

LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS MA83 SUŞUNDA AKTİF BİR FAJ DİRENÇLİLİK SİSTEMİNİN GENETİK VE BİYOKİMYASAL DOĞASI

GENETIC AND BIOCHEMICAL NATURE OF AN ACTIVE PHAGE RESISTANCE SYSTEM IN *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* MA83

Çağla TÜKEL¹, Mustafa AKÇELİK²

¹Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

²Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara

ÖZET: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA83 suşunda fajların adsorbsiyonu, bu bakteride 32.7 kb büyüklükteki plazmidin varlığında üretilen ekzopolisakkarit materyal tarafından engellendi. Kimyasal analizler sonucunda bu ekzopolisakkarit materyalin ana bileşenlerinin galaktoz, galaktozamin, ramnoz ve fosfat olduğu belirlendi. Ayrıca, *L. lactis* subsp. *lactis* MA83 suşunda Ø1a2, Øp78, Ør4 ve Øp81 fajlarının almaç bölgelerinin protein yapıda olduğu saptandı.

ABSTRACT: Adsorption of phages to *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA83 were inhibited by the exopolysaccharide material that produces in the presence of 32.7 kb plasmid. Major constituents of the exopolysaccharide were determined as galactose, galactosamine, rhamnose and phosphate by the end of chemical analysis. Moreover receptor sites on *L. lactis* subsp. *lactis* MA83 strain for phages Ø1a2, Øp78, Ør4 and Øp81 were found to be protein in nature.

GİRİŞ

Lactococcus lactis (*L. lactis*) suşları, süt fermentasyonlarında starter kültürler olarak kullanılmaktadır. Bu bakteriler, başta değişik tip peynirler olmak üzere çok sayıda fermente süt ürününün yapısal ve duyu-sal gelişimi ve mikrobiyel kontaminasyonlardan korunmasında, bir başka deyişle ürünün toplam kalitesi üzerinde, aktif rol oynamaktadır (DALY ve ark., 1996; JOLLY ve STINGELE, 2001). *L. lactis* suşları faj enfeksiyonlarına yüksek düzeyde duyarlıdır. Faj enfeksiyonu sonucu laktik asit üretimi yavaşlamakta, ürün miktarı ve kalitesi olumsuz yönde etkilenmektedir (KOK, 1996). Hammaddenin steril olmaması, sıvı doğası ve saf kültürlerin sürekli kullanımı gibi nedenlerle, süt fermentasyonlarında faj kontaminasyonlarından korunmanın en etkin yolu, faj dirençli starter kültürlerin seçimi ve geliştirilmesidir (ALLISON ve KLAENHAMMER, 1998). *L. lactis* suşlarında tanımlanan faj dirençlilik sistemleri içerisinde, endüstriyel starter kültürlerde kullanım açısından en önemli potansiyele sahip olanı, faj adsorbsiyonunun engellenmesidir. Çünkü bu dirençlilik sisteminde faj-konakçı bakteri ilişkisi ilk aşamada engellenmektedir (DUNNY ve ark., 1988; VALYASEVI ve ark., 1991; MONTEVILLE ve ark., 1994). Faj adsorbsiyonunun engellenmesi tipte dirençlilik sisteminin, starter kültür suşlarına sağladığı bu emsalsiz avantaja rağmen, genetik ve biyokimyasal doğası oldukça karmaşıktır. Ayrıca söz konusu dirençlilik sistemi; faj almaç bölgesinin bileşimi ve bu bölgeyi maskeleyen materyalin doğası gibi nedenlerle, faj tipine bağlı etkinlik değişimi gösterebilmektedir (BOUMERDASSI ve ark., 1997; LOOJEISTEIJN ve ark., 1999; AKÇELİK ve ark., 2001). Faj adsorbsiyonunun engellenmesinin starter kültür suşlarında güvenilir ve stabil bir dirençlilik sistemi olarak kullanılabilmesi, faj-konakçı yüzey etkileşiminin detaylı bir şekilde bilinmesi ile doğru orantılıdır (DUBOC ve MOLLET, 2001; AKÇELİK ve ŞANLIBABA, 2002).

