

***Lactobacillus bulgaricus* FAJLARININ RESTRIKSİYON FRAGMENT UZUNLUK POLİMORFİZMİ, PROTEİN PROFİLLERİ VE KONAKÇI ÖZGÜLLÜKLERİNE GÖRE TANIMLANMASI**

Esra Acar Soykut¹, Nezihe Tunail²

¹Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

²Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 15.08.2013

Kabul tarihi / Accepted: 24.09.2013

Özet

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* suşlarına etkili 19 adet faj, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP), yapısal protein şablonları ve konakçı spektrumlarına göre tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Fajlar, farklı süt ürünlerinden *L. bulgaricus* starter kültürleri (Y4, V1 ve V2) ile izole edilmiştir. Konakçı spektrumunun belirlenmesi için; doğal ve ticari *L. bulgaricus* suşlarının *L. bulgaricus* V1 ve V2 fajları ile *S. thermophilus* B3 fajlarına duyarlılıkları test edilmiştir. Doğal *L. bulgaricus* suşlarının tamamının, *L. bulgaricus* fajlarının hepsine duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte bazı doğal *L. bulgaricus* suşlarının, *S. thermophilus* fajlarına duyarlı olduğu ve heterolog konakçı görevi gördüğü anlaşılmıştır. Çalışılan bu *L. bulgaricus* fajlarının yapısal protein profilleri ortaya çıkarılmış, fajların iki veya üç major (29.6, 29.2, 26.2 kDa) ve ortak olan üç minor (100.8, 65, 50 kDa) yapısal proteine sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu fajlara ait DNA'lar *EcoRI*, *PvuII*, *HindIII*, *HbaI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesime alınmıştır. Oluşan fragmentler doğrultusunda fajlar gruplara ayrılmıştır. Kesim sonucu oluşan fragmentlerin toplamından faj genom büyüklüklerinin 29–34 kb arasında olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Lactobacillus bulgaricus*, faj, konakçı spektrumu, protein profilleri, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi

IDENTIFICATION OF *Lactobacillus bulgaricus* PHAGES ACCORDING TO THEIR RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISIM, PROTEIN PROFILES AND HOST SPECTRUM

Abstract

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) and structural protein patterns and host spectrum analysis were used for identification and classification of nineteen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages. They were isolated from different dairy product using *L. bulgaricus* starter cultures (Y4, V1, and V2). For the determination of host spectrum, natural and commercial *L. bulgaricus* strains to both of *L. bulgaricus* V1, V2 phages and *Streptococcus thermophilus* B3 have been investigated. It has been observed that natural *L. bulgaricus* strains have shown to be sensitive to *L. bulgaricus* phages. Besides, some of natural *L. 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 *L. bulgaricus* phages. They have 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 three groups based on major protein bands. These phage DNA's were digested with *EcoRI*, *PvuII*, *HindIII*, *HbaI*, *BamHI* restriction enzymes. The phages have been divided into groups according to fragment profiles. The genome size that ranges from 29-32 kb was calculated according to DNA fragment sizes.

Keywords: *Lactobacillus bulgaricus*, phage, host spectrum, protein profiles, restriction fragment length polymorphism

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

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

Bu makale birinci yazarın Doktora tezinin bir bölümüdür. *This paper is a part of first author's PhD thesis*

GİRİŞ

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* ile birlikte yoğurt üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bir kültürün yoğurt üretiminde starter kültür olabilmesi için bazı özelliklerinin belirlenmesi gerekir. Bu özellikler; bakterilerin, laktik asit ve asetaldehit üretim seviyeleri ile proteolitik ve antimikrobial aktiviteleridir (1). Ayrıca suşların lizogenik karakterde olmaması ve fajlara dirençli olması istenmektedir (2, 3).

Termofilik fajlar hakkındaki bilgilerimiz, laktokok fajları ile kıyaslandığında sınırlıdır (4–6). Termofilik fajlar o dönemlerde daha az faj ataklarına sebep olduklarından, *S. thermophilus* fajı 1952-1953 yıllarında (7), *L. bulgaricus* fajı ise 1974 yılında (8) izole edilebilmiştir. Dolayısıyla çalışmaya geç başlanmış ve daha az bilgi toplanabilmiştir (9). Buna ek olarak, özellikle *L. bulgaricus* fajlarının izolasyonlarının ve plaklarının görülmesinin güç olduğu bilinmektedir. Buna rağmen *L. bulgaricus* fajlarının sınıflandırılması ve tanımlanması için yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında fajlar, morfolojik yapılarına, konakçı dizgelerine, serolojik özelliklerine, protein profilleri ile restriksiyon kesim şablonlarına ve DNA hibridizasyon sonuçlarına göre karakterize edilmiş ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır (4, 8, 10–16). Günümüze kadar yapılan tüm çalışmalarda, bu fajlar morfolojik olarak Bradley sınıflamasına göre B grubuna ve Ackermann sınıflamasına göre de Siphoviridae familyasına dâhil edilmiştir. Sadece Reinbold ve arkadaşlarının izole ettiği tek bir *L. bulgaricus* fajının, Myoviridae familyasına ait olduğu saptanmıştır (8).

