Die molekulargenetische Charakterisierung von Milchsäurebakterien und Phagen in instabilen Quarkfermentationen

Dissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie / Chemie
der
Universität Bremen
vorgelegt von

Christiane B. Glöckner

Bremen 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Blohm

2. Gutachter: Dr. Horst Neve

Tag des Promotionskolloquiums:

13. Dezember 2002

Für Frank Oliver, Patrick

und

meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1
1.1. Biotechnologische Produktveredelung durch Fermentation 1
1.2. DNA-Analytik in der milchverarbeitenden Industrie - Gegenwart und Zukunft 2
1.2.1. Organismenidentifizierung durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung 4
1.2.2. Molekularbiologische Aspekte bei der Herstellung fermentierter Milchprodukte 5
1.2.3. Simultane Genanalyse durch DNA-Chip-Technologie 7
1.3. Ursachen von Fehlfermentationen 9
1.3.1. Bakterielle Verunreinigungen 9
1.3.2. Verlust von fermentationsrelevanten, Plasmid-codierten Eigenschaften 10
1.3.3. Phagen-bedingte Lyse von Starterkultur-Spezies 18
1.4. Ziel der Arbeit 21

2. MATERIAL UND METHODEN 22
2.1. Lösungen und Puffer 22
2.2. Medien und Stammhaltung 22
2.3. Molekularbiologische Software 23
2.4. Oligonukleotide 25
2.4.1. Sonden für die Detektion von Bakterien mittels FISH 25
2.4.2. Oligonukleotide für Phagenresistenzgene 26
2.4.3. Oligonukleotide für Gene des Citrat- und des Lactosestoffwechsels 30
2.4.4. Oligonukleotide für den Nachweis von *Lactococcus*-Phagen 31
2.4.5. Sonden für die DNA-Chip-Hybridisierung 33
2.5. Probenmaterial 34
2.5.1. Starterkulturen und Einzelstämme des Kulturenherstellers 34
2.5.2. Fermentationsproben der Starterkultur Probat 8/0 mit normaler und gestörter Säuerung 35
2.5.3. Quarkproben anderer Hersteller 35
2.5.4. Referenzstämme der BAfM und der DSMZ 36
2.5.5. Bakteriophagen 36
2.6. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung von Gram-positiven Bakterien 37
2.6.1. Fixierung von Zellen aus Quarkproben 37
2.6.2. Enzymatischer Aufschluß bei Gram-positiven Bakterien 37
2.6.3. Einzelzellhybridisierung 38
2.6.4. Gesamtzellzahlbestimmung mit DAPI 38
2.6.5. Detektion der Hybridisierungsergebnisse 39
2.7. PCR-Amplifikationen 39
2.7.1. Probenaufarbeitung 39
2.7.2. Spezifischer Nachweis von *Lactococcus*-Genen 40
2.7.3. Identifizierung von *Lactococcus*-Phagen der 936-, P335- und C2- Spezies 40
2.7.4. Agarosegelelektrophorese 40
2.7.5. Sequenzanalyse der PCR-Amplifikate 41
2.8. DNA-Sequenzanalyse des Phagen P482 41
2.8.1. Gewinnung der Phagen im präparativen Maßstab 41
2.8.2. Sequenzierung des Phagen P482 42
2.8.3. Vergleichende DNA-Analyse 42
2.9. DNA-Chip-Hybridisierung 43
2.9.1. Vorbereitung der Sonden und Anbindung an die Chipoberfläche 43
2.9.2. Extraktion und Restriktion der genomischen DNA 43
2.9.3. DNA-Markierungsmethoden 44
2.9.4. (Prä-)Hybridisierung der Mikroarrays 46

3. ERGEBNISSE 48
3.1. Populationsanalyse mit Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung 48
3.1.1. Die Permeabilität der LowGC Gram-positiven Zellwand und Autofluoreszenz fermentierter Milchprodukte 48
3.1.2. Phagentiter, stoffwechselaktive Zellen und Säuerungsänderung 48
3.1.3. Zusammensetzung der Bakterienpopulation 50
3.2. Phagenresistenz bei *Lactococcus lactis* 53
3.2.1. Phagenresistenzgene in Starterkulturen 53
3.2.2. Phagenresistenzgene in verschiedenen Speisequarks 55
3.2.3. Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Phagenresistenzgenen 57
3.2.4. Phagenresistenz in Fermentationen mit unterschiedlicher Säuerung 58
3.2.5. Vergleich der Phagenresistenzgenanalyse mit den RAPD-Ergebnissen 61
3.3. Citratstoffwechsel und Aromastoffe 64
3.3.1. Vergleich verschiedener Starterkulturen 64
3.3.2. Citratstoffwechselgene in der Starterkultur Probat 8/0 und während der Fermentation 65
3.4. Phagenspezies und Phagentiter in "Mixed Strain"-Kulturen 66
3.4.1. Nachweisgrenze der Phagen-DNA bei der PCR-Analyse 66
3.4.2. Phagentiterbestimmung durch PCR im Vergleich mit der Bestimmung durch Plaque-Tests 67
3.4.3. Phagenanalyse der Starterkulturen 68
3.4.4. Phagenbelastung in Fermentationsproben 69
3.5. Sequenzanalyse des Phagen P482 70
3.5.1. Nukleotidsequenz des Phagen P482 70
3.5.2. Genetische Elemente des Phagen P482 72
3.5.2.1 Open Reading Frames 72
3.5.2.2 Promotoren 77
3.5.2.3 Terminatoren 78
3.5.2.4 Signalstrukturen 79
3.5.2.5 Gene für tRNAs 83
3.5.3. Ähnlichkeiten zur DNA anderer *Lactococcus*-Phagen 85
3.5.4. Analyse der P482 spezifischen "Open Reading Frames" 88
3.5.5. Funktionelle Analyse des Phagengenoms 90
3.6. Vorarbeiten zur DNA-Chip-Hybridisierung 92
3.6.1. Markierungsraten bei PCR, Nick Translation und "random primed labelling" 92
4. DISKUSSION 94
4.1. Die Bakterienpopulation in einer instabil säuernden Fermentation 94
4.2. Einfluss der Starterkultureigenschaften auf die Fermentation 97
4.2.1. Phagenresistenzgene 97
4.2.2. Säuerungseigenschaften und Bildung von Aromakomponenten 103
4.3. Phagenspezies in Starterkulturen und Fermentationsproben 106
4.4. Vergleichende Genomanalyse am Beispiel des Phagen P482 108
4.4.1. Methodische Aspekte bei der Ermittlung der Nukleotidsequenz, cos-Site und Transkripte 108
4.4.2. Funktionszuordnung zu den hypothetischen Proteinen des Phagen P482 111
4.4.3. Die Modular-Theorie der Phagenevolution 120
4.5. Aspekte der Markierung genomischer DNA für die Chip-Hybridisierung 122
5. ZUSAMMENFASSUNG 125
6. LITERATUR 127
7. ANHANG 149

Abkürzungsverzeichnis

BAfM	Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel
biovar.	Biovariation
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CT	5,(6)-Carboxytetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidester
Cy3	5,5'-Disulfo-1,1'-(γ-carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolo-carbocyanin-N-hydroxysuccimidester
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg
FISH	Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung
FLUOS	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
G+C	Mol% Guanin und Cytosin
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, Heidelberg
L.	*Lactococcus*
Lb.	*Lactobacillus*
Leuc.	*Leuconostoc*
L-LDH	L-Lactat-Dehydrogenase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
OT	Objektträger
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pfu	plaque forming units

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrate
Str.	*Streptococcus*
TAMRA	5,(6)-Carboxytetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidester
ÜN	über Nacht
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

1. Einleitung

1.1. Biotechnologische Produktveredelung durch Fermentation

Die Fähigkeit Lebensmittel durch Fermentation vor dem Verderb zu schützen, ist die wohl älteste und gesellschaftlich akzeptierteste Form der Biotechnologie (Daly et al., 1996). Lange bevor Schlagworte wie Mikroorganismen, Stoffwechselwege oder Gene eine Rolle spielten, bereicherte eine Vielzahl an fermentierten Produkten wie Käse, Fleischwaren, Gemüse, Brot und Wein das tägliche Nahrungsangebot. Bei dem Versuch Pasteurs Keim-Theorie zur Produktveränderung durch Fermentation zu bestätigen, entdeckte Joseph Lister im Jahr 1873 eine Bakterienspezies, die in der Lage ist Milchsäuregärung zu betreiben. Er gab ihr den Namen *Bacterium lactis*, heute bekannt als *Lactococcus* (Lister, 1873). Die Fähigkeit von Mikroorganismen, die in der Milch enthaltenen Rohstoffe in Stoffwechselprodukte mit neuem Geschmack oder anderer Konsistenz umzubauen, erlaubt es heute einem ganzen Industriezweig, das Ausgangsprodukt Milch mit Hilfe von Starterkulturen zu veredeln. Die Senatskomission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Prüfung von Lebensmittelzusatzstoffen und Lebensmittelinhaltsstoffen definiert eine "Starterkultur" wie folgt:

"Starterkulturen sind aufgrund spezifischer Eigenschaften selektierte, definierte und lebensfähige Mikroorganismen in Reinkultur oder Mischkultur. Sie werden Lebensmitteln in der Absicht zugesetzt, das Aussehen, den Geruch und Geschmack und die Haltbarkeit zu verbessern" (Weber, 1996). Im Jahre 2001 wurden in der Bundesrepublik Deutschland 27,1 Mio. t Milch an Molkereien geliefert. Durch Fermentation wurden daraus 37.800 t Sauermilch- und Kefirerzeugnisse, 32.500 t Joghurt, 452.300 t Frischkäse, 45.100 t Sauermilchquark und 1.485.500 t Käse hergestellt (Quelle: Jahresbericht der Milchwirtschaft 2001).

Für die Herstellung von Milchprodukten werden vorrangig Milchsäurebakterien, die den Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Leuconostoc* zuzuordnen sind, eingesetzt (Daly et al., 1996). Sie bilden Milchsäure aus Lactose. Durch diese Freisetzung von Lactat und die damit verbundene Ansäuerung der Milch koaguliert das Casein und es kommt am isoelektrischen Punkt des Milchproteins bei einem pH-Wert von 4,7 zur Dicklegung der Milch. Die Milchsäure und andere freigesetzte Komponenten wie Essigsäure, Wasserstoffperoxid, organische Säuren und Bacteriocine wirken antagonistisch auf saprophytische oder pathogene Bakterien und verbessern dadurch die Haltbarkeit des Produkts. Stoffwechselnebenprodukte, wie Diacetyl und Acetaldehyd, die aus dem

Citratstoffwechsel stammen, sind charakteristische Aromakomponenten der verschiedenen Milchprodukte.

Je nach Temperaturoptimum der in der Starterkultur enthaltenen Bakterien unterscheidet man thermophile (Temperaturoptimum bei 38 bis 45°C) und mesophile Kulturen, deren optimale Wachstumstemperatur bei 22 bis 30°C liegt. Die Kulturen können sich aus einem einzigen Stamm (single strain starter cultures), mehreren Stämmen der gleichen Bakterienspezies (single species, multiple strain starter cultures) oder aus mehreren verschiedenen Spezies (multiple species starter cultures) zusammensetzen. Bei der Herstellung von Speisequark kommen undefinierte, mesophile Kulturen zum Einsatz, die aus homofermentativen Stämmen der Gattung *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. l.* ssp. *cremoris*, *L. l*. ssp. *l.* biovar. *diacetylactis)* und aus dem heterofermentativen Stamm *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* zusammengesetzt sind. Während die homofermentativen Stämme der Gattung *Lactococcus* hauptsächlich für die Säuerung zuständig sind, bilden *L. l.* ssp. *l.* biovar. *diacetylactis* und der heterofermentative *Leuconostoc*-Stamm die wichtigen Aromakomponenten Diacetyl und Acetoin.

Die Anforderungen an eine industriell einsetzbare Starterkultur gehen mittlerweile weit über die Erhöhung der Haltbarkeit und die Ausbildung produkttypischer Eigenschaften hinaus. Neben der Beeinflussung des Kohlenhydrat- und Citrat-Stoffwechsels, der Proteolyse und der Produktion von Exopolysacchariden und Bacteriocinen steht die Resistenz gegenüber Bakteriophagen an oberster Stelle (Daly et al., 1996; McKay und Baldwin, 1990).

1.2. DNA-Analytik in der milchverarbeitenden Industrie - Gegenwart und Zukunft

Die Gewährleistung mikrobiologischer Qualität und hygienischer Sicherheit liegt im Interesse der Lebensmittelindustrie, da die Vernichtung des Produktes oder eine Rückrufaktion zu erheblichen finanziellen Verlusten und zu großem Imageschaden führen. Eine schnelle und zuverlässige Überwachung der am Produktionsprozeß beteiligten Organismen und ihrer Eigenschaften bildet dafür die Grundvoraussetzung. In der Produktionsroutine milchverarbeitender Betriebe wird dabei zumeist noch auf die Methoden der klassischen Mikrobiologie zurückgegriffen. Die Organismenidentifizierung erfolgt nach zum Teil mehrtägiger Kultivierung auf Differenzierungsmedien. Die Charakterisierung von produktbestimmenden Eigenschaften basiert, sofern sie überhaupt durchgeführt wird, auf zeitaufwendigen physiologischen Tests.

Zahlreiche, im Laboralltag bereits gut etablierte Methoden basieren inzwischen auf molekularen Markern. Ramos et al. entwickelten 1990 eine auf dem Phänomen des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) beruhende Technik zur Unterscheidung von *L. lactis*- und *Streptococcus thermophilus*-Stämmen in Milchfermentationen (Ramos und Harlander, 1990). Zur Differenzierung von Milchsäurebakterien und *Enterococcus*-Stämmen wurden auf "Randomly amplified polymorphic DNA PCR" (RAPD) basierende Methoden etabliert (Cocconcelli et al., 1995). Durch Verwendung von stamm-spezifischen RAPD-Banden als Sonden für Koloniehybridisierungsexperimente kann die Zusammensetzung von Fermentationsproben aus *Lactococcus*-Kulturen auf Stammebene untersucht werden (Erlandson und Batt, 1997). Der direkte Vergleich zwischen der Bakterienbestimmung auf Differenzierungsmedien und durch SDS-PAGE-Fingerprinting von Zellproteinen zeigt, dass in modernen molekularbiologischen Methoden im Vergleich zu mikrobiologischen Verfahren ein mindestens gleichwertiges Potential bei gleichzeitig geringerem Zeitaufwand steckt (Descheemaeker et al., 1994; Tsakalidou et al., 1994).

