

MENZEL, M., HELLER, K.J.: **Stationärphasen-Regulation in *Lactococcus lactis***. Vortrag anlässlich der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft am 11./12. September 1997 in Berlin (Milchkonferenz '97), S. 14).

## 26 *Lactococcus lactis* (Stationärphasenregulation)

Die stationäre Wachstumsphase stellt eine Anpassung der Bakterienzellen an ungünstige Bedingungen, hervorgerufen durch Verbrauch der Nährstoffquellen (insbesondere der C-Quellen), dar. In dieser Phase findet kein oder nur geringfügiges Wachstum statt. Bei der Käseherstellung kommt es durch Ablassen der Molke zu einer drastischen Verringerung der hauptsächlichlichen C-Quelle der Milch - der Laktose - im Käsebruch. Die Starterbakterien befinden sich somit während der gesamten Käsereifung in der Stationärphase.

Die physiologischen Veränderungen und Leistungen von Starterbakterien während der Stationärphase wurden an zwei Stämmen unterschiedlicher Subspezies von *Lactococcus lactis* untersucht. Beide Stämme entwickelten verschiedene Stressresistenzen bei Eintritt in die Stationärphase.

Um Genexpressionen während des Überganges in die stationäre Wachstumsphase zu studieren, wurde eine Genbank von *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 in pORI13 konstruiert. pORI13 ist ein „promoter screening vector“, der ein promoterloses  $\beta$ -Galaktosidasegen (*lacZ*) aus *E. coli* besitzt. Zur Optimierung dieses Plasmides planen wir, das *lacZ*-Gen durch die Luciferasegene *luxAB* aus *Vibrio harveji* zu ersetzen.

Es wurden mehrere Klone, die die  $\beta$ -Galactosidase exprimierten, untersucht. Bei vier dieser Klone nahm die Expression der  $\beta$ -Galactosidase zu Beginn der stationären Phase um Faktoren zwischen 5 und 12 zu. Die DNA-Inserts dieser Klone wurden auf mögliche Promotersequenzen, Ribosomenbindungsstellen, offene Leseraster und regulatorische Sekundärstrukturen hin analysiert.

MARCHETTI, M., LONGHI, C., CONTE, M.P., PISANI, S., VALENTI, P., SEGANTI, L.: **Laktoferrin hemmt die Adsorption des Herpes Simplex-Virus Typ 1 an Vero-Zellen. (Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to Vero cells.)** Antiviral Research 29 (2/3) 221-231 (1996).

## 26 Laktoferrin (Hemmung von Mikroorganismen)

Untersucht wurden die Effekte von humanem und bovinem Laktoferrin (HLf und BLf) auf Infektionen mit dem Herpes Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1). Da bekannt ist, daß sich die Laktoferrine an Heparansulfatproteoglykane und Lipoproteinrezeptoren (low-density) binden, die wiederum als Bindungsposition für die Interaktion von HSV-1 mit Wirtszellen fungieren, wurde die Wirkung dieser Proteine auf die HSV-1-Vermehrung in Vero-Zellen geprüft. HLf und BLf erwiesen sich als potente Inhibitoren einer HSV-1-Infektion. Die Konzentrationen, die erforderlich sind, um den viralen zytopathischen Effekt bei Vero-Zellen um 50 % zu hemmen, liegen bei 1,41 bzw. 0,12  $\mu$ M. HLf und BLf bewirkten ihre Aktivität durch die Hemmung der Adsorption des Virus an die Zellen, und zwar unabhängig von ihren Eisenbindungseigenschaften. Daher liegen vergleichbare Aktivitäten sowohl in der apo- wie auch in der eisengesättigten Form vor. Die Bindung von [ $^{35}$ S] Methionin-markiertem HSV-1-Partikeln an Vero-Zellen wird deutlich gehemmt, wenn während des Anheftungsschrittes BLf zugesetzt wird. BLf interagiert mit den Vero-

Zelloberflächen und den HSV-1-Partikeln. Die Beeinflussung zellulärer Rezeptoren und/oder viraler Anheftungsproteine dürfte in den antiviralen Mechanismen von Bedeutung sein.

HELLER, K.J.: **Streptococcus thermophilus: Ein Modellorganismus für molekularbiologische Forschung.** Vortrag anlässlich der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft am 11./12. September 1997 in Berlin (Milchkonferenz '97), S. 1.

## 26 *Streptococcus thermophilus* (molekularbiologische Forschung)

*Streptococcus thermophilus* ist ein thermophiler Organismus, der von großer Bedeutung für die Milchwirtschaft ist. Zum einen ist er essentiell für die Herstellung von Joghurt, zum anderen ist er häufig in Starterkulturen für die Herstellung von Hartkäsen vertreten. Nachdem Laktokokken in den vergangenen zwei Jahrzehnten bevorzugte Objekte der mikrobiologischen Forschung waren, ist seit etwa drei Jahren ein Trend hin zu *S. thermophilus* festzustellen. So existiert zum ersten Mal im Rahmen des europäischen BIOTECH Programms eine eigene Gruppe (9 Laboratorien) die sich ausschließlich mit thermophilen Startern und hier überwiegend mit *S. thermophilus* beschäftigt.