Faj tanımlama ve sınıflama çalışmaları fajların evrimsel gelişimlerini belirlemek için yapılmaktadır. Ayrıca tıp ve endüstride kullanılacak faydalı fajların tespiti için de sınıflama yapılmaktadır (17). Fermentasyon proseslerine gelince ise faja dirençli kültürlerin belirlenmesi, bu kültürden faj direnç geninin duyarlı suşlara aktarılması ve rotasyon programının yapılabilmesi için sınıflama ve tanımlama yapılmaktadır.

Ülkemizde faj izolasyonu, tanımlanması ve sınıflamasına yönelik çalışmalar oldukça azdır. Bu çalışma ile hem bu eksikliği gidermek hem de süt fabrikalarının yaşadığı faj problemlerinin

çözümüne yönelik alt yapı oluşturmak amaçlanmaktadır. Bu kapsamda çeşitli süt ürünlerinden izole edilmiş, morfolojik yapıları belirlenerek koleksiyonumuza eklenmiş 19 adet *L. bulgaricus* fajı, konakçı özgüllükleri, restriksiyon enzimi kesim şablonları ile major ve minor protein profilleri dikkate alınarak tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Kimyasallar ve besiyerleri

Sodyum klorür, gliserol, izopropanol, metanol, SDS, MRS Broth, M17 Broth ve Agar, Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. DNAaz I, RNAaz A, PEG 6000, agaroz, protein basamakları ve kesim enzimleri Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, ABD) firmasından alınmıştır. Faj DNA izolasyonu için, Qiagen (Almanya) marka Lamda DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

Kültürler ve fajlar

Bu çalışma kapsamında, endüstriyel *L. bulgaricus* Y4, V1 ve V2 suşları ile izole edilmiş toplam 19 adet faj kullanılmıştır. Fajlar, 43 °C'de MRS Broth besiyerinde geliştirilmiştir. Faj titreleri, çift tabaka agar yöntemiyle, MRS agar (% 1.5) ve MRS yumuşak agar (% 0.45) kullanılarak belirlenmiştir. Fajlar, Y4, V1 ve V2 *L. bulgaricus* suşları ile yoğurt, kaşar peynir altı suyu ve bulk kültürden izole edilmiştir. Fajlar, konakçıları da belirtecek şekilde adlandırılmıştır, örneğin ΦY4-X1 gibi. Ayrıca, konakçı spektrumlarının belirlenmesi için 13 adet *L. bulgaricus* doğal suşu ve 10 adet *S. thermophilus* B3 fajı kullanılmıştır. Söz konusu fajlar, yine çift tabaka agar yöntemiyle M17 Broth, modifiye M17 Agar ve modifiye M17 Yumuşak Agar (% 0.6) kullanılarak geliştirilmiş ve titreleri belirlenmiştir.

Konakçı spektrumu

Fajların konakçı spektrumlarını belirlemek için pastörize süttten izole edilmiş 12 adet doğal ve bir adet ticari *L. bulgaricus* suşu ile *S. thermophilus* B3 and *L. bulgaricus* 231, V1, V2 fajları kullanılmıştır. Çift tabaka agar ortamında, 10⁷-10⁸ pfu/ml faj partikülü içeren 10 µl faj lizatu, *L. bulgaricus* suşu içeren Petri kabındaki yumuşak agar üzerine damlatılarak spot test uygulanmıştır. Petrieler, 43°C 'de 18 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Fajların saflaştırılması ve konsantre edilmesi

Faj saflaştırılması ve konsantrasyonu, Sambrook ve ark. tarafından tanımlanan yöntemle yapılmıştır (19). Fajın konakçısı ile çoğaltılmasından sonra, elde edilen faj-konakçı karışımı, kültür atıklarından arındırmak amacıyla 6000 rpm devirde 4 °C 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, bakteriyel DNA ve RNA 'nın ortamdan uzaklaştırılması için, faj süpernatantı (üst faz) üzerine DNAaz I ve RNAaz A eklenmiştir. Bu işlemi takiben, faj lizatları bakteriyel atıklardan arındırmak amacıyla NaCl çözeltisi ile karıştırılmış ve faj peletlerinin elde edilmesi için ortama PEG 6000 eklenmiştir. Faj peletleri, faj tamponu çözeltisi içerisinde yeniden çözündürülmüştür. Ortama eşit hacimde kloroform eklenerek, PEG ve bakteriyel atıkların uzaklaştırılması sağlanmıştır. 9000 rpm devirde 4 °C 'de 15 dakikalık bir santrifüj sonrasında, fajı içeren üst faz temiz tüplere aktarılmıştır.