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte bei der Identifizierung von Genen und Genomen erreicht. Mit dem gerade veröffentlichen Genom von *Yersinia pestis* stehen derzeit neben zahlreichen Sequenzen für Eukaryoten, Archaea und Viren 83 vollständige Sequenzen von Bakteriengenomen zur Verfügung (Deng et al., 2002 und NCBI Entrez Genome, Stand August 2002 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome). Darunter befinden sich die Sequenz des Milchsäurebakteriums *L. lactis* ssp. *lactis* IL1403 und die Genomsequenzen von Bakterien, die als Schadflora in Milchprodukten vorkommen, wie z.B. *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* ssp. *aureus MW2* oder 2 Vertreter der Gattung *Salmonella* (Baba et al., 2002; Bolotin et al., 2001; Glaser et al., 2001; McClelland et al., 2001).

Die Ermittlung der Sequenz von *L. lactis* ssp. *lactis* IL1403, das eines der physiologisch am besten charakterisierten Milchsäurebakterien ist und deshalb hervorragende Voraussetzungen für ein Genomprojekt bietet, vollzog sich in mehreren Schritten. Durch die Erstellung einer genetischen Karte konnte die Größe des Chromosoms auf etwa 2,37 Mb bestimmt werden (Le Bourgeois et al., 1992). Bei der Ermittlung der kompletten Sequenz wurde eine Strategie der "Low Redundancy"-Sequenzierung verfolgt. Im Gegensatz zum derzeit meist angewandten "High Throughput Random Clone Sequencing", bei dem etwa 30.000 Klone analysiert werden müssen (Fleischmann et al., 1995), genügen bei diesem Ansatz ca. 10.000 Klone. Nach der Einordnung in Contigs werden die vorhandenen Lücken durch "Primer Walking" mit Long Range PCR geschlossen (Cheng et al., 1994). Vor 3 Jahren wurden die ersten Daten

über das Genomprojekt von *Lactococcus* veröffentlicht (Bolotin et al., 1999). Die Größe des Bakterienchromosoms beträgt 2,35 Mb auf denen 1.495 Protein-codierende Gene identifiziert werden konnten. Bei 700 dieser Open Reading Frames (ORFs) konnten keine Ähnlichkeiten zu in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen festgestellt werden. Der durchschnittliche G+C-Gehalt beträgt 35,4%. Damit gehört *Lactococcus* zur Gruppe der Low G+C Gram-positiven Organismen. Das *Lactococcus*-Genom weist einige Besonderheiten auf. Insgesamt wurde 42 Kopien von 5 verschiedenen IS-Elementen identifiziert, die für den genetischen Austausch zwischen verschiedenen *Lactococcus*-Stämmen verantwortlich sein dürften. Die zwei IS-Elemente IS1077 und IS983 konnten neu beschrieben werden. Die IS-Elemente IS981, IS982 und IS1076 waren bereits vor der Sequenzaufklärung aus *L. lactis* IL1403 bekannt (Le Bourgeois et al., 1992; Polzin et al., 1993; Schouler et al., 1998b). Das IS-Element IS1076, dessen Sequenz identisch mit IS904 ist, konnte auch in zwei anderen *Lactococcus*-Stämmen identifiziert werden und war sowohl im Chromosom als auch auf einem Plasmid vorhanden (Engelke et al., 1992; Huang et al., 1991). Das Bakteriengenom enthält darüber hinaus 5 vermeintliche Prophagen, die aufgrund geclusterter Phagengene identifiziert wurden. Zwei der Prophagen (bIL285 und bIL286) können durch UV-Behandlung induziert werden (Chopin et al., 1989). Durchschnittlich gibt es alle 13,2 kb eine chi-Sequenz, die in *L. lactis* die Basenfolge 5'-GCGCGTG-3' hat (Biswas et al., 1995). Diese Sequenz beeinflußt die Aktivität der RecAB-Exonuklease, die dem RecBCD von *E. coli* entspricht, und an der homologen Rekombination beteiligt ist (el Karoui et al., 1998).

1.2.1. Organismenidentifizierung durch Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

Die Ende der 70er Jahre von Carl Woese etablierte vergleichende Sequenzanalyse von ribosomalen RNA-Molekülen ermöglichte den Einstieg in eine, die Evolution reflektierende Systematik (Woese und Fox, 1977). Derzeit sind in den Datenbanken mehr als 25.000 16S rRNA-Sequenzen verfügbar (ARB, 2002: http://www. arb-home.de). Das bedeutet, dass die 16S rRNA von mehr als 70% der gültig beschriebenen Bakterienarten zur Organismenidentifizierung zur Verfügung steht (Glöckner, 1998). Ribosomale Nukleinsäuren bieten verschiedene für phylogenetische Marker unabdingbare Vorteile. Sie sind ubiquitär verbreitet, als Bestandteil des Translationsapparates weisen sie funktionelle Konstanz auf, und sie besitzen unterschiedlich stark konservierte Sequenzabschnitte.

In den letzten Jahren wurden diverse auf vergleichender rDNA-Analyse beruhende Methoden zur Organismenidentifizierung etabliert. Rodrigues et al. entwickelten ein Fingerprinting-System das auf der Restriktion von rDNA-Molekülen beruht (Rodrigues et al., 1991). Die

Methode wurde anschließend zu "Amplified rDNA restriction enzyme analysis", kurz ARDRA genannt, verfeinert (Ward et al., 1998). Betzl et al. verwendeten Oligonukleotidsonden zur Unterscheidung von *Lactococcus* und *Enterococcus*-Stämmen in Koloniehybridisierungsexperimenten (Betzl et al., 1990). Der unterschiedliche Konserviertheitsgrad der 16S bzw. 23S rRNA ermöglichte nicht nur eine Identifizierung auf Gattungs- oder Artebene, sondern wie am Beispiel von *L. l.* ssp. *cremoris* gezeigt, sogar bis auf Subspezies-Level (Salama et al., 1993). Die molekulargenetische Unterscheidung dieser wichtigsten Vertreter der mesophilen Starterkulturorganismen vereinfachte die seit 1919 zur Verfügung stehende Klassifizierung aufgrund biochemischer und biophysikalischer Parameter (Orla-Jensen, 1919).

Die *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenz-markierten Oligonukleotid-Sonden, kurz FISH genannt, bietet eine neue Möglichkeit, die Zusammensetzung der Bakterienspezies während des gesamten Fermentationsprozesses zu überwachen. Diese kultivierungsunabhängige Methode erlaubt die *in situ*-Identifizierung mikrobieller Zellen in ihrem natürlichen Umfeld unter Vermeidung methodisch bedingter Populationsverschiebungen (Amann et al., 1997). Sie macht sich dabei die natürliche Amplifikation der rRNA-Moleküle in den Ribosomen zu Nutze, die pro Zelle mit Kopienzahlen von 10^4-10^5 vorliegen (Maaloe und Kjellgard, 1966). Signalverstärkende Schritte wie eine PCR-Amplifikation oder die enzymvermittelte Signalerhöhung sind nicht nötig. Der gleichzeitige Einsatz mehrerer mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markierter Sonden ermöglicht die simultane Identifizierung verschiedener Mikroorganismen in einer Fermentationsprobe.

1.2.2. Molekularbiologische Aspekte bei der Herstellung fermentierter Milchprodukte

Die Herstellung von Milchprodukten findet nicht mehr im bäuerlichen Rahmen statt, sondern wandelte sich innerhalb des letzten Jahrhunderts zu einem Industriezweig mit einer Produktion im großindustriellen Maßstab. Dabei ist die Identifizierung der an der Fermentation beteiligten Bakterienspezies nur ein Teilaspekt der umfangreichen Bemühungen, die Herstellung von fermentierten Milchprodukten zu überwachen und zu verbessern. So hat sich z.B. die Suche nach neuen geeigneten Starterkulturstämmen dadurch erheblich verstärkt. Oft stammen diese neuen Isolate aus Milchprodukten, die noch nicht mit kommerziellen Starterkulturen hergestellt wurden (Cogan et al., 1997). Neben guten Säuerungs- und Geschmackseigenschaften müssen sie hinsichtlich ihrer Resistenz gegen Bakteriophagen, ihres Kohlenhydrat- und Citratstoffwechsels, ihrer Bacteriocinproduktion

und ihrer Proteolyseeigenschaften gut charakterisiert sein (Davidson und Hillier, 1995). Die Bestimmung dieser Eigenschaften erfolgt meist durch kosten- und arbeitsintensive Assays bei denen phänotypische Charakteristika getestet werden. Wie das Beispiel der Phagen- oder der Bacteriocin-Typisierung zeigt, konnte bisher nicht für jede Fragestellung ein geeignetes Testsystem etabliert werden (Farber, 1996).

Seit etwa 10 Jahren werden zur Erforschung und Entwicklung neuer Starterkulturen DNA-analytische Methoden eingesetzt, deren Ziel die genetische Charakterisierung von Starterkulturstämmen ist. Bei einigen Methoden besteht das Interesse primär darin, eine Typisierung aufgrund von DNA-Unterschieden zu erzielen. Dazu zählt das Plasmid-Typing (Josephsen und Waagner Nielsen, 1988; Mannu et al., 2000), die Puls-Feld-Gelelektrophorese geschnittener genomischer DNA (Tanskanen et al., 1990), das Ribotyping und seine Variationen (Basaran et al., 2001; Schleifer et al., 1995) und auf PCR-basierende Methoden wie die RAPD-Analyse (Cocconcelli et al., 1995) oder die ARDRA-PCR (Villani et al., 1997). Für die Identifizierung geeigneter Starterkulturstämme aus natürlichen Ökosystemen wurde ein PCR-basiertes Screeningsystem entwickelt, das die Identifizierung der Spezies *Lactococcus* anhand ihrer 16S rDNA ermöglicht. Soll ein Bakterienstamm bestimmte genetisch manifestierte Eigenschaften aufweisen, reichen diese Methoden nicht aus. Der gezielte Nachweis eines Genes erfolgt in den meisten Fällen durch PCR mit spezifischen Primern. Am Beispiel des Histidin-Biosynthese-Operons konnte gezeigt werden, dass die auf diesem Operon basierende Systematik der 16S rRNA-Einteilung auf Spezies- und Subspezies-Level entspricht (Beimfohr et al., 1997). Die Methode wurde durch Genotypisierung unterhalb der Subspezies-Ebene mit RAPD-PCR ergänzt (Corroler et al., 1999).

Die hohe autolytische Aktivität mancher *Lactococcus*-Stämme ist für ihren Einsatz als Starterbakterien bei der Herstellung von Käse unerläßlich. Garde et al. entwickelten ein Nachweissytem für das *acmA*-Gen, das für das Enzym N-Acetylmuramidase codiert und durch Hydrolyse der Peptidoglykanschicht Peptidasen freisetzt (Garde et al., 1999). Diese tragen wiederum zur Reifung und Geschmacksbildung des Käses bei. Wichtige Eigenschaften wie die Aufnahme von Citrat, die Proteolyseaktivität und die Produktion der Bacteriocine Nisin A oder Z wurden durch die PCR-Amplifikation der Gene *citP*, p*rtP* und *nisA* und *nisZ* nachgewiesen (Klijn et al., 1995). Am Beispiel des an der Fermentation von Fleisch und Gemüse beteiligten Bakteriums *Pediococcus acidilactici* wurden genetische Subpopulationen anhand von DNA-analytischen und phänotypischen Methoden verglichen (Mora et al., 2000). Der Nachweis der Spezieszugehörigkeit durch die 16S rDNA-Gene, der Kohlenhydratnutzung (*ldh*-Gene und *mle*-Gen) und des Pediocins zeigten gute Übereinstimmung mit

physiologischen Tests. Zur Identifizierung von Bacteriocin-produzierenden Milchsäurebakterien etablierten Rodriguez et al. ein PCR-basiertes Nachweissystem für Nisin und Lacticin 481 aus *L. lactis* und Enterocin AS-48 aus *Enterococcus* (Rodriguez et al., 2000). Die Anwesenheit einiger *Lactococcus*-Phagen-Spezies in Referenzproben konnte ebenfalls durch PCR nachgewiesen werden (Labrie und Moineau, 2000).
Diese Screening-Verfahren beleuchten einzelne Teilaspekte der Gesamtanforderung an einen Starterkulturstamm und können als Grundlage für die molekularbiologische Stammtypisierung des weit verbreiteten Starterkulturstamms *Lactococcus lactis* dienen. Mit Hilfe biotechnologischer Methoden sollte es daher möglich sein, neue Stämme zu identifizieren, die den hohen Anforderungen der Milchindustrie gerecht werden (Konings et al., 2000).

1.2.3. Simultane Genanalyse durch DNA-Chip-Technologie

Die Fortschritte bei der Entwicklung der DNA-Chip-Technologie und der Erforschung von Genen und Genomen bietet die Möglichkeit, die Errungenschaften dieser beiden Bereiche zu einem Ansatz der vergleichenden Genotypisierung zu verknüpfen (Harrington et al., 2000; Landers, 1999; Lee und Lee, 2000). DNA-Mikroarrays können dazu benutzt werden Tausende DNA-Sequenzen gleichzeitig in Genexpressionsstudien, vergleichenden Genomanalysen oder dem gezielten Nachweis bestimmter Gene zu analysieren (Case-Green et al., 1998; Ferea und Brown, 1999). Generell stehen verschiedene Mikroarray-Typen zu Verfügung. Mehrere hundert Basenpaar lange Sequenzen, meist ganze Gene, können als Sonde auf der Chip-Oberfläche fungieren (de Risi et al., 1997). Wird z.B. cDNA aus Kontroll- und Test-Organismen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, lassen die Hybridisierungssignale Aussagen über unterschiedlich exprimierte Gene zu (Duggan et al., 1999). Sollen Oligonukleotide als Sonden auf dem DNA-Chip eingesetzt werden, können diese entweder durch photolithographische Prozesse auf der Oberfläche synthetisiert werden oder als fertige Oligonukleotide an die Oberfläche gekoppelt werden (Chee et al., 1996). Ein Vorteil der Oligonukleotid-Arrays besteht darin, dass durch die kurzen Sondensequenzen Kreuzhybridisierungen mit ähnlichen Genen vermieden werden. In *E. coli* enthalten beispielsweise 556 von 4.288 ORFs Teilbereiche, die länger als 200 bp sind und mehr als 50% Sequenzidentität zu mindestens einem anderen ORF des Genoms aufweisen (Richmond et al., 1999). Für das Design Gen-spezifischer Oligonukleotidsonden muß die DNA-Sequenz des nachzuweisenden Gens bekannt sein. Um cDNAs oder PCR-Produkte auf einen Chip zu binden, ist diese Information nicht zwingend erforderlich.

