları (SCI ve diğer)

Kaleli, D., Tunail, N. and Acar, E. 2004. Virulent bacteriophages of *S. thermophilus* and lysogeny. *Milchwissenschaft*, 59 (9/10); 487-491.

Acar, E. ve Tunail, N. 2004. Morphological characterization of bacteriophages of yogurt starter cultures. In “Recent Developments in Dairy Science and Technology, International Dairy Symposium May 24-28 2004. Eds: Z. G. Seydim, F. Y. E. Kitiş, A. C. Seydim. pp 144. Isparta.

Acar. E. ve Tunail, N. 2006. Yoğurt starter kültür fajlarının sınıflandırılması. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Bolu.