SDS-PAGE analizleri

Fajlara ait protein profillerini çıkarmak amacıyla, kesintili SDS-PAGE sistemi kullanılmış, % 5 yığılma jeli ve % 12.5 ayırma jeli hazırlanmıştır (19). Saflaştırılmış ve yoğunlaştırılmış faj peletine 40–100 µl arası SDS-PAGE örnek yükleme tamponu eklenmiş ve 100 °C 'de 5 dakika kaynatıldıktan sonra, 35–40 µl örnek jele yüklenmiştir. SDS-PAGE uygulaması, 25–30 mA ve 125–150 V elektrik akımında gerçekleştirilmiştir [20]. Protein bantlarının tanımlanması ve boyanması için, Bushuk ve ark. tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Faj protein büyüklükleri, Biais Ltd. tarafından geliştirilen EJA–09 programı ile, 205–66 kDa ve 66–6.5 kDa'luk proteinler kullanılarak hesaplanmıştır.

Faj DNA'sının izolasyonu ve RFLP

Faj DNA 'ları Qiagen Lamda DNA izolasyon kiti ile izole edilmiştir. Bunun için önce faj titreleri 10^9 - 10^{10} pfu/ml'a kadar yükseltilmiştir. Bakteriyel DNA ve RNA 'nın uzaklaştırılması için faj filtratlarına DNAaz ve RNAaz enzimleri eklenmiştir. Sonrasında, faj partikülleri PEG 6000 ile konsantre edilmiştir. SDS ilavesiyle, faj proteinlerinin parçalanması ve DNA moleküllerinin açığa çıkması sağlanmıştır. Reçine kolonlara tutunan DNA, yıkama tamponuyla kolondan ayrılmış ve izopropanol ile görünür hale getirilmiştir. Son olarak, DNA %70 'lik etanol çözeltisi ile yıkanmış ve ortamda kalan tuzlardan arındırılmıştır. DNA pelleti, steril çift distile suda

tekrar çözülmüştür. Elde edilen DNA örnekleri, % 0.8-1 'lik agaroz jelde 60 Volt'ta yürütülmüştür.

RFLP analizi için, 19 adet faj DNA'sı, *EcoRI*, *PvuII*, *HindIII*, *HbaI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi alınmıştır. Oluşan DNA fragmentleri, % 0.8-1'lik agaroz jele yüklenerek, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı bünyesindeki GelLogic100 görüntüleme sistemiyle görüntülenmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