Bu çalışmada, Türkiye' de geleneksel süt fermentasyon ortamlarında dominant olarak saptanan dört farklı *L. lactis* fajına karşı adsorbsiyonun engellenmesi tipte dirençlilik gösteren *L. lactis* subsp. *lactis* MA83 suşunda, söz konusu özelliğin genetik ve biyokimyasal doğası araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Araştırmada kullanılan bakteri ve fajlar Türkiye' nin değişik bölgelerindeki klasik işletmelerden sağlanan çiğ süt ve peynir altı suyu örneklerinden izole edilerek tanımlanmıştır (KOÇER ve AKÇELİK, 2003). Bakteri stokları M17 dik agar ortamında (TERZAGHI ve SANDINE, 1975) + 4 °C' de ve litmus süt ortamında - 20 °C' de saklanmıştır. Laktoz fermentasyon yeteneğini kaybetmiş *L. lactis* mutantları, glukozlu M17 broth (GM17) besiyerinde geliştirilmiştir. Laktik fajlar M17 broth ortamlarında % 15 gliserol ilave edilerek - 4 °C de saklanmıştır.

Metot

Faj biyodenemeleri

Faj lizatlarının eldesi ve faj titrelerinin belirlenmesinde TERZAGHI ve SANDINE (1975), Faj adsorbsiyon oranlarının saptanmasında ise, LUCEY ve ark. (1992) tarafından önerilen yöntemler kullanılmıştır.

Analitik yöntemler

Bakterilerden ekzopolisakkarit yapı izolasyonunda SIJTSMA ve ark. (1990) tarafından önerilen kloroform/metanol ekstraksiyonu yöntemi kullanılmıştır. İzole edilen ekzopolisakkarit materyalde standart fosfor (CHEN ve ark., 1956), karbonhidrat (ASHWELL, 1957) ve protein (BRADFORD, 1976) analizleri yapılmıştır. Ekzopolisakkarit yapının şeker monomerlerinin tanımlanmasında ise yüksek basınç sıvı kromatografisi yönteminden yararlanılmıştır (Aminex HPX87H column. Bio-Rad Laboratories, Richmond CA, USA) (KENNEDY ve SHUTHERLAND, 1987).

Plazmid DNA ve hücre yüzey proteinlerinin analizi

Araştırmada plazmid giderme ajanı olarak akriflavin kullanılmıştır ve laktoz fermentasyon yeteneğini yitirmiş mutantlar (Lac⁻) laktoz indikatör agar ortamında seçilmiştir (McKAY ve ark., 1980). Doğal suş ve mutantlarda plazmid analizleri, ANDERSON ve McKAY (1983) tarafından önerilen alkali liziz yöntemine göre yapılmıştır. Elektroforez % 0.7 agaroz oranı ile hazırlanan jel sistemlerinde gerçekleştirilmiş ve plazmid büyüklükleri cccDNA marker' lar (Sigma Chem. Co., USA) kullanılarak saptanmıştır.

Hücre lizatlarının sağlanması ve yüzey yapılarının izolasyonunda SCHAFFER ve ark. (1991) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Yüzey proteinleri ise sodyum dodezil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile tanımlanmıştır (LAEMMLI, 1970). Protein büyüklükleri, protein marker' lar (Sigma Chem. Co., USA) kullanılarak belirlenmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

L. lactis subsp. *lactis* MA83 suşunda ekzopolisakkarit oluşumu ile faj dirençlilik arasındaki ilişki, faj adsorbsiyon testleri sonucu saptanmıştır. Ekzopolisakkarit üretme yeteneğindeki doğal suşta, Türkiye kökenli dominant fajlar Øla2, Øp78, Ør4 ve Øp81'e (AKÇELİK ve ark., 2001) karşı tam dirençlilik belirlenirken, bu suşun laktoz fermentasyonu ve ekzopolisakkarit üretimi yeteneklerini kaybetmiş (Lac⁻/Eps⁻) mutantında (MA83-28) faj adsorbsiyonunun % 97.2 - % 99.4 oranlarına yükseldiği saptanmıştır (Çizelge 1). Bu sonuçlar; MA83 suşunda ekzopolisakkarit yapının, faj adsorbsiyonunu engelleyerek, tam dirençliliğin sağlanmasında rol oynadığını kanıtlamaktadır. DEVEAU ve ark. (2002) tarafından yapılan araştırmada, ekzopolisakkarit

Çizelge 1. Ekzopolisakkarit Üretme Yeteneğindeki *L. lactis* Subsp. *lactis* MA83 Suşu ve Bu Özelliği Kaybetmiş Mutantında (MA83-28) Faj Adsorbsiyonu.