Am häufigsten werden Mikroarrays derzeit im Bereich der Humanmedizin eingesetzt (Epstein und Butow, 2000). Ein Vergleich der Genexpression in normalen und metastatisierenden Brustzellen lieferte z.B. neue Erkenntnisse über die Entwicklung von Brustkrebs (Perou et al., 1999). Ähnliche Studien wurden für die genetische Klassifizierung von Leukämiearten (Golub et al., 1999), Prostata-Krebs (Bubendorf et al., 1999) und andere Krebsarten durchgeführt. Um den Effekt einer HIV-Infektion auf CD4-positive T-Zellen zu untersuchen, wurde die Expression von 1.500 cDNAs durch die Mikroarray-Technologie analysiert (Geiss et al., 2000). Durch den Vergleich der Genexpression von 5.000 Genen konnten 62 ORFs identifiziert werden, die bei gesunden und an Multipler Sklerose erkrankten Menschen unterschiedlich exprimiert werden (Whitney et al., 1999).

Bisher gibt es nur wenige Beispiele für die Anwendung der Mikroarray-Technologie in der Bakterienanalytik. De Saizieu et al. konnten zeigen, dass bei der Hybridisierung von Gesamt-RNA verschiedener Zellen Unterschiede in der Genexpression zu erkennen sind (de Saizieu et al., 1998). Dieser Ansatz wurde für den Expressionsvergleich von 4.290 *E. coli*-Genen genutzt, bei dem die Zellen entweder auf Minimal- oder auf Vollmedium gewachsen waren (Tao et al., 1999). Nach der Aufklärung des Genoms von *Mycobacterium tuberculosis* wurden 97% der identifizierten ORFs als Sonden für die Mikroarray-Analyse eingesetzt und die Genexpression nach Einsatz des Tuberkulose-Hemmstoffes Isoniazid untersucht (Wilson et al., 1999). Die Ergebnisse dieser Studie dienen dazu, neue Medikamente gegen Tuberkulose zu entwickeln und resistente Bakterienstämme zu vermeiden. Um neue Impfstoffe gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* zu finden, wurde mit Hilfe der Mikroarray-Technologie ein Expressionsscreening durchgeführt, das zur Aufklärung der an den Entwicklungsstadien des Erregers beteiligten Gene beigetragen hat (Hayward et al., 2000).

Seit einigen Jahren bietet die Firma Genescan den ersten kommerziell erhältlichen DNA-Array zur Identifizierung der Krankheitserreger *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejunii* und *Salmonella* ssp. in Lebensmitteln an. Dieser "Nutri-Chip" nutzt allerdings das Analysepotential, das die Mikroarray-Technologie bietet, bei weitem nicht aus. Kuipers er al. hob 1999 anläßlich des "6th Symposium on Lactic Acid Bacteria" die umfangreichen Einsatzmöglichkeiten der DNA-Chip-Technologie in der Lebensmittelindustrie hervor (Kuipers et al., 1999). Die Methode bietet zukünftig die Möglichkeit bestehende Starterkulturen und ihre Fermentationen DNA-analytisch zu überwachen und erlaubt die Entdeckung neuer, produktionstechnisch interessanter Bakterienstämme. Durch die Kombination zahlreicher Oligonukleotide werden nicht nur diverse Parameter simultan untersuchbar, sondern es lassen sich auch die unterschiedlichen Methoden zur

Organismenidentifizierung und zur Bestimmung fermentationsrelevanter Eigenschaften auf einem Oligonukleotid-Array vereinen.

1.3. Ursachen von Fehlfermentationen

Fehlfermentationen können verschiedene Ursachen haben. 70-80% aller Produktionsstörungen werden durch Phagen verursacht (Hunger, 1986), die durch die Milch, unzureichend desinfizierte Fermenter oder durch das semisterile Molkereiumfeld in die Produktionstanks gelangen (Riemelt et al., 1996). Die anschließende Lyse der Starterkulturspezies führt zu Säuerungsstörungen (Klaenhammer und Fitzgerald, 1994). Aber auch bakterielle Verunreinigungen können die in der Starterkultur enthaltenen Mikroorganismen verdrängen. Dadurch wird die Milch nicht mehr zum gewünschten Produkt umgesetzt. Außerdem können Enzyme für produkt-typische Eigenschaften, die bei der Gattung *Lactococcus* häufig Plasmid-codiert sind, bei Verlust der extrachromosomalen DNA nicht mehr exprimiert werden. Eigenschaften wie Phagenresistenzen, Citratstoffwechsel oder die Bildung von Geschmacksstoffen können auf diese Weise verloren gehen.

1.3.1. Bakterielle Verunreinigungen

Speisequark und andere Milchprodukte sind aufgrund ihres hohen Wasser- und Nährstoffgehalts sowie ihrer Kontaminationsanfälligkeit ein leicht verderbliches Produkt. Obwohl die Anzahl der mikrobiologischen Lebensmittelvergiftungen in den letzten Jahren ständig zugenommen hat, sind Aussagen über das tatsächliche Auftreten bestimmter mikrobieller Lebensmittelvergifter nur bedingt möglich. Zum einen ist der Anstieg auf bessere mikrobiologische Nachweisverfahren und eine verschärfte Meldepflicht zurückzuführen, andererseits werden von der Statistik nur Lebensmittelvergiftungen erfaßt, bei der eine größere Anzahl von Personen erkrankt. Routinemäßig durchgeführte Laboruntersuchungen schließen auch nicht alle potentiell pathogenen Mikroorganismen ein, da nur wenige Erreger nach dem Bundesseuchengesetz meldepflichtig sind. Darüber hinaus sucht nur ein Teil der Erkrankten den Arzt auf und nur selten werden dann die Ursachen der Erkrankung erforscht. Die meisten Lebensmittelvergiftungen, die nach dem Verzehr von Milch und Milchprodukten auftreten, sind auf Bakterienarten wie *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter*, enterotoxisches *Escherichia coli* (ETEC*), Yersinia enterocolitica* oder *Staphylococcus aureus* zurückzuführen (Krämer, 1997).

Neben coliformen Bakterien gehören aber auch Enterokokken, *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, Clostridien und Mikrokokken zur thermoresistenten Restflora des Speisequarks (Zickrick, 1996). Enterokokken und zahlreiche Clostridien bilden in der Milch durch Decarboxylierung von Aminosäuren sogenannte biogene Amine wie z.B. das Tyramin, das für den Menschen toxisch sein kann (Krämer, 1997). Nach Brechdurchfällen wurden häufig *Bacillus*-Arten ($>10^5$/g) aus eiweißreichen Milchprodukten isoliert. Für den Nachweis des krankmachenden Enterotoxins stehen noch keine für die Laborroutine geeigneten Methoden zur Verfügung (Krämer, 1997; Beck, 2002).

1.3.2. Verlust von fermentationsrelevanten, Plasmid-codierten Eigenschaften

Typisch für die Gattung *Lactococcus* ist die ungewöhnlich hohe Zahl von Plasmiden. Die Größe dieser extrachromosomalen DNA-Fragmente reicht von 2 bis über 100 kb. (Teuber et al., 1993). Die Anzahl der verschiedenen aus Einzelisolaten von Starterkulturen identifizierten Plasmide variiert zwischen einem und 12 DNA-Elementen (Andresen et al., 1984; Davies et al., 1981). Plasmid-freie Stämme erhält man lediglich durch "Plasmid curing" mit Akridin- oder Ethidiumbromid-haltigen Lösungen und durch Wachstum bei erhöhten Temperaturen (Pechmann und Teuber, 1980). Durch diese Behandlung bzw. den anschließenden Transfer bestimmter Plasmide konnte ein Zusammenhang zwischen wichtigen Stoffwechseleigenschaften wie Lactose-Verwertung bzw. Proteinase-Aktivität und den jeweiligen Plasmiden gezeigt werden (Kuhl und McKay, 1979). Weitere Plasmid-codierte Eigenschaften sind Phagenresistenz, Citratfermentation, Bakteriozin-Produktion und der Transport bzw. Metabolismus von Zuckern.

Um auf die ständige Bedrohung durch Bakteriophagen schnell und flexibel reagieren zu können, müssen in der Starterkultur verschiedene Verteidigungsmechanismen vorhanden sein (Forde und Fitzgerald, 1999b). Abhängig davon, in welcher Infektionsphase die Abwehr erfolgt, werden die Phagenresistenzgene in die vier in Abb. 1 dargestellten Gruppen unterteilt (Allison und Klaenhammer, 1998; Garvey et al., 1995b; Hill, 1993).

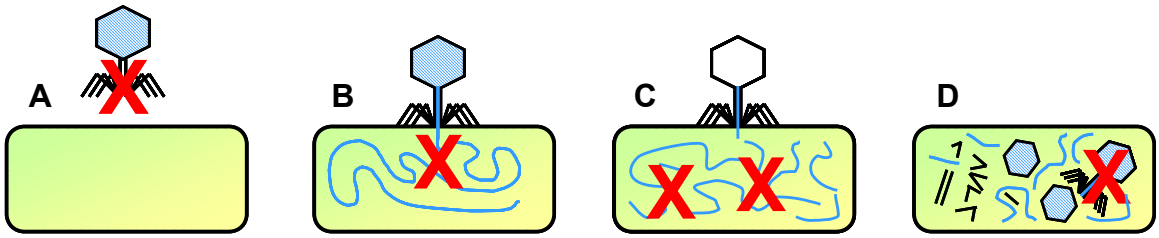


Abb. 1. Phagenresistenzmechanismen bei *Lactococcus* spec.
A Verhinderung der Phagenadsorption
B Blockierung der DNA-Penetration
C Restriktion der Phagen-DNA
D Abortive Phageninfektion - Inhibition des Phagenzusammenbaus

Die beiden ersten Mechanismen verhindern ein Eindringen der Phagen-DNA in das Bakterium, indem sie entweder die Adsorption des Phagen an die Bakterienhülle oder die Injektion der DNA unterbinden. Phagenresistenzen, bei denen keine Adsorption stattfindet, basieren vermutlich auf der Produktion von extrazellulären Polymeren wie z.B. Polysacchariden, die den Phagenrezeptor blockieren, oder auf Mutationen im Phagenrezeptor (Forde und Fitzgerald, 1999a). Bis heute konnte nur ein Gen für diese Art der Phagenresistenz identifiziert werden (vgl. Tab. 1). Beim Resistenzmechanismus, der die Injektion der Phagen-DNA verhindert konnte nachgewiesen werden, dass sich der Phage zwar an die Zelle anheften, diese aber nicht penetrieren kann (Garvey et al., 1996).

Die auf Restriktion und Modifikation basierende Abwehr wirkt nicht gezielt gegen Phagen-DNA, sondern erkennt Fremd-DNA aufgrund von Basen-Methylierungen, die nicht dem für die Bakterienzelle typischen Muster entsprechen. Die zellfremde DNA wird geschnitten und abgebaut. Restriktions-/Modifikationssyteme (R/M-Systeme) werden aufgrund der Struktur ihrer Untereinheiten, der Sequenzerkennung, der Position der Schnittstelle und des Bedarfs an Cofaktoren in 3 Typen eingeteilt. Am weitesten verbreitet sind Typ II R/M-Systeme, von denen bei der Gattung *Lactococcus* bisher 8 verschiedene identifiziert werden konnten (vgl. Tab. 1). Die Enzyme bestehen aus zwei getrennten Untereinheiten, von denen eine für die Modifikation des bei der semikonservativen Replikation neu synthetisierten DNA-Stranges verantwortlich ist. Die andere Untereinheit erkennt palindromische Sequenzen von 4 bis 8 bp Länge und schneidet die DNA innerhalb dieser Sequenz, wenn keine korrekte Methylierung vorliegt. Die Enzyme *Lla*II, *Lla*AI und *Lla*KR2I erkennen die Schnittstelle 5'-↓GATC-3' und schneiden die Sequenz in Abhängigkeit von ihrer Methylierung am Adenin (2 m^6A) bzw. Cytosin (m^5C). Eine Besonderheit stellt das Enzym *Lla*I dar, dessen Sequenz von dem

konjugativen Plasmid pTR2030 kodiert wird. Bei diesem, Typ IIs genannten R/M-System liegt die Schnittstelle außerhalb der Erkennungssequenz (O`Sullivan et al., 1995).