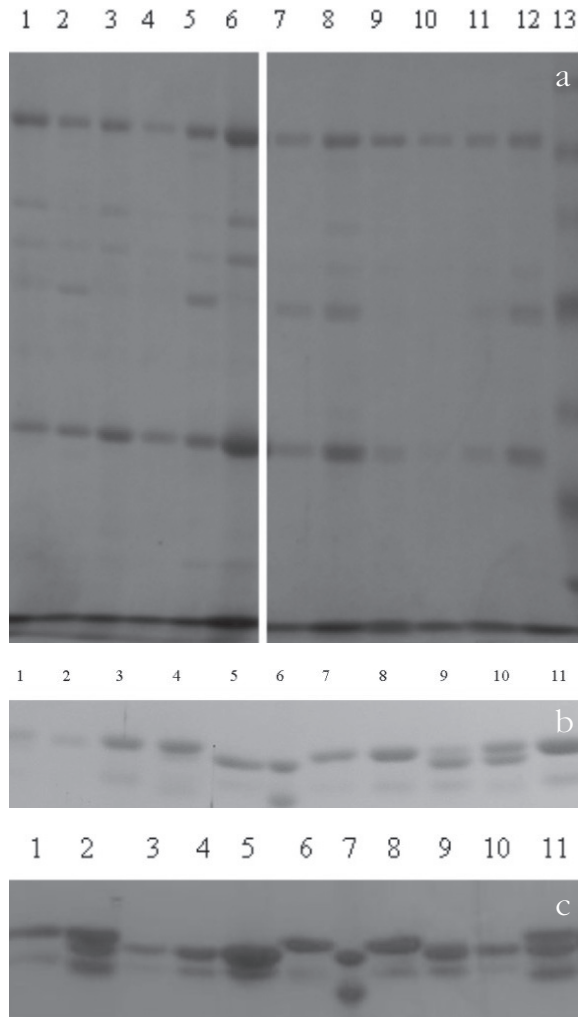
Konakçı spektrumu

Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda, fajlar konakçı spektrumlarına göre kendi içlerinde sınıflandırılmış hatta izole edildikleri bölgelere göre konakçı spektrumu gösterdiklerine dair bilgiler verilmiştir (22, 23). Ancak aynı konakçı spektrumuna sahip fajların farklı restriksiyon profili verebilmeleri veya farklı konakçılara etkili olanların aynı kesim profiline sahip olabilmeleri, konakçı özgüllüğü dikkate alınarak sınıflama yapılamayacağını göstermektedir (24). Buna rağmen fabrikalarda starter olarak kullanılacak kültürlerin rotasyona girebilmesi için bu fajların konakçı özgüllüklerine göre tanımlanması pratikte büyük yarar sağlamaktadır. Bu nedenle pastörize sütlerden izole edilmiş olan 12 adet *L. bulgaricus* yerel suşları, bir adet ticari suş (Ch-Lb12) ile birlikte, kendi türünün fajlarına karşı test edilmiştir. Denemeye alınan 13 fajdan, yalnızca ticari starter suşu Ch-Lb12 fajlara tam direnç gösterirken, diğer tüm yerel *L. bulgaricus* suşları tamamen duyarlı bulunmuştur. Dolayısıyla bu suşların diğer özellikleri (laktik asit, asetaldehit üretim yetenekleri gibi...) iyi olsa bile starter kültür olamayacakları ortaya çıkmıştır. Aynı suşlar, yoğurt üretiminde *S. thermophilus* ile miks halde kullanılmaya aday olduklarından, *S. thermophilus* fajları ile de karşılaştırılmıştır. 10 adet *L. bulgaricus* suşu, *S. thermophilus* fajlarına tam direnç sergilerken diğer üçünün liziz plakları oluşturdukları gözlenmiştir. Φ B3-X19, Lb1312–1 suşunu; Φ B3-X12, Φ B3-X13 ve Φ B3-X19, Lb1313–1 suşunu; Φ B3-X15 de Lb1433–1 suşunu türler arası heterolog konakçı olarak kullandığı düşünülmüştür.

Yapısal protein profilleri

L. bulgaricus Y4 starter suşu ile çeşitli süt

ürünlerinden izole edilmiş olan 12 adet fajın SDS-PAGE ile protein profilleri belirlenmiştir. Fajların tamamının 100.8, 50 ve 26.2 kDa'luk yoğunlukları fazla olan bantlara sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 1a). Bu bantlara ek olarak yoğunlukları farklı olsa da fajların tamamında 83 ve 73 kDa'luk proteinlerin de bulunduğu görülmüştür. Y4-X2, Y4-X5, Y4-X8, Y4-X9, Y4-X10, Y4-X12 fajlarının profillerinde ayrıca bu bantlara ek olarak 65 kDa'luk yoğun ek bir bantın varlığına



Şekil 1. *L. bulgaricus* fajlarının protein profilleri
 Figure 1. Protein profiles of *L. bulgaricus* phages
 a. Minor proteinler 1. ΦY4-X1, 2. ΦY4-X2, 3. ΦY4-X3, 4. ΦY4-X4, 5. ΦY4-X5, 6. ΦY4-X6, 7. ΦY4-X8, 8. ΦY4-X9, 9. ΦY4-X10, 10. ΦY4-X12, 11. ΦY4L-A, 12. ΦY4L-Z, 13. Marker, b. *L. bulgaricus* V1 ve V2 fajları major proteinler 1. ΦV1-X19, 2. ΦV2-X21, 3. ΦV2-X22, 4. ΦV2-X23, 5. ΦV2-X24, 6. Marker, 7. ΦV2-X25, 8. ΦV2-X26, 9. ΦV2-X27, 10. ΦV2-X28 c. *L. bulgaricus* Y4 fajları major proteinler, 1. ΦY4-X1, 2. ΦY4-X2, 3. ΦY4-X3, 4. ΦY4-X4, 5. ΦY4-X5, 6. ΦY4-X6, 7. Marker, 8. ΦY4-X7, 9. ΦY4-X8, 10. ΦY4-X9, 11. ΦY4-X10

rastlanmıştır. Ancak fajların sınıflamasında öncelikle majör proteinlerin varlığına ve büyüklüklerine bakılmaktadır. Bu çalışmada fajlardan bazılarının 29.6, 29.2 ve 26.2 kDa'luk üç banta, bazılarının ise 29.6 veya 29.2 ile 26.2 kDa'luk iki adet majör proteine sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 1b). *L. bulgaricus* V1 ve V2 suşları ile izole edilmiş fajlarda da Y4 fajlarında olduğu gibi yaklaşık 100, 65 ve 50 kDa büyüklüğünde protein bantları elde edilmiştir (Şekil 1a). Ayrıca sınıflamada esas alınan majör protein bant büyüklüklerinin benzer olduğu saptanmıştır (Şekil 1c). Dolayısıyla çalışılan fajların tamamı sahip oldukları majör proteinler dikkate alınarak 3 sınıfa ayrılmıştır (Çizelge 1). Şekil 1a'da protein profilleri verilen Y4L-A ve Y4L-Z kodlu fajlar, restriksiyon enzimleri ile kesimlerinin ayırt edici olmaması nedeniyle değerlendirmeye alınmamıştır.

