

Optimierung von Joghurtkulturen

Zwei-Plasmide-System zur genetischen Veränderung von *Streptococcus thermophilus*

Hassan A. M. El Demerdash, Arnold Geis, Knut J. Heller (Kiel)



Dass Joghurt nicht gleich Joghurt ist, weiß jeder, der schon einmal die Vielfalt des Supermarktangebotes getestet hat. Von cremig mild bis säuerlich kräftig reicht die Geschmackspalette. Die Qualität der Endprodukte wird in erster Linie durch die Joghurtkulturen bestimmt. Die Joghurtproduzenten arbeiten deshalb zusammen mit Herstellern von Starterkulturen und in eigenen Labors an der Optimierung ihrer Kulturen. Im Institut für Mikrobiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel hat man neue Bakterienstämme gefunden, deren besondere Eigenschaften durch ein trickreiches Verfahren in industriell wichtige Stämme von Fermentationsbakterien übertragen werden können.

Viele technologische Eigenschaften von Milchsäurebakterien werden durch Gene vermittelt, die auf Plasmiden, kleinen ringförmigen DNA-Molekülen außerhalb des eigentlichen Bakterienchromosoms, lokalisiert sind (Abb. 1). Diese Plasmide können relativ gut zwischen verschiedenen Bakterien übertragen werden. Geschieht dieses durch natürliche Prozesse, liegt keine kennzeichnungspflichtige genetische Veränderung vor.

Sofern bei einer Plasmid-Übertragung – etwa auf industriell wichtige Stämme – auf gentechnische Verfahren zurückgegriffen werden muss, wird versucht, diese auf das absolut notwendige Minimum zu beschränken. Im nachfolgenden Beitrag stellen wir ein System vor, mit dem sich ein Plasmid aus einem Milchsäurebakterium, das die Eigenschaft „Hitzetoleranz“ codiert, so auf andere Stämme übertragen lässt, dass diese keine gentechnisch veränderte DNA enthalten.

Bedeutung des Hitzeschock-Gens für die Joghurtfermentation

Streptococcus thermophilus ist – wie sein Name schon sagt – ein wärmeliebendes Milchsäurebakterium, welches optimal bei 40–43 °C wächst. Es findet vielfältig Einsatz in Starterkulturen für die Herstellung fermentierter Milchprodukte, insbesondere Joghurt, sowie verschiedener Käsesorten. Die meisten *S. thermophilus*-Stämme besitzen keine Plasmide. Treten Plasmide auf, so sind sie überwiegend sehr klein.

Vor einigen Jahren haben wir aus dem *S. thermophilus*-Stamm S4 ein interessantes Plasmid isoliert, welches neben dem Replikationssystem lediglich noch ein Gen für ein kleines Hitzeschockprotein (*shsp*) trägt. Durch dieses Plasmid mit der Bezeichnung „pST04“ werden die Zellen

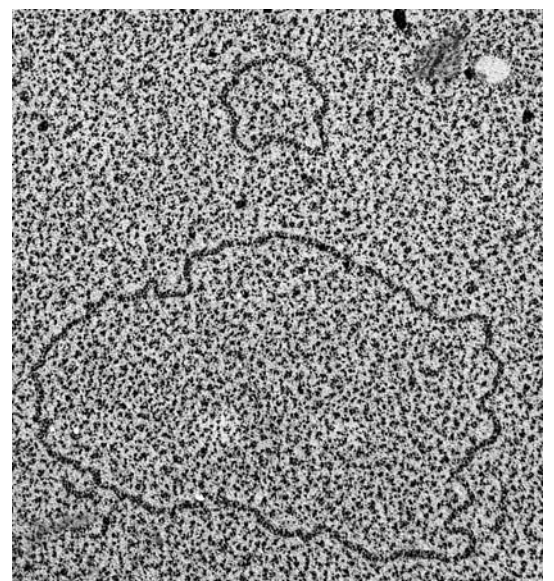


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Plasmids (oben; kleines, ringförmiges DNA-Molekül) im Vergleich zu einer Phagen-DNA. Foto: H. Neve, BfEL