Bakteriler	Adsorbsiyon (%)			
	Øla2	Øp78	Ør4	Øp81
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>				
MA83	—	—	—	—
MA83-28	98.6	97.2	99.4	97.6

yapının faj adsorbsiyonu üzerinde etkin olmadığı ileri sürülmüştür. Diğer yandan, çok sayıda literatür verisi, bizim araştırmamızda da belirttiğimiz gibi, ekzopolisakkarit yapının özellikle faj adsorbsiyonunun engellenmesinde rol aldığını desteklemektedir (HILL, 1993; ALLISON ve KLAENHAMMER, 1998; DE VUYST ve

Çizelge 2. *L. lactis* subsp. *lactis* MA83 Suşunun Ürettiği Ekzopolisakkarit Yapının Kimyasal Bileşimi.

Bileşik	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MA83	
	Miktar (µg/100mg kuru hücre için)	Ekstrakte Edilen Toplam Ekzopolisakkarit (%)
Toplam Ekzopolisakkarit	6.95	100
Karbonhidrat	3.72	49.9
Fosfat	0.70	9.3
Protein	-	-

DEGEEST, 1999). *L. lactis* subsp. *lactis* MA83 suşunda faj adsorbsiyonunun engellenmesinde rol alan ekzopolisakkarit yapının analizi sonucunda, ana bileşen olan karbonhidratlar yanında fosfat içerdiği de saptanmıştır. Yapı içerisinde protein özellikle materyal tanımlanmamıştır (Çizelge 2). Yüksek basınç

sıvı kromatografisi yöntemi ile yapılan analitik çalışmalarda ise söz konusu karbonhidrat yapının molar oranları sırasıyla 3.3/1.8 ve 0.7 olan galaktoz / galaktozamin ve ramnozdan oluştuğu saptanmıştır (Çizelge 3). Bu bulgular, laktokok suşlarında tanımla-

Çizelge 3. *L. lactis* subsp. *lactis* MA83 Suşunun Ürettiği Ekzopolisakkarit Materyalin Monosakkarit Bileşimi.

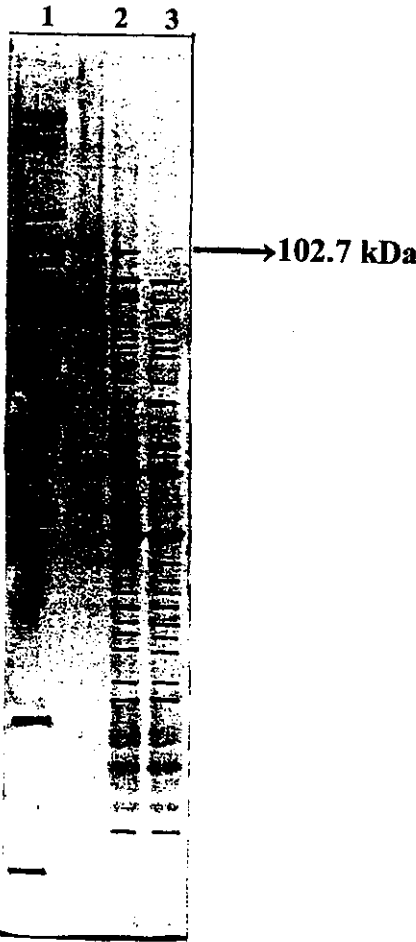
Monosakkarit	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MA83	
	Miktar (µg/100mg kuru hücre için)	Molar Oran
Galaktoz	284.4	3.3
Galaktozamin	157.3	1.8
Ramnoz	62.1	0.7