Mata et al (1986) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. bulgaricus* lizogenik suşlarından izole edilen mv1 ve mv4 temperent fajlarının 34 ve 18 kDa, *Lactobacillus 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 (10). Bu çalışmada ise 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 (4).

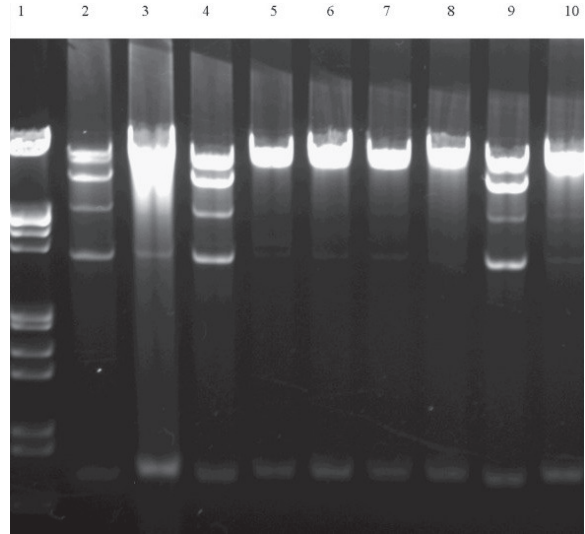
Çizelge 1. Faj grupları ve proteinlerin molekül ağırlıkları (kDa)
 Table 1. Phage groups and molecular weights of protein (kDa)

1. GRUP	2. GRUP	3. GRUP
ΦY4-X2	ΦY4-X3	
ΦY4-X1	ΦY4-X10	ΦY4-X4
ΦY4-X6	ΦV1-X19	ΦY4-X5
ΦV2-X24	ΦV2-X21	ΦY4-X8
ΦV2-X25	ΦV2-X22	ΦY4-X9
ΦV2-X28	ΦV2-X26	ΦY4-X12
	ΦV2-X27	ΦV2-X23
29.6	29.6	29.2
26.2	29.2	26.2
	26.2	

Restriksiyon endonükleaz kesim profillerine göre sınıflandırma

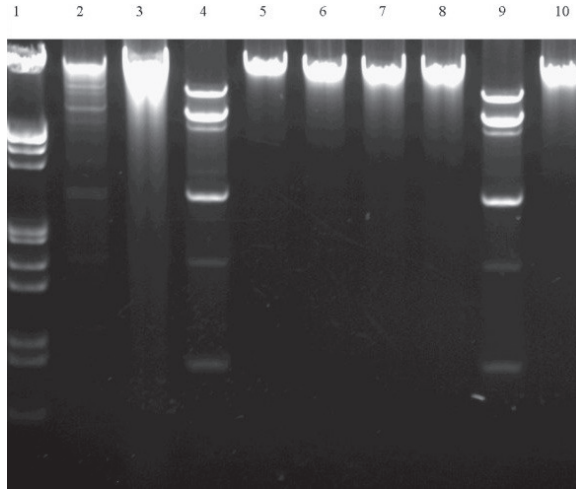
Endüstriyel *L. bulgaricus* suşlarına özgül 19 adet faj, *EcoRI*, *PvuII*, *HindIII*, *BamHI*, *HbaI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesime alınmış, oluşan fragment dizilimlerine göre fajlar sınıflandırılmıştır. Genomlar ilk olarak *EcoRI* enzimi ile kesime alınmıştır. Kesim sonucunda Y4-X2, Y4-X4, Y4-X5, Y4-X6, Y4-X8 ve Y4-X10 faj DNA'ları birinci grubu, geri kalan 13 adet faj ise ikinci grubu oluşturmuştur. İlk grubu oluşturan faj DNA kesim sonuçları incelendiğinde 4 temel fragment oluşumu dikkat çekmektedir. Diğer grupta ise 5 fragment oluşumu görülmektedir (Şekil 2). Şekil 2'de fajların tamamı değil grupları temsil etmesi açısından bazı fajların kesim sonuçları görülmektedir. *PvuII* ile kesim sonucunda ise yine *EcoRI* kesiminde alınan sonuçlara ulaşılmış, yani iki kesim birbirini doğrulamıştır. Bu sonuca varılmasının nedeni *PvuII*'nin, Φ Y4-X2, Φ Y4-X4, Φ Y4-X5, Φ Y4-X6, Φ Y4-X8 ve Φ Y4-X10 üzerinde kesim için ihtiyacı olan tanıma sekanslarının olmayışı ve diğer tüm faj genomlarının *EcoRI* kesiminde olduğu gibi birbiriyle aynı profili vermesidir (Şekil 3). *HindIII* 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 konakçılığı V2 *L. bulgaricus* olan fajlardan bazılarında da (Φ V2-X21, Φ V2-X22, Φ V2-X23 ve Φ V2-X26) kesim bölgesinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4). Bunlar dışında kalan ve tek bir grup oluşturan fajlarda ise ayırım gerçekleşmiştir. Y4-X1 fajı Φ V2-X24, Φ V2-X25, Φ V2-X28 ile 2. grubu oluştururken, Y4-X3, Y4-X9, Y4-X12, V1-X19, V2-X27 fajları tek başlarına birer grup oluşturmuştur. Bu durumda fajlar, *HindIII* kesimi sayesinde 7 gruba ayrılmıştır. Her bir grubu temsil eden faj genomlarının kesim sonuçları Şekil 4 verilmiştir. Faj genomlarının *HbaI* enzimi ile muamele edilmesinden sonra Y4-X1 fajının diğerlerinden farklı olduğu ilk bakışta dikkati çekmektedir. Φ Y4-X3, Φ Y4-X9 ve Φ Y4-12 bir grupta, V1-X19 fajı da ayrı bir grupta yer aldığı görülmüştür. *HbaI* enziminin de Φ Y4-X2, Φ Y4-X4, Φ Y4-X5, Φ Y4-X6, Φ Y4-X8 ve Φ Y4-X10 genomlarında kesim yapamadığı dikkat çekmiştir. Geri kalan diğer fajların da Φ Y4-X3'ün olduğu grupta yer aldığı düşünülmüştür. Böylece *PvuII* ve *EcoRI* kesimleri sonucunda aynı gruplarda yer alan fajlar farklı gruplara dağılmıştır. Grupları temsil eden bazı kesim sonuçları Şekil 5 de verilmiştir.