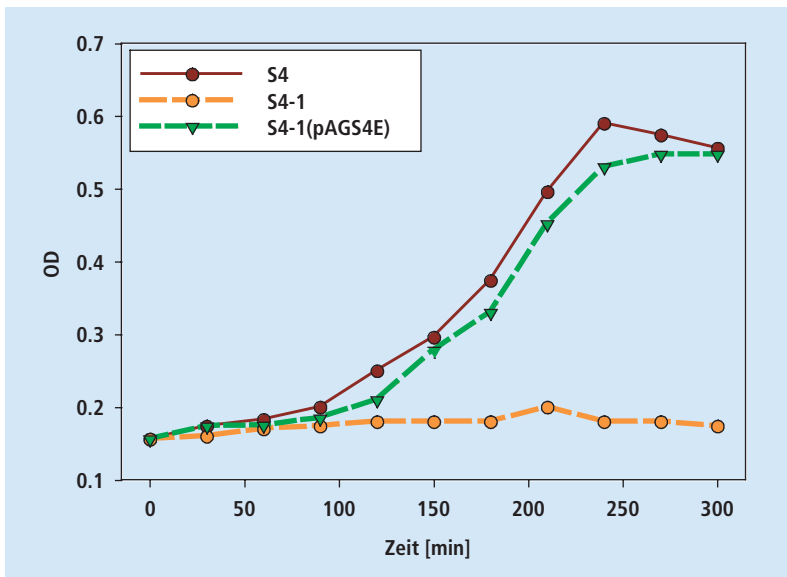


Abb. 2: Wachstum verschiedener *S. thermophilus*-Stämme in Flüssigmedium bei 50 °C. Der Stamm S4 trägt das Plasmid pST04; der Stamm S4-1 ist ein ursprünglicher S4 Stamm, der das Plasmid verloren hat; in den Stamm S4-1(pAGS4E) ist das *shsp*-Gen mit einem kommerziellen Shuttle-Vektor hineinkloniert worden.

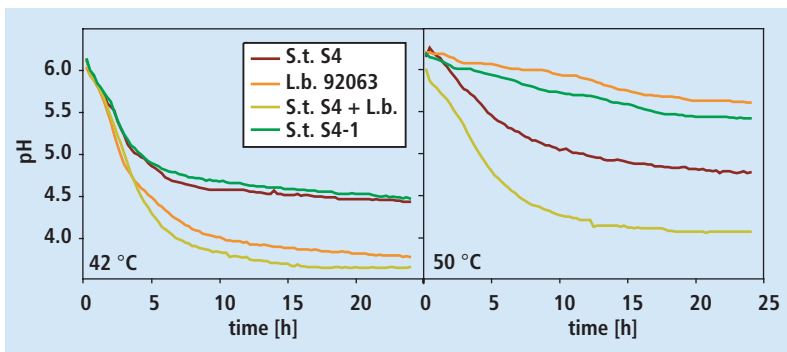


Abb. 3: Einfluss des *shsp*-Gens auf den Säuerungsverlauf in Magermilch bei 42 und 50 °C. Die Joghurtkultur bestand aus *S. thermophilus* S4 und *L. bulgaricus* 92063 (S.t. S4 + L.b.). Die anderen Säuerungskurven sind die der Einzelstämme.

in die Lage versetzt, bei Temperaturen von ca. 50 °C noch ordentliches Wachstum zu zeigen, während sie normalerweise bei dieser Temperatur überhaupt nicht mehr wachsen könnten (Abb. 2).