Im Institut für Mikrobiologie der Bundesanstalt für Milchforschung stellt *S. thermophilus* seit einigen Jahren einen Schwerpunkt in der Forschung dar. Vier Themenbereiche wurden im Vortrag vorgestellt:

- Untersuchungen zur Genetik von *S. thermophilus* beziehen sich im Wesentlichen auf die Charakterisierung von Plasmiden. Für *S. thermophilus* ließen sich 5 Homologiegruppen mit insgesamt 7 verschiedenen Plasmiden identifizieren. Die Plasmide pST1 (2,1 kb) und p106 (5,2 kb) wurden vollständig sequenziert. Im Gegensatz zu Plasmiden von Laktokokken, auf denen Gene für wichtige physiologische Eigenschaften lokalisiert sind, finden sich auf den bisher charakterisierten *Streptococcus*-Plasmiden lediglich Replikationsfunktionen.
- In den vergangenen Jahren wurden im Institut umfangreiche Untersuchungen zu virulenten Bakteriophagen von *S. thermophilus* durchgeführt. Zur Zeit konzentriert sich die Arbeit auf den temperenten Phagen TP-J34, dessen lytische Vermehrung durch Temperaturerhöhung induzierbar ist. Die für die Regulation des Vermehrungszyklusses und für die Integration verantwortliche Genregion des Phagen (ca. 7,5 kb) wurde sequenziert. Damit ist die Voraussetzung zur Konstruktion regulierbarer Expressionssysteme und von Integrationsvektoren gegeben. Weitere Themen werden die Charakterisierung der Phagen/Wirt Wechselwirkung sein und die durch TP-J34 hervorgerufene lysogene Konversion von *S. thermophilus* J34.
- Die Untersuchungen im Bereich „Biologische Sicherheit“ betreffen die Übertragung rekombinanter DNA aus gentechnisch veränderten Bakterien in andere Organismen. In einem Modell für Joghurt konnte die Übertragung rekombinanter DNA per Transduktion in verschiedene *S. thermophilus*-Stämme nachgewiesen werden. Je nach verwendetem Plasmid, Phagentyp und Recipient konnten Transferraten von bis zu  $5 \times 10^2$  Transduktanten pro eingesetztem Phagen nachgewiesen werden. Für die Stabilität freier DNA im Joghurt kommt einer von uns entdeckten Oberflächen-gebundenen Nuklease sicherlich entscheidende Bedeutung zu.

– Die Differenzierung und Identifizierung von Bakterien mit klassischen bakteriologischen Methoden stößt zunehmend an Grenzen, wenn es um Fragen der Stammdifferenzierung (z.B. Probiotika), des Nachweises gentechnischer Veränderungen oder um den Nachweis nicht-kultivierbarer Organismen geht. Molekulare DNA Nachweisverfahren gewinnen in diesen Bereichen zunehmend an Bedeutung. Für einen gentechnisch veränderten *S. thermophilus*-Stamm wurde eine §35 LMBG-Methode entwickelt und erfolgreich im Ringversuch getestet. Der Nachweis der Fermentationsorganismen in thermisiertem Joghurt läßt sich ebenfalls über molekulare DNA Nachweistekniken durchführen.

NEVE, H., ZENZ, K.I., KOCH, A., HELLER, K.J.: **Neue molekularbiologische Werkzeuge für *Streptococcus thermophilus*: Das Lysogeniemodul im Genom des temperenten Bakteriophagen TP-J34.** Vortrag anlässlich der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft am 11./12. September 1997 in Berlin (Milchkonferenz '97), S. 12.

#### 26 *Streptococcus thermophilus* (Molekularbiologie)

Bakteriophagen der Milchsäurebakterien wurden bisher vorrangig in Hinblick auf eine optimierte Phagenresistenz der Starterkulturen bearbeitet. In jüngster Zeit konzentrierten sich die Arbeiten auf die Etablierung geeigneter molekularbiologischer „Werkzeuge“ mit Phagen-DNA. Temperente Phagen standen dabei aufgrund ihrer besonderen Phagenbiologie im Vordergrund, da diese Phagen (1) ihre DNA gezielt in das bakterielle Genom der Wirtszellen integrieren und (2) mit Hilfe eines genetischen Schalters (Repressorsystems) den virulenten Vermehrungszyklus zugunsten eines lysogenen Lebenszyklus unterbinden. Die Gene hierfür finden sich in einem kurzen Genombereich, der als „Lysogeniemodul“ bezeichnet wird.

Das Lysogeniemodul aus dem Genom des temperenten *Streptococcus thermophilus*-Phagen TP-J34 (Genomgröße: 47 kbp) wurde vollständig sequenziert. Mehrere Leseraster wurden identifiziert, deren abgeleitete Genprodukte für wesentliche Funktionen der lysogenen „Lebensweise“ determinieren. Hierzu zählen: (1) die phagenkodierte Integrase, die die Integration des Phagen-genoms in die chromosomale DNA der Wirtszelle durch homologe Rekombination ermöglicht, (2) der genetische Schalter des Phagen mit regulatorischen Proteinen (Repressor und Antirepressorsystem), (3) ein phagenkodierte Lipoprotein, das vermutlich die Oberfläche der Wirtszellen so verändert, daß die lysogene Kultur homogen wächst, während prophagenfreie Kulturen aggregieren (lysogene Konversion), (4) ein weiteres Genprodukt mit Homologien zu Immunitätsproteinen anderer Phagen.