Son olarak faj genomları *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile reaksiyona sokulmuş ancak *S. thermophilus* fajlarında olduğu gibi *L. bulgaricus* faj genomları üzerinde de kesim dizilerinin olmadığı tespit edilmiştir (25). Kullanılan enzimlerden sadece *EcoRI* ile fragment oluşumu görülen Y4-X2, Y4-X4, Y4-X5, Y4-X6, Y4-X8 ve Y4-X10 fajlarının birbirinin aynı olabileceği düşünülse de bu altı faj, sahip oldukları major proteinler açısından 3'e ayrılmaktadır. Bu da birbirlerinden farklı olabileme ihtimallerinin çok yüksek olduğunu ve dizi analizi gibi daha detaylı bir çalışma yapılması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca bu fajlardan Φ Y4-X6'nın, *HindIII* ve *HbaI* kesimi ile diğer 18 fajdan ayrılan Y4-X1 ile minor proteinler de dahil aynı protein profilini verdiği görülmüştür. 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 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 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.

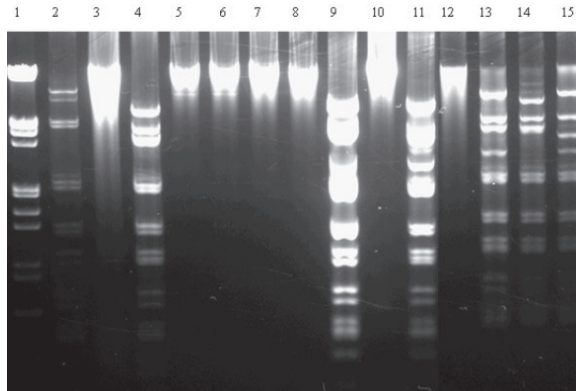


Şekil 2. *L. bulgaricus* faj DNA'larının *EcoRI* kesimi
Figure 2. Restriction of *L. bulgaricus* phage DNA with *EcoRI*
1. Marker, 2. Φ Y4-X1, 3. Φ Y4-X2, 4. Φ Y4-X3, 5. Φ Y4-X4, 6. Φ Y4-X5, 7. Φ Y4-X6, 8. Φ Y4-X8, 9. Φ Y4-X9, 10. Φ Y4-X10

Tüm kesim sonuçları değerlendirildiğinde çalışılan fajların genom büyüklüklerinin literatürde de verildiği gibi 29–34 kb arasında değiştiği görülmektedir (4, 10, 13, 14, 26, 27). Tükel vd. (2003) de bu çalışmada kullanılmış olan *L. bulgaricus* fajlarını *EcoRI* enzimi ile kesime almış ve genom