Gen	***kodiert auf***	***Stamm***	***Resistenz gegen***	***Mechanismus***	***Literatur***
Inhibition der Phagenadsorption:					
ads	pCI658	*L.l.c.* HO2	936: 712 c6A: c2	Interaktion beim Anheften der Phagen	(Forde und Fitzgerald, 1999a)
Blockierung der DNA-Injektion:					
pip	Chr	*L.l.l.* C2	c6A: c2	verhindert die DNA-Injektion	(Geller et al., 1993)
DNA-Restriktion:					
*lld*I	pND861	*L.l.l. diacetyl* UK19161	Fremd-DNA	RM Typ I	(Deng et al., 1999)
lla 1403	pIL2614	*L.l.l.* IL1403	Fremd-DNA	RM Typ I	(Schouler et al., 1998a)
*scr*FI	Chr	*L.l.c.* UC503	Fremd-DNA 5'-CC↓NGG-3'	RM Typ II	(Davis et al., 1993)
lla I	pTR2030	*L.l.l.* ME2	Fremd-DNA 5'-CC↓WGG-3'	RM Typ IIs	(O`Sullivan et al., 1995)
lla II	pSRQ700	*L.l.c.* DCH-4	Fremd-DNA 5'-↓GATC-3'	RM Typ II	(Moineau et al., 1995a)
*lla*AI	pFW094	*L.l.c.* W9	Fremd-DNA 5'-↓GATC-3'	RM Typ II	(Nyengaard et al., 1993) (Nyengaard et al., 1995)
*lla*BI	pJW563	*L.l.c.* W56	Fremd-DNA 5'-C↓TRYAG-3'	RM Typ II	(Nyengaard et al., 1996)
*lla*BII	pJW565	*L.l.c.* W56	Fremd-DNA	RM Typ II	(Nellemann et al., 1997) unpublishedAcc.nr. Y12736
*lla*CI	pAW153	*L.l.c.* W15	Fremd-DNA 5'-AA↓GCTT-3'	RM Typ II	(Madsen und Josephsen, 1998a)
*lla*DII	pHW393	*L.l.c.* W39	Fremd-DNA 5'-GC↓NGC-3'	RM Typ II	(Madsen und Josephsen, 1998b)
lla KR2I	pKR223	*L.l.l. diacetyl* KR2	Fremd-DNA 5'-↓GATC-3'	RM Typ II	(Twomey et al., 1998)
*lla*FI	pND801	*L.l.c.* LL42-1	Fremd-DNA	RM Typ III	(Su et al., 1999)

Tab. 1. Phagenresistenz vermittelnde Gene bei *Lactococcus lactis*: Verhinderung der Adsorption des Phagen, Blockade der DNA-Injektion und Restriktion der Phagen-DNA.

Typ III R/M-Systeme bestehen aus 2 Untereinheiten, die gemeinsam ein Holoenzym mit Restriktions- und Modifikationsfunktion bilden. Das Enzym erkennt asymmetrische Sequenzen und schneidet die DNA in einem definierten Abstand von 25 bis 27 bp zur Erkennungssequenz. In *Lactococcus* konnte bisher nur ein Enzym des Typs III identifiziert und charakterisiert werden (Su et al., 1999).

Das Typ I R/M-System, von dem bisher zwei Beispiele aus Lactococcus bekannt sind, stellt den komplexesten Typ dar (Deng et al., 1999; Schouler et al., 1998a). Es besteht aus 3 Untereinheiten, genannt "host specificity determinants" (Hsd), die zusammen ein Holoenzym bilden. Die HsdS-Untereinheit bestimmt die Nukleotid-Spezifität. Die zweite Komponente, HsdM dient der Modifikation. Die ATP-abhängige Restriktion, die von der dritten Untereinheit HsdR bewerkstelligt wird, kann mehr als 1 kb von der Erkennungssequenz entfernt stattfinden (Yuan, 1981).

Wie aus Tab. 1 hervorgeht sind viele dieser Abwehrmechanismen Plasmid-codiert. Meist liegen die Untereinheiten auf einem Plasmid nebeneinander. Die Enzyme sind aber auch funktionsfähig, wenn die Nukleotidsequenzen der Komponenten auf verschiedenen Plasmiden lokalisiert sind (Schouler et al., 1998b). Als einziges chromosomal codiertes Enzym wurde bisher *Scr*FI, das dem R/M-Typ II angehört, entdeckt (Davis et al., 1993).

Die vierte Gruppe der Phagenresistenzgene wird unter dem Begriff "Abortive Infection", kurz *abi* zusammengefaßt (Tab. 2). Darin sind Mechanismen enthalten, die wichtige Schritte bei der Replikation, der Transkription oder der Translation der Phagen-DNA bzw. RNA stören.

Abi-ähnliche Mechanismen sind bei verschiedenen Bakterienspezies beschrieben worden, ihre Funktionsweise wurde aber hauptsächlich in *E. coli* untersucht. Modelle für die Wirkungsweise wurden für drei Resistenzmechanismen erstellt: Rex, Lit und PrrC (Snyder, 1995). RexA und RexB fungieren als "Sensor-Aktivator"- und "Response-Regulator"-Paar. Als Antwort auf die Phageninfektion aktiviert RexA das RexB-Protein und ein Ionenkanal, der das Membranpotential zerstört, bildet sich aus (Parma et al., 1992). Die anderen beiden Mechanismen blockieren die Translation, indem sie entweder auf den Elongationsfaktor EF-Tu oder auf die $tRNA^{Lys}$ wirken. Durch die Protease-Aktivität von Lit wird EF-Tu degradiert (Kao und Snyder, 1988). Nach T4-Infektion schneidet die Ribonuklease PrrC die $tRNA^{Lys}$ (Levitz et al., 1990).

Der genaue Wirkmechanismus der *abi*-Gene von *Lactococcus* ist nur selten bekannt. Am Beispiel von AbiA konnte gezeigt werden, dass es die Replikation von kleinen isometrischen Phagen beeinflußt (Dinsmore und Klaenhammer, 1994; Moineau et al., 1993a). Parreira et al. zeigten, dass AbiB die Degradation der Phagen-mRNA fördert (Parreira et al., 1996a). Ein

Produkt der frühen Phagengene könnte die RNase-Aktivität in *abiB*$^+$-Zellen erhöhen. AbiC verhindert nicht die Replikation der Phagen-DNA, sondern reduziert die Synthese der Strukturprotein des Phagen (Durmaz et al., 1992). Am Beispiel des Phagen bIL66 konnte gezeigt werden, dass AbiD1 in Wechselwirkung mit dem Produkt des Gens *orf1* tritt. Dadurch wird die Translation des *orf3* verhindert und die Vermehrung des Phagen unterbunden (Bidnenko et al., 1995). Während in Zellen, die a*biF* exprimieren, keine Replikation der Phagen-DNA auftritt, greift das AbiE Protein erst in der späten Phase des lytischen Zyklus in die Phagenreifung ein (Garvey et al., 1995a). Gleiches gilt auch für AbiG, bei dem die Phagen-DNA ungehindert repliziert wird. Der phagenresistente Phänotyp äußert sich erst in der späten lytischen Phase, in der die Synthese der Phagen-RNA gestört wird (O`Connor et al., 1999). In welchem Stadium AbiK bei der Reifung der Phagen interveniert, hängt vom Phagen selbst ab. Während bei der Infektion des zur P335-Spezies gehörenden Phagen ul36 keine Replikation mehr stattfindet (Emond et al., 1997), wurde bei den zur 936-Spezies gehörenden Phagen p2 und P008 die Reifung der konkatemeren Phagen-DNA verhindert (Boucher et al., 2000). AbiL beeinflußt die Reifung des Phagen in der posttranslationalen Phase des lytischen Zyklus (Deng et al., 1999). Das in AbiM gefundene "Helix-Turn-Helix"-Motiv, das für DNA-bindende Proteine charakteristisch ist, deutet auf eine Interaktion mit der Phagen-DNA hin (Deng et al., 1997). Ebenso wie bei AbiK findet in durch AbiQ geschützten Bakterienzellen keine Reifung der konkatemeren Phagen-DNA mehr statt (Emond et al., 1998) und AbiR stört die Replikation von Phagen-DNA der Spezies c2 (Twomey et al., 2000). Wie aus Tab. 2 hervorgeht, beschränkt sich die durch *abi*-Gene vermittelte Resistenz nicht nur auf einzelne Phagen, sondern gilt, soweit getestet, für mehrere Phagen der gleichen Spezies. Darüber hinaus wirkt die Phagenresistenz bei den meisten Mechanismen sogar auf Phagen mit verschiedener Spezieszugehörigkeit. Das einzig erkennbare Charakteristikum, das alle *abi*-Gene gemeinsam haben, ist ihr im Vergleich zur *Lactococcus*-DNA signifikant niedrigerer G+C-Gehalt (Twomey et al., 2000). Die einzelnen Gene weisen nur wenig Sequenzähnlichkeiten auf. Lediglich *abiF* zeigt 26% Sequenzhomologie zu *abiD* bzw. 46% zu *abiD1* (Rince et al., 2000). Während die meisten Resistenzmechanismen des "*abi*"-Typs auf nur einem Genort basieren, sind im Fall von *abiE*, *abiG*, *abiL* und *abiR* zwei ORFs für die Expression des phagenresistenten Phänotyps nötig.

Gen	*kodiert auf*	*Stamm*	*Resistenz gegen*	*Mechanismus*	*Literatur*
abiA	pCI750, pTR2030, pCI829	*L.l.l.* ME2	936: sk1, 712 P335: ϕ31, ul36, ϕ48, ϕ50 c6A: c2	stört die Phagen-DNA-Replikation	(Dinsmore und Klaenhammer, 1997)
abiB	pIL2101	*L.l.l.* IL416	936: bIL170, nicht bIL41	Degradation des Phagen-transkripts (RNase-Aktivität)	(Cluzel et al., 1991)
abiC	pTN20	*L.l.l.* ME2	936: sk1, jj50, P2 P335: ul36 c6A: c2 ?: m12r	geringere Synthese von Phagen-Strukturproteinen	(Durmaz et al., 1992)
abiD	pBF61	*L.l.l.* KR5	936: sk1 c6A: c2	Interaktion mit der Phagen-DNA	(McLandsborough et al., 1995)
abiD1	pIL105	*L.l.l.* IL1403	936: bIL66, bIL170 c6A: c6A, bIL67	Interaktion mit Phagen-Genprodukt, keine Translation der Phagen-RNA	(Anba et al., 1995)
abiE	pNP40	*L.l.l. diacetyl* DRC3	936: ϕ712	Interferrenz bei der Phagenentwicklung in der späten lytischen Phase	(Garvey et al., 1995a)
abiF	pNP40	*L.l.l. diacetyl* DRC3	936: ϕ712 c6A: ϕc2	verhindert die Phagenreplikation	(Garvey et al., 1997)
abiG	pCI750	*L.l.c.* UC653	936: ϕ712 c6A: ϕc2	stört die Synthese der Phagen-RNA in der späten lytischen Phase	(O`Connor et al., 1996)
abiH	Chr	*L.l.l. diacetyl* S94	936: ϕ59 c6A: ϕ53 (pr)	Mechanismus unbekannt	(Prevots et al., 1996)
abiI	pND852	*L.l.l.* M138	936: ϕ712 c6A: ϕc2	Mechanismus unbekannt	(Su et al., 1997)
abiK	pSRQ800	*L.l.l.* W1	936: p2, sk1, jj50 P335: ul36, Q30, Q33	Interaktion bei der Reifung der konkatemeren Phagen-DNA	(Emond et al., 1997)
abiL	pND861	*L.l.l. diacetyl* LD10-1	936: ϕ712 c6A: ϕc2	posttranskriptionale Störung des lytischen Zyklus	(Deng et al., 1999)
abiM	pND859	*L.l.l. diacetyl* UK12922	936: 712	Interaktion mit der Phagen-DNA	(Deng et al., 1997)
abiN	Chr	*L.l.c.* S114	936: ϕ59 c6A: ϕ53	Mechanismus unbekannt	(Prevots et al., 1998b)
abiO	pPF144	-	936: ϕ59 c6A: ϕ53	Mechanismus unbekannt	(Prevots und Ritzenthaler, 1998a)
abiP	pIL2614	*L.l.l.* IL1403	nicht bestimmt	Mechanismus unbekannt	(Schouler et al., 1998a)
abiQ	pSRQ900	*L.l.* W37	936: p2 c6A: c21	konkatemere Phagen-DNA kann nicht mehr verpackt werden	(Emond et al., 1998)
abiR	pKR223	*L.l.l. diacetyl* KR2	c2	stört die Phagen-DNA-Replikation	(Twomey et al., 2000)

Tab. 2. Phagenresistenzgene bei *Lactococcus lactis*: "Abortive Infection of Phages".

Um sich effektiv gegen Phagen schützen zu können, enthalten natürliche Isolate der Gattung *Lactococcus* mehrere Phagenresistenzmechanismen. Im Stamm *L. l.* ssp. *lactis* ME2 konnte z.B. ein Gen für die Adsorptionsresistenz, 2 R/M-Systeme und die Gene für *abiA* und *abiC* identifiziert werden (Durmaz et al., 1992). Auf dem Plasmid pKR223 befindet sich sowohl ein Gen für die Restriktion- und Modifikation von Fremd-DNA (*lla*KR2I) als auch der *abiR*-Mechanismus (Twomey et al., 2000). Werden natürliche "Abi"-Mechanismen in phagensensitive *L. lactis* Stämme eingeführt, lassen sich diese Stämme erfolgreich zur industriellen Milchfermentation einsetzen (Sanders et al., 1986). Der extensive Einsatz dieser Stämme mit verbesserter Phagenresistenz führte allerdings zu neuen Phagenmutanten, die in der Lage sind das Abwehrsystem zu überwinden (Alatossava und Klaenhammer, 1991). Um Milchfermentationen langfristig vor Phagen zu schützen, müssen Starterkulturen über ein breites Spektrum von Phagenresistenzgenen verfügen. Dabei sollte nicht nur ein Vertreter der 4 verschiedenen Abwehrmechanismen vorhanden sein. Durch Kombination der Resistenzgene mit unterschiedlicher Phagenspezifität kann eine leistungsfähige Verteidigungsstrategie verfolgt werden.

Eine erfolgreiche Fermentation erfordert neben der Phagenabwehr auch die Ausbildung von produkttypischen Eigenschaften wie Aroma und Geschmack. Die dafür nötigen Inhaltsstoffe wie Diacetyl, Acetat, Ethanol, Formiat, Acetoin und 2,3-Butandiol entstammen dem Lactose-Metabolismus und der Citratfermentation von *L. l.* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* und *Leuconostoc mesenteroides* (Ramos et al., 1994). Milchsäurebakterien benötigen drei Enzyme, um das Citrat der Milch zu Pyruvat umzusetzen. Die Citrat-Permease (CitP) importiert das Citrat in die Zelle, die Citrat-Lyase (CL, EC 4.1.3.6) setzt es zu Acetat und Oxalacetat um und die Oxalacetat-Decarboxylase katalysiert den Abbau zu Pyruvat und CO_2 (Bekal-si Ali et al., 1999). Benson et al. konnten die *ilvBN*-Gene für das Enzym α-Acetolactat-Synthase (ALS, EC 4.1.3.18) in *L. lactis* identifizieren, das Pyruvat zu α-Acetolactat umsetzt (Benson et al., 1996). Dieses instabile Zwischenprodukt zerfällt entweder durch oxidative Decarboxylierung zu Diacetyl oder wird von der α-Acetolactat-Decarboxylase (ALD, EC 4.1.1.5) zu Acetoin umgesetzt (Hugenholtz, 1993). In allen bisher untersuchten Citrat-verstoffwechselnden *Lactococcus*-Stämmen war die genetische Information für die Aufnahme des Citrats an ein Plasmid gebunden (Kempler und MacKay, 1979). Ohne das *citP*-Gen findet kein Citrat-Transport statt (Magni et al., 1994). Für das Enzym Citrat-Lyase liegen keine Sequenzinformationen aus *L. l.* spp. *lactis* biovar. *diacetylactis* bzw. *Leuc. mesenteroides* vor. Durch Charakterisierung des Citratclusters *citMCDEFGRP* des phylogenetisch nah verwandten Bakterienstamm *Leuc.*

paramesenteroides konnte jedoch gezeigt werden, dass die darin enthaltenen Enzyme Citrat-Permease und Citrat-Lyase durch ein Plasmid codiert werden (Martin et al., 1999).