Welche Bedeutung diese Temperaturerhöhung hat, wird erst klar, wenn man sich das Verhalten von *S. thermophilus* in gemeinsamer Kultur mit *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (im Folgenden *L. bulgaricus* genannt) anschaut. Beide Organismen bilden zusammen die „klassische“ Joghurtkultur, die sich durch besondere Eigenschaften auszeichnet. In einem Verhalten, welches als Protosymbiose bezeichnet wird, fördern sich beide Organismen durch spezifische Stoffwechselpro-

dukte gegenseitig in ihrem Wachstum. Diese Stimulierung führt dazu, dass die Säuerung der gemeinsamen Kultur deutlich schneller verläuft als die der beiden Einzelkulturen und die gemeinsame Kultur niedrigere pH-Werte erreicht (erst bei pH-Werten unterhalb 4,5 bekommt der Joghurt die gewünschte Festigkeit). Darüber hinaus vermehren sich die Bakterien stärker, sodass die Zellzahlen bei ihrer gemeinsamen Kultivierung im Joghurt deutlich höher sind als bei Einzelkultur. Die Joghurtfermentation erfolgt bei etwa 40 °C, geht sehr zügig vonstatten und führt zu einer relativ starken Säuerung. Dies stellte ursprünglich aus hygienischen Gründen einen immensen Vorteil dar, weil die an-

sonsten leicht verderbliche Milch sicher haltbar gemacht wurde. Allerdings kann dieser Joghurt während der folgenden Kühlung stark nachsäuern, dadurch zu sauer und eventuell sogar bitter werden.

Diesem Problem begegnet man in Deutschland dadurch, dass man statt der traditionellen Joghurtkultur eine so genannte „Joghurt mild“-Kultur einsetzt, die aus *S. thermophilus* und einem thermophilen *Lactobacillus* – gemeinhin *Lactobacillus acidophilus* – besteht und die keine Protosymbiose aufweist. Der milde Geschmack und die verbesserte Haltbarkeit kommen den hiesigen Verbrauchern entgegen. Ein solches Produkt darf aber in vielen Ländern außerhalb Deutschlands nicht als Joghurt bezeichnet werden, sondern lediglich als fermentiertes Milchprodukt, was seine Exportchancen deutlich schmälert.

Bringt man nun den hitzetoleranten *S. thermophilus*-Stamm zusammen mit *L. bulgaricus* in Kultur und erhöht die Fermentationstemperatur auf 50 °C, so entsteht ein Joghurt, der alle Vorteile in sich trägt. Das zeigte sich, als wir entsprechende Versuche mit dem *S. thermophilus*-Stamm S4 durchführten. Wurden *L. bulgaricus*-Stämme in Einzelkultur eingesetzt, so führten sie bei 50 °C kaum zu einer signifikanten Säuerung. Ähnliches zeigte sich bei Verwendung einer Sonderform des Stammes S4, der das Hitzeshock-Plasmid verloren hatte (S4-1). Hingegen war der plasmidtragende S4-Stamm in der Lage, den pH-Wert der Milch bis unter pH 5 zu säuern (Abb. 3). Die besten Ergebnisse lieferte aber die gemeinsame Kultur von S4-Stamm und *L. bulgaricus*: Hier wurde nach 24 Stunden ein pH-Wert von 4,1 erreicht. Dieser pH-Wert änderte sich auch trotz mehrwöchiger Lagerung nicht mehr (Tab. 1). Ein sehr interessanter Effekt war, dass die Keimzahlen beider Organismen in gemeinsamer Fermentation bei 50 °C deutlich höher lagen als die Keimzahlen der Einzelstämme und dass diese Keimzahlen über zweiwöchige Kühlung hin völlig stabil blieben. Hingegen nahm die Keimzahl des *L. bulgaricus* in Einzelkultur während dieser Zeit stark ab; bereits nach 10 Tagen waren keine lebenden Zellen mehr nachweisbar (Abb. 4).