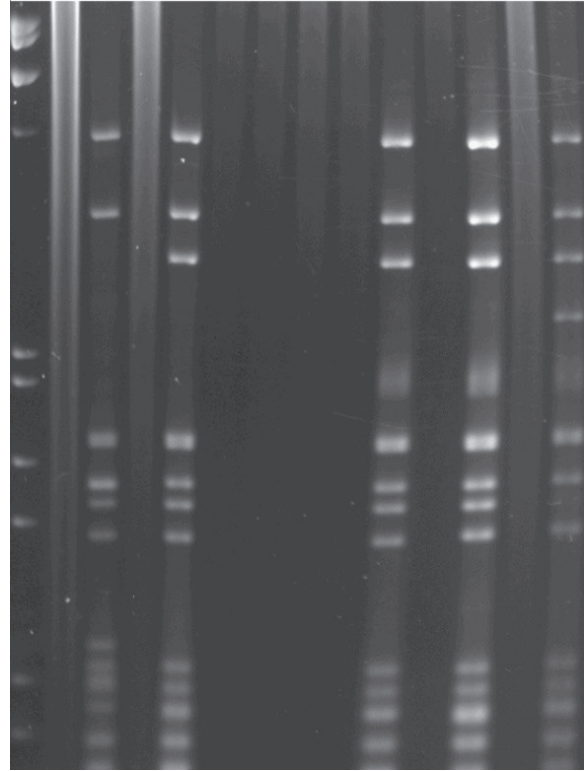
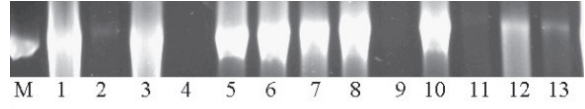
Şekil 3. *L. bulgaricus* faj DNA'larının *PvuII* kesimi
Figure 3. Restriction of *L. bulgaricus* phage DNA with *PvuII*
1. Marker, 2. ΦY4-X1, 3. ΦY4-X2, 4. ΦY4-X3, 5. ΦY4-X4,
6. ΦY4-X5, 7. ΦY4-X6, 8. ΦY4-X8, 9. ΦY4-X9, 10. ΦY4-X10



Şekil 4. *L. bulgaricus* faj DNA'larının *HindIII* kesimi
Figure 4. Restriction of *L. bulgaricus* phage DNA with *HindIII*
1. Marker, 2. ΦY4-X1, 3. ΦY4-X2, 4. ΦY4-X3, 5. ΦY4-X4,
6. ΦY4-X5, 7. ΦY4-X6, 8. ΦY4-X8, 9. ΦY4-X9, 10. ΦY4-X10,
11. ΦY4-X12, 13. ΦV1-X19, 14. ΦV2-X24, 15. ΦV2-X27.

büyükliklerinin 21 ve 72.2 kb arasında olduğunu belirtmiştir (28). Bu çalışmada ise aynı fajlara ait genomlar, sadece *EcoRI* enzimi ile değil, *PvuII* ve *HindIII* enzimleri ile de kesime alınmış, *EcoRI* ve *PvuII* enzimlerinin kesim yaptığı büyük grubun hep aynı fajlardan oluştuğu bulunmuş, genom büyüklükleri de *PvuII* ve *HindIII* enzimleri ile doğrulanmıştır.

HindIII, *SaI*, *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *HindIII*, *PvuII*, *HpaI*, *SmaI* restriksiyon endonüklez enzimleri, *Lactobacillus delbrueckii* fajları ile çalışılan enzimler olarak karşımıza çıkmaktadır (10, 13, 14, 26). Bu çalışma kapsamında ise *BamHI* enziminin



Şekil 5. *L. bulgaricus* faj DNA'larının *HhaI* kesimi
Figure 5. Restriction of *L. bulgaricus* phage DNA with *HhaI*
M: Marker,

1. ΦY4-X2 (kesim yapılmamış), 2. ΦY4-X1, 3. ΦY4-X2,
4. ΦY4-X3, 5. ΦY4-X4, 6. ΦY4-X5, 7. ΦY4-X6, 8. ΦY4-X8,
9. ΦY4-X9, 10. ΦY4-X10, 11. ΦY4-X12, 13. ΦV1-X19

çalışılan fajlar üzerinde tanıma bölgesi olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca *EcoRI* kesimi sonucu oluşan fragmentler büyüklükleri, Lahbib-Mansais vd. (1988) tarafından elde edilen *EcoRI* kesim fragmentleri karşılaştırılmış, ancak benzerlik bulunamamıştır (26). Bazı çalışmalarda kullanılan fajlar birbirleri ile restriksiyon profilleri açısından benzerlik gösterse de (10, 26), DNA hibridizasyon ve dizi analizleri sonucu birbirlerinden farklı oldukları görülmektedir (13, 14, 27).