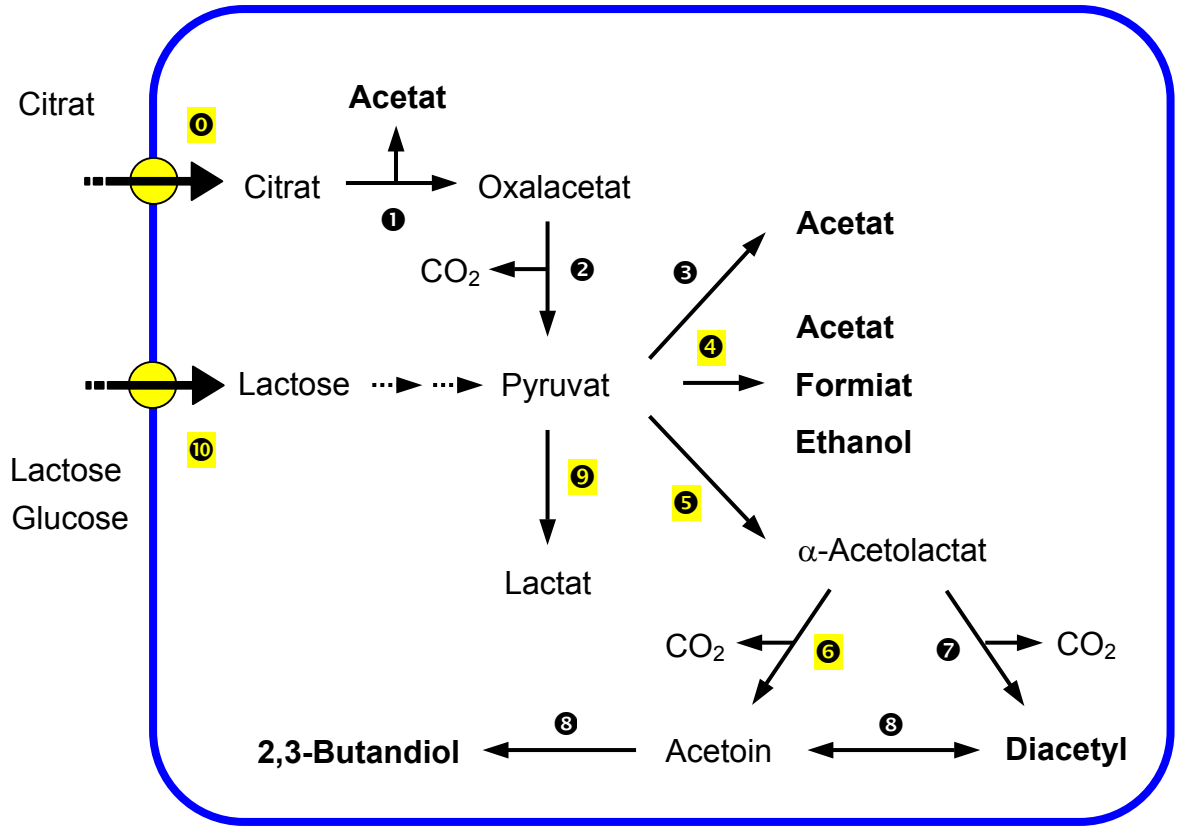


Abb. 2. Citrat- und Lactose-Metabolismus in Milchsäurebakterien (Swindell et al., 1996).
❶ Citrat-Permease, ❶ Citrat-Lyase, ❷ Oxalacetat-Decarboxylase, ❸ Pyruvat-Dehydrogenase, ❹ Pyruvat-Formiat-Lyase, ❺ α-Acetolactat-Synthase, ❻ α-Acetolactat-Decarboxylase, ❼ oxidative Decarboxylierung, ❽ Diacetyl-Acetoin-Reduktase, ❾ Lactat-Dehydrogenase, ❿ Lactose-Permease.
(Schattierung bedeutet, dass die DNA-Sequenz des Enzyms aus *L. lactis* vorliegt).

1.3.3. Phagen-bedingte Lyse von Starterkultur-Spezies

Vor mehr als 65 Jahren identifizierten Whitehead et al. einen Phagenbefall als Ursache für Fehlfermentationen in Milchprodukten (Whitehead und Cox, 1935). Als Infektionsursachen kommen dabei auch heute noch unzureichende Milcherhitzung bzw. Desinfektion der Fermenter oder der Eintrag der Phagen über die Luft in die meist noch offenen Kulturtanks in Frage (Riemelt et al., 1996). Zudem finden Milchfermentationen im großindustriellen Maßstab in 50.000 l Tanks statt, die aus wirtschaftlichen Gründen zum Teil mehrmals am Tag befüllt werden (Daly, 1983). Nicht selten erfolgt eine Anreicherung der Phagen im Großfermenter, die schließlich zur Lyse der Starterkultur und zum Ausfall der Säuerungsaktivität führen.

Die Klassifizierung von *Lactococcus*-Phagen in 12 Spezies erfolgt auf der Basis von Morphologie und DNA-Homologie und umfaßt sowohl lytische als auch lysogene Vertreter (Jarvis et al., 1991). Diese Taxonomie wurde später auf 10 Spezies reduziert (Jarvis et al., 1995; Moineau et al., 1995a). Die Größe der linearen Phagengenome mit kohesiven Enden beträgt zwischen 18 und 54 kb (Braun et al., 1989). Weltweite Studien haben gezeigt, dass Störungen bei industriellen Milchfermentationen hauptsächlich auf Mitglieder der Spezies 936, P335 und c2 zurückzuführen sind (Jarvis et al., 1991; Moineau et al., 1996; Moineau et al., 1992). Bei den Spezies 936 und c2 sind ausschließlich virulente Vertreter bekannt. Bei der Spezies P335 wurden sowohl lytische als auch lysogene Phagen identifiziert (Chopin et al., 2001). Alle drei der genetisch nicht miteinander verwandten Gruppen besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom und lange, nicht-kontraktile Schwänze. Folglich gehören sie zur Familie der *Siphoviridae*. Die Phagen des Morphotyps B1, zu dem die Spezies 936, P335 und BK5-T gehören, haben kleine isometrische Köpfe und besitzen morphologische Ähnlichkeit zum Phagen λ aus *E. coli* und SPP1 aus *B. subtilis* (Emond et al., 1998). Die unter Bakteriophagen einzigartige Spezies c2 hat prolate Köpfe und gehört dem Morphotyp B2 an. Das Taxon c2 ist die einzige Gruppe der *Lactococcus*-Phagen, die vom "International Committee on Taxonomy of Viruses" als eigener Genus eingestuft wurde (Pringle, 1996).

Morpho-typ	*Spezies*	*Typ-Phage*	*wichtige Vertreter*	*Sequenz-länge*	*Genbank*	*Literatur*
B1	936	P008		~ 29,7 kb		(Loof et al., 1983)
			sk1 (S)	28.451 bp	NC_001835	(Chandry et al., 1997)
			bIL170 (S)	31.754 bp	AF009630	(Crutz-Le Coq et al., 2002)
			bIL41	10.170 bp	L35061	(Parreira et al., 1996b)
			712	3.204 bp	AF087814	(Rince et al., 2000)
			ϕvi	2.681 bp	AF090370	unpublished
			bIL66	2.404 bp	L35175	(Bidnenko et al., 1995)
			F4-1	3.353 bp	M37979	(Chung et al., 1991)
			p2	940 bp	AF152407	(Labrie et al., 2000)
			Q7	940 bp	AF152409	"
			Q42	940 bp	AF152408	"
			P482 (S)			diese Arbeit
	P335	P335		~ 36,4 kb		(Braun et al., 1989)
			ϕr1t (S)	33.350 bp	U38906	(van Sinderen et al., 1996)
			bIL285	35.538 bp	AF323668	(Chopin et al., 2001)
			bIL286 (S)	41.834 bp	AF323669	"
			bIL309 (S)	36.949 bp	AF323670	"
			ul36 (S)	36.798 bp	AF349457	(Labrie et al., 2002)
			TP901-1 (S)	37.667 bp	AF304433	(Brondsted et al., 2001)
			Tuc2009 (S)	38.347 bp	AF109874	unpublished
			4268 (S)	36.596 bp	AF489521	unpublished
			ϕ31	3.516 bb	AF022773	(Walker et al., 1998)
			ϕLC3	7.987 bp	AF242738	(Lillehaug et al., 1997)
			us3	1.619 bp	M90423	(Platteeuw et al., 1992)
	BK5-T	BK5-T	(S)	40003 bb	AF176025	(Desiere et al., 2001)
B2	c2	c6A		~ 21,9 kb		(Powell et al., 1985)
			P001	~ 20,2 kb		(Hertwig et al., 1997)
			c2 (S)	22.163 bp	L48605	(Lubbers et al., 1995)
			bIL67 (S)	22.195 bp	L33769	(Schouler et al., 1994)
			ml3	1.207 bp	X16178	(Shearman et al., 1994)
			Q30	800 bp	AF152414	(Labrie et al., 2000)
			Q38	1.480 bp	AF152411	"
			Q44	1.481 bp	AF152412	"
			eb1	1.486 bp	AF152410	"

Tab. 3. *Lactococcus*-Phagenspezies und deren wichtigste Vertreter.
(S) komplette Sequenz des Phagengenoms vorhanden.

In den Datenbanken sind zwar zahlreiche Teilsequenzen der oben aufgeführten Phagen hinterlegt, vollständige Sequenzen der Spezies 936 liegen jedoch nur für die Phagen sk1 (Chandry et al., 1994b) und bIL170 (Crutz-Le Coq et al., 2002) vor. Für sk1 wurden 54, für bIL170 63 ORFs identifiziert. Nach der Infektion von *L. lactis* durch sk1 lassen sich drei verschiedene Phasen der DNA-Transkription, eine frühe, eine mittlere und eine späte, unterscheiden (Beresford et al., 1993; Chandry et al., 1994a). Als Vertreter der P335 Spezies wurden r1t, bIL285, bIL286, bIL309, ul36, TP901-1, Tuc2009 und 4268 sequenziert (Brondsted et al., 2001; Chopin et al., 2001; Labrie und Moineau, 2002; van Sinderen et al., 1996). Bei der c2-Spezies liegt das komplette Genom der Phagen bIL67 und c2 vor (Lubbers et al., 1995; Schouler et al., 1994). Die Genome enthalten 39 bzw. 37 ORFs und zeigen auf Nukleinsäureebene 80% Identität, die vor allem durch Deletionen oder Insertionen unterbrochen wird. Das führt zum Verlust oder Erwerb der für den jeweiligen Phagen typischen ORFs.

Um einem Ausfall der Säuerungsaktivität durch Phagen vorzubeugen, wurden umfangreiche Hygiene-Konzepte erarbeitet, die unter dem Stichwort "Hazard Analysis of Critical Control Points" (HACCP) zusammengefaßt werden (Ropkins und Beck, 2000). Zu den Grundsätzen eines "Good Manufacturing Practice" (GMP) gehört die räumliche Trennung von Säurewecker- und Produktionsbereichen ebenso wie die Konstruktion der Produktionsanlage unter dem Gesichtspunkt einer vereinfachten Säuberung (Coffey et al., 2001). Die Gefahr von Phagenkontaminationen kann verringert werden, wenn alle Geräte täglich mit Phagen-inaktivierenden Chemikalien wie Chlor und Peressigsäure gereinigt werden (Lembke und Teuber, 1981) und die Anzucht von Vorkulturen bzw. die Fermentationen zur Herstellung von Starterkulturen in Phagen-inhibierenden Medien stattfindet (Sandine, 1977). Sie enthalten Phosphat und/oder Citrat, das in der Lage ist, die für die lytische Phagenentwicklung essentiellen zweiwertigen Ionen, hauptsächlich Ca^{2+}, zu binden (Potter und Nelson, 1952). Außerdem kann durch Rotation von Starterkulturen mit unterschiedlichen Phagenspektren dem vermehrten Auftreten hochinfektiöser Phagenspezies vorgebeugt werden (Durmaz und Klaenhammer, 1995; Huggins, 1984). Ein kontinuierliches Monitoring der in der Produktion auftretenden Phagen könnte aufzeigen, wann ein schneller Wechsel der bedrohten Starterkultur erforderlich wird (Hull, 1977). Da diese Maßnahmen aber kostenträchtig sind, fordert die Industrie die Neu-Etablierung von Starterkulturen mit breitem Phagenresistenzspektrum.

1.4. Ziel der Arbeit

Die in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Genomsequenzierung und der Etablierung neuer molekularbiologischer Techniken erzielten Fortschritte sollen im Rahmen dieser Arbeit für die molekulargenetische Charakterisierung instabiler Quarkfermentationen genutzt werden. Zunächst sind Veränderungen in der Zusammensetzung der Bakterienpopulation am Beispiel einer instabilen Fermentation zur Herstellung von Speisequark zu untersuchen. Dafür soll die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ganzer Zellen mit Oligonukleotidsonden, die gegen die rRNA gerichtet sind, eingesetzt werden. Da diese Methode keine Herstellung von Einzelisolaten erfordert, kann eine Populationsanalyse ohne kultivierungsbedingte Veränderung der Bakterienzusammensetzung erfolgen.