nan ve hücre yüzeyi ile gevşek ilişkili olan ekzopolisakkarit yapıların bileşimi ile büyük ölçüde paralellik göstermektedir (SIJTSMA ve ark., 1990, VAN KRANENBURG ve ark., 1999, DEVEAU ve ark., 2002). Ekzopolisakkarit yapının üretiminde rol alan genetik determinantın tanımlanmasında mutasyon testleri kullanılmıştır. Akriflavin uygulanarak laktöz indikatör agar ortamlarında seçilen, ekzopolisakkarit üretimi ve laktöz fermentasyonu özelliklerini sürdürmeyen mutantın (Lac^- ve Eps^-) ve bu özellikleri içeren doğal suşun plazmid analizi sonucunda; Lac^- ve Eps^- mutantın sadece 32.7 kb büyüklükteki plazmidini kaybettiği belirlenmiştir (Çizelge 4). Bu bulgu, *L. lactis* subsp. *lactis* MA83 suşunda laktöz fermentasyonu ve ekzopolisakkarit üretimi özelliklerinin 32.7

Çizelge 4. *L. lactis* subsp. *lactis* MA83 Doğal Suşu ve Bu Suşun Laktöz Fermentasyonu ve Ekzopolisakkarit Üretme Yeteneğini Yitirmiş Mutantında (Lac^- , Eps^- ; MA83-28) Plazmid İçerikleri.

Bakteriler	Plazmid (kb)*
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MA83	44.3, 32.7, 19.6, 16.2, 10.4, 9.1, 4.0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MA83-28	44.3, 19.6, 16.2, 10.4, 9.1, 4.0

*kb; Kilobaz



Şekil 1. *L. lactis* subsp. *lactis* MA83 suşunun ekzopolisakkarit üretme, laktöz fermentasyonu yeteneğini kaybetmiş (Eps^- / Lac^-) ve faj duyarlı (Φ^S) mutant suşu (MA83-28) ve bu suşun faj dirençli (Φ^R) türevinin (MA83-28-T) protein içerikleri. 1: Protein marker, 2: MA83-28; 3: MA83-28-T.

kb büyüklükteki plazmid tarafından kodlandığının kanıtıdır. Laktokoklarda, bazı istisnalar söz konusu olsa da bu iki özelliğin gen kodu genellikle aynı plazmidler üzerinde taşınmaktadır (SIJTSMA ve ark., 1990; LUCEY ve ark., 1992; DEVEAU ve ark., 2002).