Die sensorische Bewertung des bei 50 °C produzierten Joghurts ergab, dass es

Tab. 1: pH-Entwicklung während der Lagerung [Tage] bei 4 °C nach eintägiger Fermentation mit *S. thermophilus* S4 und *L. bulgaricus* 92063

Fermentations-temperatur	pH-Wert Ausgangsmilch	Lagerdauer [Tage] nach Fermentation			
		0	2	8	14
42 °C	6,2	3,6	3,5	3,4	3,4
50 °C	6,2	4,2	4,2	4,2	4,2

sich um ein mildes Produkt mit gutem Joghurtaroma handelte und dass sich dieser Geschmack während der Kühlung praktisch in keiner Weise negativ veränderte. Vor allem wurde kein Bittergeschmack beobachtet. Die Übereinstimmung mit der traditionellen Joghurtkultur in Verbindung mit dem milden Geschmack und der guten Haltbarkeit macht ein solches Produkt auch für den Export interessant.

Die Frage, die wir uns daraufhin gestellt haben, war, ob sich das natürliche Plasmid pST04 auch in andere *S. thermophilus*-Stämme, insbesondere in solche, die kommerziell für die Produktion von Joghurt genutzt werden, übertragen lässt.

Entwicklung eines Zwei-Plasmide-Systems

Um plasmidtragende von nicht-plasmidtragenden Zellen unterscheiden zu können, muss auf dem Plasmid ein Selektionsmarker vorhanden sein. Ein solcher Marker ist zum Beispiel ein Gen für eine Antibiotikumresistenz, die es erlaubt, Zellen dadurch zu selektionieren, dass dem Wachstumsmedium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wird. Damit können nur die plasmidtragenden Zellen auf diesem Medium wachsen und Kolonien bilden. Aus diesen Kolonien lassen sich

dann problemlos die plasmidtragenden Bakterien als reine Stämme isolieren.

Das Plasmid pST04 weist lediglich zwei Gene auf: das *repA*-Gen für die Replikation und das *shsp*-Gen für das Hitzeschockprotein. Theoretisch kann das *shsp*-Gen als Selektionsmarker eingesetzt werden, da, wie Abb. 2 zeigt, bei 50 °C nur plasmidtragende Zellen wachsen können. Dass diese Selektion tatsächlich funktioniert, konnten wir nachweisen. Die Temperaturerhöhung um einige Grad baut allerdings nur einen relativ schwachen Selektionsdruck auf, sodass dieses Verfahren in der Praxis recht kompliziert ist und eine genaue Anpassung der Transformations- und Selektionsbedingung jeweils an den zu transformierenden *S. thermophilus*-Stamm verlangt. Um das Plasmid auch unter normalen Standardbedingungen ohne besondere Anpassung an den zu transformierenden Stamm übertragen zu können, wurde von uns ein „Zwei-Plasmide-System“ entwickelt. Dieses System, dargestellt in Abbildung 5, beruht darauf, dass der Replikationsursprung (*ori*) des Plasmids pST04 in ein normales, kommerziell verfügbares *E. coli*-Plasmid, welches eine