Die Identifizierung der fermentationsrelevanten Gene in der Hauptpopulation soll Aufschluß über das genetische Potential unterschiedlicher Starterkulturen geben. Für diese Analyse kommen in erster Linie die verschiedenen Phagenresistenzgene und molekulare Markergene in Betracht, die den Säuerungsverlauf und den Geschmack oder Geruch des Milchprodukts beeinflussen. Letzteres sind beispielsweise die Gene des Lactose- und Citratstoffwechsels. Da sie ebenso wie viele Phagenresistenzgene häufig Plasmid-codiert sind, ist ihr Nachweis von besonderem Interesse. Ein Vergleich des prozentualen Vorkommens dieser fermentationsrelevanten Parameter in Fermentationen mit normalem und gestörtem Säuerungsverlauf soll Aufschluß darüber geben, ob eine frühzeitige Erkennung von Fehlfermentationen mit DNA-analytischen Methoden möglich ist.

Da ein instabiler Säuerungsverlauf von Quarkfermentationen meist auf eine Phagen-bedingte Lyse der Starterkulturbakterien zurückzuführen ist, sollen Starterkultur und Fermentationsproben auf die häufig vorkommenden Phagen der Spezies 936, P335 und c2 untersucht werden. Außerdem sollen durch die Sequenzanalyse des aus instabilen Fermentationen isolierten Phagen P482 weitere Rückschlüsse auf das Zusammenspiel dieser molekulargenetischen Marker in der Bakterien- und der Phagenpopulation von instabilen Quarkfermentationen ermöglicht werden.

2. Material und Methoden

Für alle Lösungen wurde entsalztes und über eine Reinstwasseranlage (SG Reinstwasser) gereinigtes Wasser mit einem Leitwert < 0,5 mS/cm^3 verwendet. Die Chemikalien wurden soweit nicht anders beschrieben in p.A.-Qualität oder mit molekularbiologischem Reinheitsgrad von den Firmen Merck, Sigma oder Fluka bezogen. Die Agarose stammte von Eurogentec, die Taq-Polymerase von Pharmacia.

2.1. Lösungen und Puffer

Carbonat-Puffer	1 M $NaHCO_3/Na_2CO_3$, pH 9,0
Lysozymlösung	1 mg/ml Lysozym aus Hühnereiweiß, 100 000 U/mg in TE
3x PBS	390 mM NaCl, 30 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 7,4
PFA-Fixierungslösung	2 g Paraformaldehyd, 16,6 ml 3x PBS, 30 ml H_2O, pH 7,2 - 7,4
X-Phosphat-Puffer	160 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4, pH 7,4
DAPI-Lösung	1 µg/ml 4´,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid in H_2O
Hybridisierungslösung	0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,01% SDS, 0-35% Formamid
Waschpuffer 1	100 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 40 mM NaOH
Waschlösung 2	20 mM Tris, 0,01% SDS, 5 mM EDTA, Y M NaCl
5x Probenpuffer	100 mM EDTA, 20% Ficoll 400, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylenxyanol, pH 7,3
TBE-Puffer	89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0
SSC-Puffer	150 mM NaCl, 15 mM Na_3-Citrat, pH 7,0

2.2. Medien und Stammhaltung

2.2.1. Anzucht der Mikroorganismen

M17-Medium zur Anzucht von *Lactococcus* spec. (Terzaghi und Sandine, 1975)

Die Anzucht von *L. lactis* erfolgte entsprechend den Versuchsanforderungen entweder auf Agar-Platten oder in 5 ml Flüssigmedium über Nacht im Brutschrank (Heraeus) oder Schüttelinkubator (Braun Labtherm/Labshaker) bei 28-30°C und 180 rpm.

M17-Medium 0,5 g Ascorbinsäure, 5,0 g Fleischextrakt, 2,5 g Hefeextrakt, 0,25 g $MgSO_4$, 19,0 g Na-ß-Glycerophosphat, 2,5 g Pepton aus Casein, 2,5 g Pepton aus Fleisch, 5,0 g Pepton aus Soja, H_2O ad 1000 ml, pH 7,2

GM17-Medium M17-Medium mit 0,5% Lactose

LM17-Medium M17-Medium mit 0,5% Glucose

MRS-Medium für die Anzucht von *Leuconostoc* spec. (de Man et al., 1960)

Für die Kultivierung der *Leuconostoc*-Stämme wurde je nach Verwendungszweck MRS-Medium entweder als Flüssigmedium oder als Platten eingesetzt. Die Anzucht erfolgte über Nacht im Brutschrank oder im Schüttelinkubator bei 25°C und 180 rpm.

MRS-Medium 2,5 g Fleischextrakt, 5,0 g Hefeextrakt, 10,0 g Pepton aus Casein, 20,0 g Glucose, 2,0 g K_2HPO_4, 5,0 g Natriumacetat, 2,0 g Diammonium-hydrogencitrat, 0,2 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, 0,05 g $MnSO_4$ x 4 H_2O, 1 ml Tween 80, H_2O ad 1000 ml, pH 6,5

2.2.2. Stammhaltung und Lagerung

Für die Herstellung von Dauerkulturen wurden frische ÜN-Kulturen nach Zugabe von sterilem Glycerin im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 bei -80°C gelagert. Im Langzeittest erwies sich jedoch die Lagerung der Stämme in sauergefallener, tyndalisierter Milch als stabiler. Dafür wurden die Kulturen in 1,5 ml sterile 10%ige (w/v) Lackmusmilch bzw. Skim-Milch (Oxoid) überimpft und bei 30°C inkubiert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Kulturen nach 2 h Inkubation bei -80°C eingefroren.

2.3. Molekularbiologische Software

NCBI National Center for Biotechnology Information, USA

EBI European Bioinformatics Institute, Hinxton, UK

INRA Institute National de la Recherche Agronomique, France

Sequenzrecherche:

Entrez am NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/

SRS 6.0.7.2 am EBI http://srs.ebi.ac.uk/

Sonden- und Primerdesign:

ARB Strunk et al., 1993, München

DNA-Star LaserGene Inc. Madison, Wisconsin, USA

Primer Calculator http://www.williamstone.com/primers/calculator/calculator.cgi
Williamstone Enterprises, MA, USA

Alignment-Tools:

ClustalW am EBI	http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/
MultAlin am INRA	http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html
	(Corpet, 1988)

Sequenz- und Sondenvergleich:

Blast am NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ oder
Blast am EBI	http://www.ebi.ac.uk/blast2/
FastA am NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/FASTA/ oder
FastA am EBI	http://www.ebi.ac.uk/fasta3/
Genedoc 2.5.	http://www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml
	(Nicholas und Nicholas, 1997)

Sequenzanalyse:

Promotorprediction	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
	BDGP Berkeley Drosophila Genome Project, USA
ORF Finder am NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
DNA sequence translation	
und Codon Usage	http://alces.med.umn.edu/webtrans.html
	Virtual Genome Center, USA
Protein Machine	http://www2.ebi.ac.uk/translate/
Codon Usage Database	http://www.kazusa.or.jp/codon/
	Kazusa DNA Research Institute, Japan
Omiga 2.0	Oxford Molecular, USA
MW und pI	http://www.expasy.ch/tools/pi_tools.html
SIM - Alignment Tool	
for protein sequences	http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html
BLOCKS	http://www.blocks.fhcrc.org/
InterPro Sequence Analysis	http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html
PFAM	http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/
PROSITE Pattern Search	http://www.expasy.ch/tools/scnpsit1.html
REPuter	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/reputer/doc/doc.html
Husar	Heidelberg UNIX Sequence Analysis Resources, GENIUSnet,
	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

2.4. Oligonukleotide

2.4.1. Sonden für die Detektion von Bakterien mittels FISH

Für die FISH wurden die Sequenzen der in Tab. 4 dargestellten Sonden aus der Literatur entnommen. Um deren Spezifität zu gewährleisten, wurden sie unter den in den jeweiligen Quellen angegebenen Bedingungen eingesetzt. Zur Kontrolle der eigenen Versuchsbedingungen erfolgten Testhybridisierungen mit nahe verwandten Referenzorganismen, die sehr ähnliche Zielsequenzen aufwiesen. Als Zielmolekül für die Sonden EUB338, LGCa354, LGCc354, LLL68, LLC68 und NON338 dient die 16S rRNA, die Sonde LLA271 erkennt eine Targetsequenz auf der 23S rRNA.
Die Sequenz der Sonden LGCa354 und LGCc354 unterscheidet sich nur in 2 Basen. Beide sind spezifisch für die Gruppe der Gram-positiven Mikroorganismen mit niedrigem G+C-Gehalt. LGCa354 erkennt eine Untergruppe der Low G+C Gram-positiven der auch die Spezies *Leuconostoc* angehört, LGCc354 ist 100% revers komplementär zu einer Untergruppe der *Lactococcus* angehört (Meier et al., 1997).

Sonde	***Zielorganismus***	***Sequenz (5'-3')***	***% Form-amid***	***Literatur***
EUB338	alle Eubakterien	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-35	(Stahl et al., 1988)
LGCa354	Low G+C Gram-positive Variation A	TGGAAGATTCCCTACTGC	20 und 35%	(Meier et al., 1997)
LGCc354	Low G+C Gram-positive Variation C	CCGAAGATTCCCTACTGC	20 und 35%	(Meier et al., 1997)
LLA271	*L. lactis*	CTATAATGCTTAAGTCCACG	20	(Beimfohr et al., 1993)
LLC68	*L. lactis* ssp. *cremoris*	TGCAAGCACCAATCTTCATC	10	(Beimfohr et al., 1993)
LLL68	*L. lactis* ssp. *lactis*	TACAAGTACCAACCTTCAGC	10	(Beimfohr et al., 1993)
NON338	Negativkontrolle	ACTCCTACGGGAGGCAGC	0-35	(Wallner et al., 1993)

Tab. 4. Bezeichnung, Spezifität, Sequenz und Formamidgehalt der bei der FISH verwendeten Sonden.

Die Sonden wurden bei der Firma Interactiva (Ulm; jetzt Thermo Hybaid) jeweils am 5'-Ende mit Carboxytetramethyl-Rhodamin (TAMRA) bzw. Fluoreszein (FLUOS) markiert bestellt. Zur Überprüfung der Markierungsrate wurden die TAMRA-markierten Oligonukleotide 1:100 in H_2O, die FLUOS-markierten Oligonukleotide in Carbonat-Puffer pH 9,0 verdünnt und im

Photometer (Hitachi U-3000) vermessen. Der Quotient aus Nukleotidabsorption (OD_{260}) und Farbstoffabsorption (FLUOS OD_{490}, TAMRA OD_{550}) ermöglicht eine Abschätzung der Markierungsrate. Bei vollständiger Markierung ist der gemessene Wert gleich dem Quotienten der beiden Extinktionskoeffizienten, was bei den verwendeten Farbstoffen und einer durchschnittlichen Länge der eingesetzten Oligonukleotide von 18 Basen bei FLUOS einen Wert von 2,5 bis 3 und bei TAMRA einem Wert von ca. 1 entspricht.
Die Konzentration des Oligonukleotids wurde durch Bestimmung der Absorption bei OD_{260} nach folgender Gleichung bestimmt:

$$1\ OD_{260} = 20\ \mu g/ml\ ss\ DNA_{\ Oligonukleotid}$$

Für die Arbeitslösungen wurde die Stammlösung auf 50 ng/µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.4.2. Oligonukleotide für Phagenresistenzgene

Die in Tab. 5 bis Tab. 9 aufgeführten Oligonukleotide wurden mit dem Programm PrimerSelect (DNA-Star, Wisconsin) unter Vermeidung von Sekundärstrukturen und Primer-Dimeren generiert. Ihre Schmelztemperatur und Spezifität wurde mit den im Internet frei zugänglichen Programmen PrimerCalculator und FastA überprüft. Um eine spätere Verwendung als Sonden für die Chip-Hybridisierung zu ermöglichen, wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur aller generierter Oligonukleotide um nicht mehr als 4°C (48-52°C) variiert. Aus den Tabellen geht das von den Oligonukleotiden erkannte Gen, dessen Sequenz und Länge, aber auch die Bindungsposition im Gen bzw. die Länge des zum Nachweis des Gens dienenden PCR-Produkts hervor.
Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Planegg-Martinsried) und Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe) bezogen. Die Lagerung der in H_2O gelösten PCR-Primer-Stammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/µl erfolgt bei -20°C. Für die Nomenklatur der Primer wurden die ersten Buchstaben des zu amplifizierenden Gens verwendet. Der Zusatz F steht für Vorwärts-Primer, R für Rückwärts-Primer. Bei der Bezeichnung des Primerpaars werden diese Kürzel durch ein X ersetzt.

Primer-bezeichnung	***Zielgen/ Acc. nr.***	***Sequenz (5'-3')***	***bp***	***T_m***	***Pos.***	***Prod. länge***
Ads_Eps_F1	*eps*	CTTCAAGTGTCACTGGTCATT	21	50,5	1000-1020	790
Ads_Eps_R1	AF03648 AF100297 AF100298	TTCCCATATTCTTTCGCTTCAA	22	49,3	1768-1789	
Inj_Pip_F1	*pip*	TCGCCCGACAAAGAGAAG	18	50,3	1213-1230	907
Inj_Pip_R1	L14679	AGCGCTGTGTAGAAAGGTGT	20	51,8	2100-2119	

Tab. 5. Primer zur Detektion der Gene für die Inhibition der Phagenadsorption und der Injektion der Phagen-DNA

Primer-bezeichnung	***Zielgen/ Acc. nr.***	***Sequenz (5'-3')***	***bp***	***T_m***	***Pos.***	***Prod. länge***
RM1_Lld1_F1	RM Typ I *hsdR*	GGGCCACTCCTTCACTCC	18	51,4	1405-1422	937
RM1_Lld1_R1	AF034786 U90222	GGTCGGCTTCGCTTTGTTTAT	21	51,4	2321-2341	
RM1_Lla1403_F2	RM Typ I *hsdR*	AGCGGCTGCCCCTAAAGT	18	52,6	924-941	679
RM1_Lla1403_R2	AF013165	AGCTAACATCGCCTGAAAAAC	21	50,5	1582-1602	

Tab. 6. Primer für die Amplifikation der Restriktions & Modifikationssystem I-Gene.