Araştırmada son olarak, Lac⁻/Eps⁻ MA83-28 mutantında faj tutunma materyali araştırılmıştır. Bu doğrultuda, öncelikle sınırlı proteolitik enzim uygulaması ile oluşturulan türev suşun (MA83-28-T) faj adsorbsiyon özellikleri incelenmiştir. MA83-28-T suşunda denenen dört faja karşı yeniden direnç meydana gelmiştir (bu bulgular ile ilgili çizelge verilmemiştir). MA83-28 ve MA83-28-T suşlarının hücre yüzey proteinleri araştırıldığına; iki suş arasındaki başlıca yüzey protein farklılığının 102.7 kDa moleküler ağırlıktaki proteinden ileri geldiği saptanmıştır (Şekil 1). Bu bulgu da *L. lactis* subsp. *lactis* suşunda faj adsorbsiyon materyalinin protein yapıda olduğunun kanıtıdır. Laktokoklarda faj almaç bölge materyalinin protein yapıda olması nadir rastlanılan bir durumdur (ORAM, 1971; KRAUS ve GELLER, 1998). Bu açıdan *L. lactis* subsp. *lactis* MA83 suşu ilginç bir bakteridir. Diğer yandan araştırılan özelliklerin plazmid kodlu oluşu, MA83 suşunu moleküler manipülasyonlara uygun hale getirmektedir. Sonuç olarak, söz konusu bakteri faj dirençli starter kültür çalışmaları için ideal model organizma özellikleri taşımaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından, "Lactococcus lactis subsp. lactis MA83 da Faj Adsorbsiyon İnhibisyon Mekanizmasının Hücre Yüzey Karakteristikleri ile İlişkisi" (20010711042) adlı proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- AKÇELİK, M., P. ŞANLIBABA, Ç. TÜKEL, Y. TUNCER. 2001. Laktokoklarda endüstriyel açıdan önem taşıyan özelliklerin genetik determinantları. Tr. J. Veterinary and Animal Sci., 25: 615-621.
- AKÇELİK, M., P. ŞANLIBABA. 2002. Characterization of an exopolysaccharide preventing adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MA39. Turk J. Vet. Anim. Sci. 26: 1151-1156.
- ALLISON, G.E., T.R. KLAENHAMMER. 1998. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 8: 207-226.
- ANDERSON, D.G., L.L. MCKAY. 1983. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 46: 549-552.
- ASHWELL, G. 1957. Colorimetric analysis of sugars. Methods enzymol. 3: 73-105.
- BOUMERDASSI, H., C. MONNET, M. DESMAZEAUD, G. CORRIEU. 1997. Isolation and properties of *L. lactis* subsp. *lactis* CNZR483 mutants. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2293-2299.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- CHEN, P.S., T.Y. TORRIBARA, H. WARNER. 1956. Microdetermination of phosphorus. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- DALY, C., G.F. FITZGERALD, R. DAVIS. 1996. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. Ant. Leeuwen. 70: 99-110.
- DE VUST, L., B. DEGEEST. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 23: 153-177.
- DEVEAU, H., M.R. CALSTEREN, S.MOINEAU. 2002. Effect of exopolysaccharides on phage-host interactions in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4364-4369.
- DUBOCK, P., B. MOLLET. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. Int. Dairy J. 11: 759-768.
- DUNNY, G. M, D.A. KRUG, C.L. PAN, R.A. LEDFORD. 1988. Identification of cell wall antigens associated a large conjugative plasmid. Biochimie, 70: 443-450.
- HILL, C. 1993. Bacteriophage in dairy starter culture technology. Food technology, 38: 41-50
- JOLLY, L., F. STINGELE. 2001. Molecular organization and function of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 11: 733-745.
- KENNEDY, F.D., I.W. SHUTHERLAND. 1987. Analysis of bacterial exopolysaccharides. Biotech. Appl. Biochem. 9: 12-19
- KOÇER, E., M. AKÇELİK. 2003. Conjugal transfer and stability of plasmids, determining exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* strains. Tr. J. Veterinary and Animal. Sci. In Press.
- KOK, J. 1996. Inducible gene expression and environmentally regulated genes in lactic acid bacteria. Ant. Leeuwen. 70: 129-145.
- KRAUS, J., B.L. GELLER. 1998. Membrane receptor for prolate phages is not required for infection of *Lactococcus lactis* by small or large isometric phages. J. Dairy Sci. 81: 2329-2335.

- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LOOIJESTEIJN, P.V., I.C. BOELS, M. KLEEREBEZEM., J. HUGENHOLTZ. 1999. Regulation of exopolysaccharide production by *L. lactis* sbsp. *cremoris* by the sugar source. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5003-5008.
- LUCEY, M., C. DALY, G.F. FITZGERALD. 1992. Cell surface characteristics of *Lactococcus lactis* harbouring pCI528, a 46 kb plasmid encoding inhibition of bacteriophage adsorption. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2137-2143.
- McKAY, L.L., K.A. BALDWIN, P.M. WALSH. 1980. Conjugal transfer of genetic information in group N Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 68-74.
- MONTEVILLE, M.R., B. ARDESTANI, B.A. GELLER. 1994. Lactococcal phages require a host cell wall carbohydrate and a plasma membrane protein for adsorption and ejection of DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3204-3211.
- ORAM, J.D. 1971. Isolation and properties of a phage receptor substance from the plasma membrane of *Streptococcus lactis* ML3. *J. Gen. Virol.* 13: 59-71.
- SCHAFFER, A., A. GEIS, H. NEVE, M. TEUBER. 1991. Bacteriophage receptors of *L. lactis* F7/2 and *L. cremoris* Wg2-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 78: 69-74.
- SIJTSMA, L., N. JANSEN, T. WOUTERS. 1990. Isolation and characterization of lipoteichoic acid from *L. cremoris* SK110. *J. Bacteriol.* 172: 7126-7130.
- TERZAGHI, B.E., W.E. SANDINE. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 29: 807-813.
- VALYASEVI, R., W.E. SANDINE, B.L. GELLER. 1991. A membrane protein is required for bacteriophage c2 infection. *J. Bacteriol.* 173: 6095-6100.
- VAN KRANENBURG, R.H., I. SWAM, M. KLEEREBEZEM, W.M. DE VOS. 1999. Functional analysis of glucosyltransferase genes from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 181: 6347-6353.