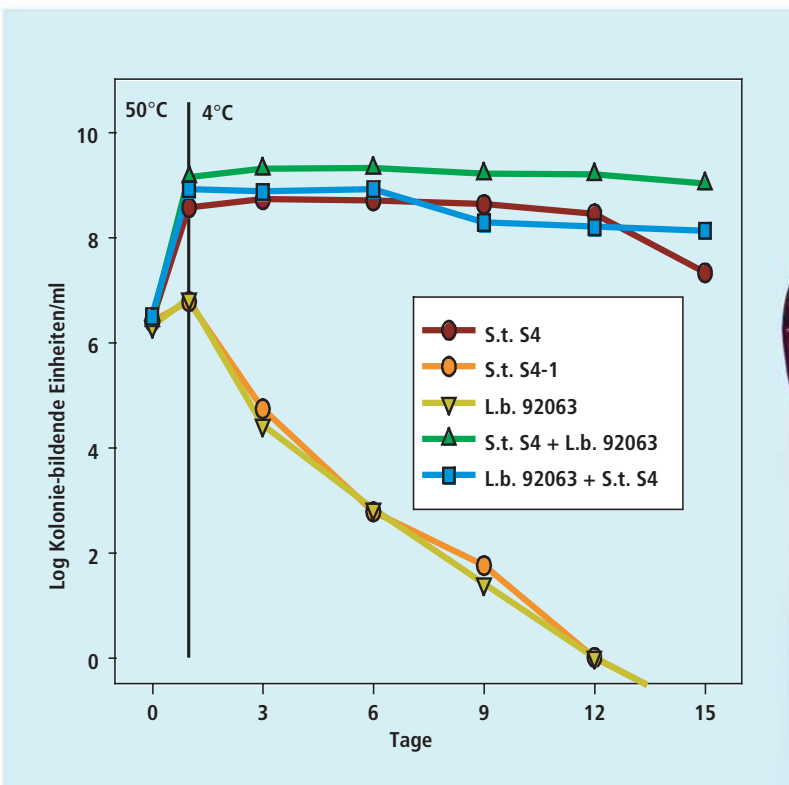


Abb. 4: Einfluss des *shsp*-Gens auf die Keimzahl während der Lagerung bei 4 °C, nach Fermentation bei 50 °C. Beim Einsatz der Gemeinschaftskultur, bestehend aus *Streptococcus thermophilus* S4 und *L. bulgaricus* 92063 bezieht sich die angegebene Keimzahl auf den zuerst genannten Stamm in der eingefügten Legende.



Antibiotikumresistenz trägt, inkloniert wird, und dass dieses Plasmid zusammen mit dem pST04 transformiert wird. Auf Antibiotikum-haltigem Nährmedium können sich nur diejenigen Zellen vermehren, die beide Plasmide aufgenommen haben. Zellen, die lediglich das *E. coli*-Helferplasmid aufweisen, können dieses bei der Zellteilung nicht weitergeben, weil ihnen das Replikationsprotein RepA fehlt und das Helferplasmid dadurch alleine nicht vermehrungsfähig ist. Zellen, die nur das pST04-Plasmid besitzen, gehen zugrunde, weil ihnen das Resistenzgen gegen das Antibiotikum fehlt. Wenn aber beide Plasmide gleichzeitig übertragen worden sind, so erlaubt das RepA-Protein des pST04 die Replikation des Helferplasmids, da es in beiden Plasmiden an den *ori* bindet. Dadurch können sich beide Plasmide vermehren, und die Antibiotikumresistenz kann sich ausbilden.

Werden nun Zellen, die beide Plasmide tragen, in ein Medium überimpft, welches kein entsprechendes Antibiotikum erhält, kommt es binnen kurzer Zeit zum Verlust des Helferplasmids. Dieses liegt daran, dass Helferplasmid und pST04 gemeinsam um das von pST04 gebildete RepA Protein konkurrieren. In dieser Konkurrenzsituation – in Abwesenheit des Selektionsdrucks – muss sich pST04 durchsetzen, da das *repA* Gen auf diesem Plasmid lokalisiert ist. Wir konnten nachweisen, dass das Helferplasmid in isolierten Bakterienkolonien nach 24h Wachstum nicht mehr vorhanden war.

Nach Verlust des Helferproteins sind somit *S. thermophilus*-Zellen entstanden, die lediglich das natürliche pST04-Plasmid enthalten, ohne dass in diesem Stamm eine gentechnische Veränderung vorliegt. Die Anwendbarkeit dieses Systems auf andere *S. thermophilus*-Stämme wurde dadurch nachgewiesen, dass kommerziell verwendete *S. thermophilus*-Stämme durch pST04 in die Lage versetzt wurden, bei höheren Temperaturen zu wachsen.