Primer-bezeichnung	*Zielgen/ Acc. nr.*	*Sequenz (5‘-3‘)*	*bp*	T_m	*Pos.*	*Prod. länge*
RM2_ScrFM1_F1	RM Typ II *hsdM*	AAGCGAATTTTGGAGACGAAC	21	50,5	353-372	
RM2_ScrFM1_R1	U89998 M87289	CATGAATGGTGGGAACTGC	19	51,1	1105-1123	771
RM2_ScrFR_ F1	RM Typ II *hsdR*	GGGCACTGGTTAGAAGAAC	19	51,0	103-121	
RM2_ScrFR_ R1	U 89998	CGCCTATTGAATCGGTTGTA	20	49,7	621-640	538
RM2_Lla1R1_ F2	RM Typ II *hsdR*	GGGTTTATTGGAGGGACTTATT	22	51,1	187-208	
RM2_Lla1R1_R2	U17233	TCGTGCGTTCAACTTTTCTAC	21	50,5	752-772	586
RM2_Lla1R2_ F3	RM Typ II *hsdR*	GTTTCATAGAGGCCCGTTTAC	21	52,4	186-206	
RM2_Lla1R2_R3	U17233	TGACCCAACTGCTTATCTTCC	21	52,4	681-701	516
RM2_Lla1R3_ F4	RM Typ II *hsdR*	CACTTTCGGTGATTTAGATGTG	22	51,1	66-87	
RM2_Lla1R3_R4	U17233	ATCATCGCCTCCGTCAAGA	19	51,1	533-551	486
RM2_Lla2R_ F5	RM Typ II *hsdR*	TATGGCAACACTTTCCGTAAC	21	50,5	54-74	
RM2_Lla2R_ R5	U16027	CTCCACCGCCGTAGTAAT	18	50,3	697-680	644
RM2_LlaB1R_F6	RM Typ II *hsdR*	TAATTGGATGGGGACCTATGAT	22	51,1	329-350	
RM2_LlaB1R_R6	X97263	ACTTTGGCTTGATCTCCTCTAA	23	51,1	710-731	403
RM2_LlaB2R_F7	RM Typ II *hsdR*	ATTCAAACAGCCGATAACACC	21	50,5	469-489	
RM2_LlaB2R_R7	Y12736	TCGGAGCTTTTGAATAGACACA	22	51,1	1176-1197	729
RM2_LlaC1R_F8	RM Typ II *hsdR*	AGGTCGTAGATTCTTTATTGTTTGT	25	51,1	39-63	
RM2_LlaC1R_R8	AJ002064	GAAGCACTTGAGGTAGATTGG	21	52,4	760-780	742
RM2_LlaD2R_F9	RM Typ II *hsdR*	GGCTATATTGAAATTGATGATGC	23	50,0	19-41	
RM2_LlaD2R_R9	Y12707	GGACGCCTTCCAACAGC	17	51,9	424-440	422
RM2_LlaKR2_F10	RM Typ II *hsdR*	CATCATTAGTCGCCAGTTCTTTA	23	51,7	425-447	
RM2_LlaKR2_R10	AF051563	TGATTACGATGATAGCGATTTACA	24	50,6	1450-1473	1049

Tab. 7. Primer für Restriktions & Modifikationssystem II-Gene.

Primer-bezeichnung	*Zielgen/ Acc. nr.*	*Sequenz (5‘-3‘)*	*bp*	T_m	*Pos.*	*Prod. länge*
RM3_LlaF1R_F1	RM Typ III *hsdR*	TGCGGTCGCTAAACTCAAC	19	51,1	1239-1257	987
RM3_LlaF1R_R1	AF054600	ACCAAGCCCAACTCTAAACC	20	51,8	2206-2225	

Tab. 8. Primer zur Detektion des Restriktions & Modifikationssystem III-Gens.

Primer-bezeichnung	*Zielgen*	*Sequenz (5‘-3‘)*	*bp*	T_m	*Pos.*	*Prod. länge*
AbiA_F	*abiA*	GATCCGAAAAGTGCATTAGTCT	22	51,1	526-547	1150
AbiA_R	(U17233/ M63080)	ACCCATCTATTAACTTTCCTTCTG	24	52,3	1652-1675	
AbiB_F	*abiB*	GATAACATGCCAATTCCAACTG	22	51,1	85-106	506
AbiB_R	(M77708/ I42567)	ATCGGTATTACTTTTATTTCGTCT	24	48,9	567-590	
AbiC_F	*abiC*	CCTAGTTTTGGATTATGGTATGG	23	49,5	115-137	555
AbiC_R	(M95956)	AAATCTTTTGTTTAGGCTCTTCA	23	49,3	669-647	
AbiD_F	*abiD*	GGAGAGCTACAAGTCGGTGAGT	22	51,8	385-406	424
AbiD_R	(U10992)	TAGGGGCATAAAAAGTTGGTG	21	51,3	808-788	
AbiD1_F	*abiD1*	ATAGTCCAGCATTTAAGCATCATA	24	49,9	545-568	487
AbiD1_R	(L35176)	ACCCAATCCTCAGAAAAACC	20	49,7	1031-1012	
AbiE1_F	*abiE1*	TTAAAAGTGTTTATCCCTTTCCTCA	25	48,3	324-348	486
AbiE1_R	(U36837)	AAAGCTTTAGTGTTTCAGCCATACG	25	49,5	809-785	
AbiE2_F	*abiE2*	AGAAGGATTTCGTCAAGTCATTATA	25	49,0	95-119	734
AbiE2_R	(U36837)	TCTTTGATACCATCCACGTTTAGAT	25	49,7	828-804	
AbiF_F	*abiF*	TTTATGTGCAGAATACCAAGAGTC	24	50,0	384-407	464
AbiF_R	(U36837)	AATAGGATTTTCGCAAGTTAGC	22	49,6	847-826	
AbiG1_F	*abiG1*	GCAGAGGGAAAAGCACAAA	19	50,3	136-154	455
AbiG1_R	(U60336)	ACACTAAAATTCAAAAGACCATTCT	25	49,8	590-566	
AbiG2_F	*abiG2*	GTTTGGAGGTGCTTTGGAGA	20	51,7	405-424	623
AbiG2_R	(U60336)	CCGCTGTTTTAACCGTAGTATC	22	50,5	1027-10006	
AbiH_F	*abiH*	GGAGCGATTTTGAAGAACAGAC	22	52,3	182-203	455
AbiH_R	(X97651)	TGGCGAATGAAATCCTAATACTAC	24	51,6	636-613	
AbiI_F	*abiI*	TCGTAACAAATATAGGATGAATGG	24	50,6	180-203	803
AbiI_R	(U38973)	TTTATCGTGTGGTATCTCATTTTA	24	48,9	960-983	
AbiK_F	*abiK*	TTTGCAGATTATTTAAGGAGTCAT	24	49,3	178-201	460
AbiK_R	(U35629)	TGCCATGTGTTTCGTCGTAT	20	51,2	637-618	

AbiL1_F	*abiL1*	CAAACGCTTCTGGTAAATCAA	21	50,0	158-178	504
AbiL1_R	(U94520)	CTTCATCACCTGGTCCTAACAC	22	50,3	661-640	
AbiL2_F	*abiL2*	AAGGAGGGTATTCAATCACAGTT	23	50,5	424-446	418
AbiL2_R	(U94520)	CAAGACATTCATTATTCGTTTCAA	24	50,9	841-818	
AbiN_F	*abiN* (Y11901/	TTTAATAAGGAGTTACAGATTGATG	25	49,5	61-85	466
AbiN_R	A59848/ I82512)	CTCCTAGTTTGTTATTTACACTTTC	25	51,1	502-526	
AbiP_F	*abiP*	ATTGGAGCTGGATTAGGTGTCT	22	51,3	88-109	625
AbiP_R	(U90222/ I42574)	CTAATTTTTGCATATCGGTTTTC	23	50,0	712-690	
AbiQ_F	*abiQ*	CCAGCACTTATGTAGGGGTTGT	22	52,5	125-146	342
AbiQ_R	AF001314	CTTTTTCATGAGCAGCTTTTCTAT	24	51,3	466-443	
AbiM_F1_ges	*abiM*	GATGGCAGAAATGTTGAGC	19	49,0	34-52	774
AbiM_R1_ges	U41294	CATTTTTATCCCACCTATTGTC	22	49,3	786-807	
AbiM_F2_ges	*abiM*	TCAATGCTAAACCGAAATACACA	23	49,9	364-386	704
AbiM_R2_ges	U41294	ATTATAGACCCTAAACACTGAATC	24	50,6	1062-1049	

Tab. 9. Primer für den PCR-Nachweis der "Abortive Infection of Phages"-Gene.

2.4.3. Oligonukleotide für Gene des Citrat- und des Lactosestoffwechsels

Die in Tab. 10 und Tab. 11 aufgeführten Oligonukleotide wurden mit den in 2.4.2 beschriebenen Programmen unter Berücksichtigung der gleichen Parameter designt. Bei ihrer Auswahl wurde auch hier bereits auf eine spätere Eignung für die Hybridisierung auf dem DNA-Mikroarray geachtet.

Primer-bezeichnung	***Zielgen/ Acc. nr.***	***Sequenz (5'-3')***	***bp***	***T_m***	***Pos.***	***Prod länge***
CitPermAllFLit	Citrat-Permease	GGAGTTGGTGCTGGTATTGTG	21	52,0	795-814	595
CitPermAllF	L29572/U28212	TTTCAACAAAGACGCTGCCAA	21	55,8	370-390	1020
CitPermAllR	M58694/S77101	CAACCGGATACAATCCAAACAAC	23	54,9	1367-1389	
CitPermLeuF	Citrat-Permease	ATTAATTGTGACTGGAGAACGGTCT	25	54,3	19-43	167
CitPermLeuR	L29572/U28212	TTTGCGTTGGATAAAATCCAGC	22	55,8	164-185	
CitPermLacF	Citrat-Permease	CTGGAGAACGGTCTCCAATCT	21	52,3	33-53	167
CitPermLacR	M58694/S77101	TAGTTTGTGTTGAATAAAATTCCAT	25	49,2	175-199	
AL-SynthAllF	α-Acetolactat-Synthase	CCTGTCGTTGAAACATTCCAAGGT	24	55,7	1925-1948	681
AL-SynthAllR	A23961/I12060/ L16975/X93091/ AF035772	CAAACGTACAGCTGTTTCCAATTC	24	54,0	2582-2605	

AL-DecarbAllF	α-Acetolactat-Decarboxylase	GGGACAATTGTTGGTATTTGGAC	23	53,5	528-550	154
AL-DecarbAllR	A37903/S82499/ U92974/X82620	GGTCAATTGCGCCAATTTCAACA	23	53,5	659-681	
PflAllF	Pyruvat-Formiat-Lyase	TGCAGAACGTGACCTTGCTCG	21	56,3	2298-2318	1097
PflAllR	AJ000325/ AJ000326	GGGTTAGCACCTGGTGAGAAGAA	23	57,0	3373-3395	

Tab. 10. Primer zur Detektion der Gene des Citratabbaus.

Primer-bezeichnung	***Zielgen***	***Sequenz (5'-3')***	***bp***	***T_m***	***Pos.***	***Prod. länge***
L-LDHF	Lactat-Dehy-drogenase	GGAGATGCAGAAGACCTTTCTC	22	54,8	474-495	488
L-LDHR	L07920/ U02385/ M88490/ M95919/ U04315 u.a.	GGTAGTCATTTTCTTGGAACCATT	24	52,3	934-961	
D-LDHF	Lactat-Dehy-drogenase	TTGGACTATACACGTGAAACATTGA	25	52,8	613-639	492
D-LDHR	L29327	ATTAGATGATGGTTTTCAGGTACAC	25	52,8	1079-1104	
LacPermLacF	Lactose-Permease	TGGGGAACTAAAGAACAAAAATCA	24	50,6	643-666	489
LacPermLacR	U60828/ AJ011653	AAGCGTTACGGCTTCATTAC	20	49,8	1112-1131	
LacPermLeuF	Lactose-Permease	CCGGTCACCACATACTTCACT	21	51,3	559-579	1007
LacPermLeuR	U47655	TCCGGATCAATAGCAAAACC	20	51,7	1546-1565	

Tab. 11. Primer für den Lactose-Import und die Lactat-Synthese.

2.4.4. Oligonukleotide für den Nachweis von Lactococcus-Phagen

In Tab. 12 sind Primerpaare zum Nachweis der drei bei *Lactococcus* vorkommenden Phagenspezies 936, P335 und c2 aufgeführt. Basierend auf Alignments, die die in Tab. 3 aufgeführten Sequenzeinträge der Vertreter der einzelnen Phagenspezies aus den Datenbanken umfassten, wurden die Primer in konservierte Bereiche gelegt. Um die Sensitivität der PCR zu steigern, wurde für die Spezies 936 auch eine "Nested PCR" etabliert. Die Primerpaare M936_X1, P335_X und C2_X wurden aus der Literatur (Labrie und

Moineau, 2000) entnommen. Basierend auf den derzeit zugänglichen Sequenzinformationen wurden Primer generiert, die eine Identifizierung des für die Produktionsstätte typischen Phagen P482 erlauben. Die Auswahl der Primer und deren Lagerung erfolgte wie in 2.4.2 beschrieben.

Primer-bezeichnung	*Ziel*	*Sequenz (5´-3´)*	*bp*	*Tm*	*Prod. länge*
P936all_F2out	P936	CGCGTGCTTAACTGGATG	18	49,9	521
P936all_R2out	P936	CCAATAAGAGGTAAAGCCATAGTC	24	50,6	
P936all_F2nest	P936	GAAGCAAGCGATACATTAAGAGTGT	25	53,2	348
P936all_R2nest	P936	CATGTAAAGTAAACCGAACGACCTA	25	53,7	
M936_F1	P936	TCAATGGAAGACCAAGCGGA	20	51,8	179
M936_R1	P936	GTAGGAGACCAACCCAAGCC	20	54,8	
P482c18_Fout	P482	TAGAGGCTTGGGATAACATAA	21	46,4	491
P482c18_Rout	P482	CTGCGATAAGAAGTCTACAAAAC	23	47,8	
P482c9_Fout	P482	CGTCAGCGCGTCATACAA	18	51,2	736
P482c9_Rout	P482	AGCTAGAACGGAAGTCAGAGAAGT	24	51,9	
P335_F	P335	GAAGCTAGGCGAATCAGTAA	20	49,8	682
P335_R	P335	GATTGCCATTTGCGCTCTGA	20	51,8	
C2_F	C2	CAGGTGTAAAAGTTCGAGAACT	22	51,1	474
C2_R	C2	CAGATAATGCACCTGAATCA	20	49,7	

Tab. 12. Primerpaare zum Nachweis der verschiedenen Phagenspezies bzw. des "Hausphagen" der untersuchten Produktionsstätte P482.