Die 4 funktionellen Phagen-genom-Bereiche sind die Basis für weitere Arbeiten (1) zur Konstruktion von „ortspezifischen“ Integrationsvektoren (Integrasen), (2) zur Etablierung von regulierbaren Genexpressionssystemen (genetischer Schalter), (3) zur gezielten Veränderung der Bakterienoberfläche (Lipoproteinen) und (4) zur Konstruktion von phagenresistenten Stämmen (Immunitäts-gen des Phagen).

MOLKENTIN, J., PRECHT, D.: **Bedeutung von *trans*-Hexadecensäuren in bovinen Milchfetten und teilhydrierten Speisefetten.** Vortrag anlässlich der Tagung der

Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft am 11./12. September 1997 in Berlin (Milchkonferenz '97), S. 33.

#### 44 *Milchfett* (*trans*-Hexadecensäuren)

Der Verzehr von *trans*-Fettsäuren, insbesondere von *trans*-Octadecensäuren (*trans*-C18:1), aus Nahrungsfetten wird mit einer Vielzahl gesundheitlicher Risiken in Verbindung gebracht. In den letzten Jahren wurden teilweise auch Korrelationen des Gehaltes an *trans*-Hexadecensäuren (*trans*-C16:1) in menschlichem Plasma oder Fettgewebe mit dem Risiko koronarer Herzerkrankungen gefunden, die sogar signifikanter sein sollten als für *trans*-C18:1. Da nach bisherigen Untersuchungen tierische Fette generell substantielle Mengen an *trans*-C16:1 enthalten sollen, nicht aber teilhydrierte Speisefette, wurde gefolgert, daß nur tierische Fette die negativen physiologischen Effekte hervorrufen.

Anhand einer Vortrennung mittels Silberionen-Dünnschichtchromatographie (Ag-TLC) konnte gezeigt werden, daß bei der gaschromatographischen Fettsäureanalyse selbst mit 100 m-Kapillarsäulen Überlappungen zwischen *trans*-C16:1-Isomeren und gesättigten C17-Säuren auftreten. Somit wurden bei früheren Studien ohne Anwendung von Ag-TLC wahrscheinlich häufig zu hohe *trans*-C16:1-Gehalte gemessen.

Es wurden deshalb die Gehalte an *trans*-C16:1 in 27 bovinen Milchfetten und 62 teilhydrierten Speisefetten mittels der Kombination von Ag-TLC und GC neu bestimmt. Danach kommen in Milchfetten durchschnittlich 0,13 % und in teilhydrierten Margarinen und Brat-/Backfetten auf pflanzlicher Basis 0,04 % bzw. 0,01 % *trans*-C16:1 vor (n = 56). Bezüglich des *trans*-C16:1-Gehaltes bestehen somit nur minimale Unterschiede zwischen Milchfetten und teilhydrierten Pflanzenfetten, die beide nur geringe *trans*-C16:1-Gehalte aufweisen.

Dagegen weisen Speisefette, die teilhydriertes Fischöl enthalten (n = 6), relativ hohe *trans*-C16:1-Gehalte von durchschnittlich 1,89 % auf. Des Weiteren enthalten diese Produkte neben den in vielen Fetten vorkommenden *trans*-Octadecensäuren zusätzlich – im Gegensatz zu bovinem Milchfett – hohe Mengen an *trans*-Eicosaensäuren (*trans*-C20:1) von durchschnittlich 4,49 %. In früheren Studien untersuchte Proben von menschlichem Plasma oder Fettgewebe mit besonders hohem *trans*-C16:1-Gehalt enthielten also wahrscheinlich auch viel *trans*-C20:1 und womöglich weitere ungesättigte *trans*-C22-Säuren, deren Wirkung bisher weitgehend unbekannt ist.

Theorien über eine Assoziation von *trans*-C16:1-Gehalten in menschlichen Lipiden mit dem Auftreten koronarer Herzerkrankungen sollten daher hinsichtlich des Beitrags einzelner Fette sowie auch der eventuellen Korrelation mit weiteren Fettsäuren überdacht werden.

SUHREN, G., BEUKERS, R., REICHMUTH, J.: **Beschreibung von Kriterien zur Beurteilung mikrobiologischer Hemmstofftests.** Vortrag anlässlich der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft am 11./12. September 1997 in Berlin (Milchkonferenz '97), S. 71.

#### 88 *Hemmstofftests* (Beurteilungskriterien)

Mikrobiologische Hemmstofftests spielen beim Nachweis von Hemmstoffen oder als Suchtests für das Vorkommen von antimikrobiell wirksamen Substanzen auf MRL-Niveau (maximum residue limits) eine wichtige Rolle. Unter dem Druck der Festlegung von MRLs für eine