Fragment homolojisi çalışılmadan, DNA ve amino asit dizi analizlerine girilmeden yapılan bu sınıflandırmalar bir başlangıç olarak kabul edilmektedir. 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 küçük farklılıklarının bile

ortaya çıkarılması, onların zaten birbiriyle aynı olmadıklarını göstermektedir. Bu da ortak atadan gelseler de zamanla genomlarında gerçekleşen nokta mutasyonları, kopma ve eklentileri doğrulamaktadır. Bu çalışma, restriksiyon kesim şablonları ve yapısal proteinleri birbirinden farklı olan bazı fajların tüm genom dizi analizlerinin yapıldığı TUBİTAK-TOVAG 110-O-035 nolu projenin alt yapısını oluşturmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma maddi açıdan TUBİTAK tarafından 106-O-003 numaralı proje ile desteklenmiştir. Ayrıca bilimsel desteğinden dolayı Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Tamime AY, Robinson RK. 1989. *Yogurt: Science and Technology*. Pergamon Press, Oxford.
2. Kaleli D. 2001. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* virulent fajlarının izolasyonu ve yoğurt starter kültürleri üzerine litik etkilerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye. 78 s.
3. Kahraman E. 2006. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarında lizogeninin araştırılması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye. 99 s.
4. Chow J, Batt CA, Sinskey AJ. 1988. Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage ch2 *Appl Environ Microbiol* 54 (5): 1138-1142.
5. Prevots F, Relano P, Mata M, 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.
6. Benbadis L, Faalen M, Slos P, Fazel A, Mercenier A. 1990. Characterization and comparison of virulent bacteriophages of *Streptococcus thermophilus* isolated from yogurt *Biochimie* 72: 855-862.
7. Rasic J, Kurmann AJ. 1978. *Yoghurt*. Technical Dairy Publishing House, DK-2720 Vanlose, Copenhagen, Denmark, 466 p.

8. Reinbold GW, Reddy MS, Hammond EG. 1982. Ultrastructures of bacteriophages active against *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus helveticus* *J Food Protection* 45 (2): 119-124.
9. Tunail N, Demirtaş D, Durlu-Özkaya F. 2000. Yoğurt fabrikalarında görülen bakteriyofaj problemi, nedenleri ve çözüm önerileri. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, 20-21 Mayıs 2000, Tekirdağ, Türkiye.
10. Mata M, Trautwetter A, Luthaud G, Ritzenthaler P. 1986. Thirteen virulent and temperate bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* belong to a single DNA homology group *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (4): 812-818.
11. Cluzel PJ, Veaux M, Rousseau M, Accolas JP. 1987. Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus* *J. Dairy Research* 54: 397-405.
12. Lahbib-Mansais Y, Boizet B, Dupont L, Mata M, Ritzenthaler P. 1992. Characterization of a temperate bacteriophage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and its interactions with the host cell chromosome *J. General Microbiol.* 138: 1139-1146.
13. Auad L, Raisanen L, Raya RR, Alatosava T. 1999. Physical mapping and partial genetic characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bacteriophage lb539 *Arch. Virol*, 144: 1503-1512.
14. Quiberoni A, Guglielmotti DM, Binetti A, Reinheimer JA. 2004. Characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages and the physicochemical analysis of phage adsorption *J Appl. Microbiol.* 96: 340-351.
15. Tunail N, Ayhan K, Akçelik M, Durlu Özkaya F, Doğan HB, Kaleli D, Tükel Ç, Acar E. 1997-2002. Yoğurt fabrikalarında faj probleminin çözümüne yönelik araştırmalar. TÜBİTAK/TARP-2106 Nolu Proje.
16. 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.

17. Ackermann HW. 2006, Classification of Bacteriophage. *The Bacteriophage*, 2nd, Calender R. (chief ed), Oxford University Press, USA, pp. 8-16.
18. Acar Soykut E, Tunail N. 2010. Morphological characterization of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* virulent phages *GIDA* 35 (5): 317-323.
19. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
20. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227: 680-685.
21. Bushuk W, Hay RL, Larsen NG, Sara RG, Simmons LD, Sutton KH. 1997. Effect of mechanical dough development on the extractability of wheat storage proteins from bread dough *Cereal Chem* 74: 389-395.
22. Krusch U, Neve H, Luschei B, Teuber M. 1987. Characterization of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by host specificity and electron microscopy. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 39 (3): 155-167.
23. Larbi D, Colmin C, Rousselle L, Decaris B, Simonet JM. 1990. Genetic and biological characterization of nine *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* bacteriophages *Lait* 70: 107-116.
24. Brüssow H, Frémont M, Bruttin A, Sidoti J, Constabla A, Fryder V. 1994. Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation *Appl Environ Microbiol.* 60 (12): 4537-4543.
25. Acar Soykut E, 2007. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* virulent fajlarının replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara, Türkiye. 176 s.
26. Sechaud L, Cluzel PJ, Rousseau M, Baumgartner A, Accolas JP. 1988. Bacteriophages of lactobacilli *Biochimie* 70: 401-410.
27. Tükel Ç, Halkman HB, Akçelik M, 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.
28. Lahbib-Mansais Y, Mata M, Ritzenthaler P. 1988. Molecular taxonomy of *Lactobacillus phages* *Biochimie* 70: 429-435.