Vorteile für den Verbraucher

Das hier beschriebene System zur genetischen Veränderung zeichnet sich dadurch aus, dass lediglich zur Übertragung des natürlich vorkommenden pSt04 ein gen-

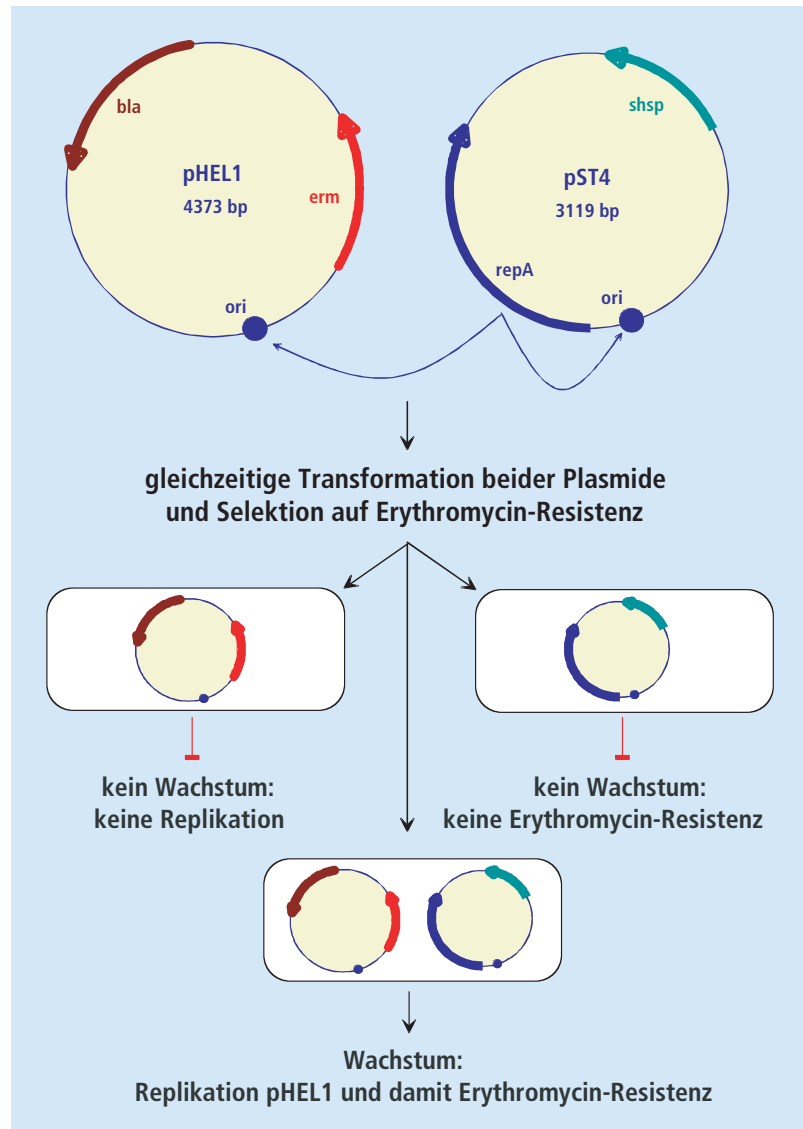


Abb. 5: Darstellung der Funktionsweise des „Zwei-Plasmide-Systems“.

technischer Schritt – die Verwendung eines gentechnisch veränderten (rekombinanten) Helferplasmids – eingesetzt wird. Nach Verlust dieses Plasmids befindet sich keine rekombinante DNA mehr in den Zellen. Eine gentechnische Veränderung ist daher auch nicht nachweisbar. Es wurde also ein absolutes Minimumprinzip zur genetischen Veränderung angewandt.

Im Vergleich zu unveränderten Stämmen stellen die mit dem natürlichen Plasmid transformierten *S. thermophilus*-Stämme keinerlei erhöhtes Risiko dar. Da die Fermentation bei 50 °C vor allem dem Verbraucher Vorteile bietet – milder Geschmack, hohe Stabilität des Produkts,

hohe Keimzahl der traditionellen Joghurtmikroorganismen – sollten mit diesen Stämmen produzierte Joghurts geeignet sein, Akzeptanz beim Verbraucher zu finden.

BfEL

Dr. Hassan A.M. El Demerdash¹, PD

Dr. Arnold Geis, Prof. Dr. Knut J. Heller, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Institut für Mikrobiologie, Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel. E-Mail: knut.heller@bfel.de

¹ jetzt: Biotechnology Research Center, Suez Canal University, Ismailia 41522, Egypt