

Molecular Studies on Bacteriophages of the Food Starter Culture *Streptococcus thermophilus*

M.Vet.Sci. Yahya Hasan Mahmoud Ali

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Heller

Bakteriophagen stellen ein großes Problem bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel dar, da sie die Starterkulturen infizieren und inaktivieren können. Die genaue Kenntnis der beteiligten Bakteriophagen ist Voraussetzung für deren effektive Bekämpfung.

Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde ein neuer temperenter *Streptococcus thermophilus* Phage – TP-778 - identifiziert und charakterisiert. TP-778 weist große Ähnlichkeit zu dem bereits in der Arbeitsgruppe charakterisierten Phagen TP-J34 auf. Ein gravierender Unterschied ist allerdings, dass der integrierte Prophage TP-778 keine „attR site“ aufweist: Bei der Induktion kommt es daher nicht zum Ausschneiden der Phagen-DNA an der normalerweise vorbestimmten „attachment site“, sondern an einer anderen, Homologie-aufweisenden DNA-Stelle. Dieses Phänomen wurde durch Charakterisierung eines lytisch vermehrten TP-778 Klons – TP-778L – nachgewiesen; als homologe Rekombinationsorte wurden eine interne Sequenz des TP-778 Integrase-Gens sowie eine entsprechende Sequenz in einem unvollständigen Integrase-Gen eines Phagen-„remnant“ identifiziert. Darüber hinaus konnte gezeigt, dass TP-778 in erheblichem Maße chromosomale DNA verpackt, die durch Transduktion somit übertragbar sein sollte.

Im zweiten Abschnitt wurde der Frage nachgegangen, ob das von TP-778 im Lysogeniemodul kodierte Lipoprotein Ltp_{TP-778} in ähnlicher Weise wie das des Phagen TP-J34 (Ltp_{TP-J34}) in der Lage ist, die Infektion von Phagen zu hemmen. Beide Lipoproteine unterscheiden sich in 10 von 142 Aminosäure-Positionen. Während Ltp_{TP-J34} in *Lactococcus lactis* die Infektion des Phagen P008 aber nicht die des Phagen P001 hemmt, ist es bei Ltp_{TP-778} genau umgekehrt: P001 wird gehemmt, nicht aber P008. Beide Ltp-Proteine besitzen daher das Potential als „food-grade“ Phagenresistenz-Marker in Starterkulturen Verwendung zu finden.

Um Phageninfektionen effizient bekämpfen zu können, ist es notwendig, die Infektion frühzeitig zu erkennen, solange noch geringe Phagentiter in der Kultur vorliegen. Im dritten Abschnitt der Arbeit wurde daher ein beschriebenes Multiplex-PCR-System für *S. thermophilus* Phagen getestet und validiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Nachweisgrenze des Systems bei 10^3 Phagen pro ml Sauermolke liegt. Bei Anwendung des Nachweis-Systems auf neue Phagen, wurde ein neuer Typus eines *S. thermophilus* Phagen entdeckt, der mit dem vorhandenen System nicht nachweisbar war.

Im vierten Abschnitt der Arbeit wurde dieser neue Phage P738 näher charakterisiert. Der Phage ist bemerkenswert, da er i) sich morphologisch von allen bisher bekannten *S. thermophilus* Phagen unterscheidet, ii) sich bei 40 °C, der optimalen Wachstumstemperatur von *S. thermophilus*, in Flüssigkultur nicht vermehrt (effiziente Lyse findet lediglich bei Temperaturen um 30 °C statt) und iii) auf DNA-Ebene keinerlei Ähnlichkeit zu bekannten *S. thermophilus* Phagen und zu *L. lactis* Referenzphagen aufweist. Durch Klonierung eines 2,8 kb und nachfolgende Sequenzierung eines 6,2 kb großen DNA-Fragments sowie durch MALDI-TOF MS Analyse der Strukturproteine des Phagen konnte das Hauptkopffprotein des Phagen identifiziert und dem entsprechenden Gen zugeordnet werden. Auf der Grundlage der DNA-Sequenz des Gens wurde das oben beschriebene Multiplex-PCR-System ergänzt, so dass nunmehr auch der neue Phage P738 mit diesem System nachweisbar ist.