Für den eindeutigen Nachweis der langen Insert-haltigen Variante des Phagen P482 wurden die beiden im Insert liegenden Primer P482_Ins1 und P482_Ins2 entwickelt, die zusammen mit dem hinter dem Insert liegenden Primer P482_R ein 1400 bp bzw. ein 2174 bp langes Produkt ergeben (Tab. 13). Die Insert-freie Variante kann durch ein 982 bp langes Produkt mit den Primern P482_V und P482_R detektiert werden.

Primer-bezeichnung	*Sequenz (5'-3')*	*bp*	*T_m*	*Position*	*Prod. länge*
P482_Ins1	GCAATGGCAAAGCTACC	18	59,0	7822-7839	1400
P482_Ins2	CTGGTTTTGTTATGATCCCTCCTA	24	60,0	7058-7081	2174
P482_V	AGCTTTGTCATGGGTTACTATTA	23	54,6	6258-6280	982
P482_R	TTGGATAAACGACTACACG	19	51,5	9252-9270	

Tab. 13. Oligonukleotide für den Nachweis der insert-haltigen bzw. der insert-freien Variante des Phagen P482.

2.4.5. Sonden für die DNA-Chip-Hybridisierung

Die in Tab. 14 dargestellten Sonden und PCR-Primer, die in den vorangegangenen Untersuchungen der Bakterienspezies, der Phagenspezies, der Phagenresistenzgene und der Stoffwechseleigenschaften zum Einsatz kamen, waren bereits unter den für eine gemeinsame Hybridisierung auf der Chipoberfläche wichtigen Gesichtspunkten ausgewählt worden.

Im Probenmaterial zu identifizierende molekulare Marker	***verwendete Sonden***
Bakterienspezies	EUB338, LGCc354_+1, LLA271, LLC68_+3, LLL68
Phagenspezies	P335_F_+1, P335_R, P936all_F1_nest, P936all_R1_nest
Phagenresistenzgene	Ads_R, AbiB_F, AbiB_R, AbiN_F, RM1_hsdR_F1, RM1_hsdR_R1, RM1_hsdR_F2, RM1_hsdR_R2, RM2_Lla2R_R5, RM2_LlaB1R_F6, RM2_LlaB1R_R6, RM2_LlaB2R_F7, RM2_LlaD2R_F9
Stoffwechseleigenschaften	LacPermLac_F, AL-DecarbAll_R, PflAll_R, L-LDH_F, L-LDH_R

Tab. 14. Sonden für die DNA-Chip-Hybridisierung.

Lediglich die Sequenz der Sonden LGCc354, LLC68 und P335_F mußte um einige Basenpaare verlängert werden, damit alle Sonden den folgenden Kriterien entsprachen:
(1) die Schmelztemperatur beträgt 50 ± 2°C,
(2) keine Sekundärstrukturen mit einem ΔG-Wert kleiner -3,5
(3) eindeutige Diskriminierbarkeit von den nächst ähnlichen Sequenzen durch mindestens 2 mittelständige Mismatches.

Sonden-bezeichnung	***Sequenz (5'-3')***	***bp***	***Position***	***T_m***
LGCc354_+1	GCCGAAGATTCCCTACTGC	19	354-372	51,3
LLC68_+3	CGACTATAATGCTTAAGTCCACG	23	68-87	50,7
P335_F_+1	GAAGCTAGGCGAATCAGTAAA	21		48,7

Tab. 15. Optimierung der Sondensequenz für den Einsatz in der DNA-Chip-Hybridisierung.

2.5. Probenmaterial

2.5.1. Starterkulturen und Einzelstämme des Kulturenherstellers

Als Ausgangsmaterial für die Analyse der Phagenresistenzgene und der Gene für den Lactose- und Citrat-Metabolismus wurden vom Kulturenhersteller Wisby (heute Danisco, Niebüll) bzw. aus verschiedenen Produktionsstandorten der Nordmilch e.G. Starterkulturen bezogen. Die Kulturen waren original verpackt und wurden unter der Sterilwerkbank geöffnet und für die einzelnen Untersuchungen aliquotiert. Folgende Starterkulturen standen zur Verfügung:

Probat 8/0 `97	Lotnr. L63417121K
Probat 8/0 `99	Lotnr. L92350022K
Probat 8/20	Lotnr. 92634262
Probat 8/21	Lotnr. 92634262
Probat M4 Citrat+	Lotnr. L93117432K
Probat M7 Citrat+	Lotnr. L93713732K
Probat 505	Lotnr. L94029932K
G3-Mix 6	Lotnr. L93918232K

Laut Herstellerangaben setzt sich die Starterkultur Probat 8/0 wie folgt zusammen: 80-98% *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* und ssp. *cremoris*, 1-10% *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, 1-15% *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*.

Zur Isolierung von Einzelstämmen aus der Starterkultur Probat 8/0 Lotnr. L63417121K wurden verschiedene Verdünnungsstufen wie unter 2.2.1 beschrieben auf M17-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 28°C kultiviert. Nach dem Abimpfen von Reinkulturen wurden diese einerseits zur weiteren Untersuchung in 5 ml M17-Flüssigmedium kultiviert und andererseits für die Stammhaltung wie unter 2.2.2 in 1 ml 10% Skim-Milch bebrütet und bei -80°C gelagert. 31 dieser Starterkulturisolate wurden hinsichtlich ihrer Phagenresistenzgene und ihres Citrat- und Lactose-Stoffwechsels charakterisiert.

Für die Charakterisierung des Phagenresistenzgenspektrums wurden vom Kulturenhersteller Wisby die Einzelisolate W1, W2 und W3 zur Verfügung gestellt, die wie oben beschrieben behandelt wurden.

2.5.2. Fermentationsproben der Starterkultur Probat 8/0 mit normaler und gestörter Säuerung

Für die molekulare Charakterisierung von Fermentationen zur Herstellung von Speisequark aus der Starterkultur Probat 8/0 wurde eine Fermentation mit gestörter Säuerung (Fermentation B) mit einer normal säuernden Fermentation (Fermentation C) verglichen. Bei beiden Säuerungen wurde fortlaufend der pH-Wert bestimmt und Aliquots zur wie unter 2.5.1 beschriebenen Einzelisolat-Herstellung abgenommen.

Fermentation	*Datum der Probennahme*	*Fermentations-dauer*	*pH-Wert*	*Anzahl der untersuchten Isolate*
B V	01.10.97	6	5,8	44
B IX	01.10.97	10,5	4,7	46
C SWA	20.01.98	0	6,6	18
C SWE	20.01.98	10,5	4,5	23
C II	20.01.98	2	6,35	17
C V	20.01.98	5	5,8	30
C VI	20.01.98	6,5	5,5	26
C IX	20.01.98	10,5	4,7	47
D SW	24.01.00	10,5	4,5	keine Einzelisolate
E SW	25.01.00	10,5	4,4	"

Tab. 16. Probennahmezeitpunkte und pH-Wert von Fermentationen der Starterkultur Probat 8/0 und Anzahl der jeweils untersuchten Isolate.

Zur Untersuchung des Phagenbefalls wurden von der Nordmilch e.G. zwei weitere Fermentationsproben zur Verfügung gestellt, die jeweils am Ende einer Säurewecker-Fermentation gezogen worden waren (Fermentation D und E). Diese Proben wurden lediglich für die Charakterisierung der darin befindlichen Phagen-Spezies herangezogen. Einzelisolate wurden nicht hergestellt.

2.5.3. Quarkproben anderer Hersteller

Zum Vergleich der im Speisequark anderer Hersteller nachweisbaren Phagenresistenzgene und Stoffwechseleigenschaften wurden 4 im Handel erhältliche Quarkproben, die aus Fermentationen mit unbekannten Starterkulturen stammen, in die Untersuchungen mit einbezogen.

	Genußtauglichkeits-kennzeichen		***Genußtauglichkeits-kennzeichen***
Q1	D-NI 010 EWG	Q3	D-NI 039 EWG
Q2	D-NW 206 EWG	Q4	D-NI 033 EWG

Tab. 17. Genußtauglichkeitskennzeichen der getesteten, im Handel erhältlichen Speisequark-Proben.

2.5.4. Referenzstämme der BAfM und der DSMZ

Für die Etablierung der FISH und als Kontrollen für die PCR wurden folgende Stämme von der Bundesanstalt für Milchforschung (BAfM, Kiel) oder der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen:

phagensensitive Stämme der BAfM:	BBA 12/16/18/21/23/24/26/36/48/52	
phagenresistente Stämme der BAfM:	BBA 3/25/30	
Lactococcus lactis ssp. *lactis*	DSM 4642	
Lactococcus lactis ssp. *lactis* biovar. *diacetyl.*	BU 2	(6 Plasmide)
Lactococcus lactis ssp. *lactis* biovar. *diacetyl.*	BU 2-6	(1 Citrat-Plasmid)
Lactococcus lactis ssp. *lactis* biovar. *diacetyl.*	BU 2-60	(plasmidfrei)
Lactococcus lactis ssp. *cremoris*	MG 1363	
Lactococcus lactis ssp. *cremoris*	DSM 20069	
Leuconostoc mesenteroides	DSM 20346	

2.5.5. Bakteriophagen

Der Phage P482 wurde wiederholt von Herrn Dr. Neve (BAfM) aus den Fermentern einer Großmolkerei isoliert und elektronenmikroskopisch untersucht. Da es sich bei diesem Isolat um den "Hausphagen" der Produktionsstätte und damit um den vermeintlichen Hauptverursacher der Fermentationsstörungen handeln dürfte, wurde dieser Phage einer kompletten Sequenzanalyse unterzogen.

2.6. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung von Gram-positiven Bakterien

2.6.1. Fixierung von Zellen aus Quarkproben

Zur Abtrennung der Zellen vom Protein- und Lipidanteil der Quarkproben wurden 30 ml Fermentationskultur in ein 50 ml Greiner-Röhrchen abgefüllt und in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf Typ 5403) 5 min bei 5.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml Waschpuffer 1 (100 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 40 mM NaOH) resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Biozym) überführt und nochmals bei 8.000 x g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet wiederum in 1 ml Waschpuffer 1 resuspendiert und bei 8.000 x g 2 min abzentrifugiert.

Ethanol-Fixierung

Zur Ethanol-Fixierung wurde das Zellpellet in 250 µl 1xPBS (130 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 7,4) aufgenommen, auf dem Vortex (ReaxTop, Heidolph) resuspendiert und mit 250 µl kaltem unvergällten 96% EtOH fixiert. Die Zellen können mehrere Monate bei -20°C gelagert werden.

Paraformaldehyd-Fixierung (PFA-Fixierung)

Die abzentrifugierten Zellen wurden in 200 µl 1xPBS aufgenommen und sehr gut resuspendiert. Nach Zugabe von 600 µl eisgekühlter PFA-Fixierungslösung (2 g Paraformaldehyd, 16,6 ml 3x PBS, 30 ml H_2O, pH 7,2 - 7,4) wurden sie für 3 bis 16 h bei 4°C inkubiert. Die fixierten Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen mit 1 ml 1xPBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 250 µl 1xPBS aufgenommen, resuspendiert und mit 250 µl kaltem unvergällten 96% EtOH versetzt.

2.6.2. Enzymatischer Aufschluß bei Gram-positiven Bakterien

Die Suspension mit den fixierten Zellen wurde auf die 6 Felder des OT aufgetropft und bei 46°C im Wärmeschrank (Heraeus) getrocknet. Durch Tauchen der OT in eine aufsteigenden EtOH-Reihe (50, 80, 96% EtOH; jeweils 3 min), wurden die Zellen auf dem OT dehydratisiert und nachfixiert. Nach kurzem Trocknen wurden auf jedes OT-Feld 20 µl Lysozymlösung (1 mg/ml Lysozym aus Hühnereiweiß, 100.000 U/mg in TE; Sigma) aufpipettiert. Anschließend wurde der OT 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Enzymbehandlung wurde er mit H_2O gespült, nochmals der EtOH-Behandlung unterzogen und getrocknet.

2.6.3. Einzelzellhybridisierung

Pro OT-Feld wurden 9 µl Hybridisierungslösung (0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,01% SDS, X% Formamid) und 1 µl markierte Sonde (Konzentration 50 ng/µl) aufpipettiert und 1,5 h bei 46°C in einer isotonisch äquilibrierten feuchten Kammer, die aus einem 50 ml Greiner-Röhrchen mit einem mit Hybridisierungslösung befeuchteten Zellstoffstück bestand, hybridisiert. Um ein stringentes Binden der Sonde zu gewährleisten, wurde die Formamidkonzentration in der Hybridisierungslösung gemäß den in Tab. 4 aufgeführten Literaturangaben für jede Sonde variiert und die Spezifität durch eigene Experimente mit Referenzstämmen überprüft. Nach der Hybridisierung wurde die Sonde durch Spülen mit 2 ml Waschlösung 2 (20 mM Tris, 0,01% SDS, 5 mM EDTA, X M NaCl) entfernt und der OT 20 min bei 48°C in 50 ml vorgewärmter Waschlösung 2 inkubiert. Dabei wurde die benötigte Stringenz durch Variation der NaCl-Konzentration nach folgender Formel eingestellt.

$$0{,}5\ (\%\ F_{H.}) = -16{,}6 \log [M\ Na^+]$$

dabei ist $F_{H.}$ die Formamidkonzentration in der Hybridisierungslösung

$[M\ Na^+]$ die molare NaCl-Konzentration

Bei NaCl-Konzentrationen kleiner als 0,3 M wurden 5mM EDTA zum Waschpuffer zugegeben, da sonst bereits Spuren zweiwertiger Kationen die Stringenz des Waschpuffers durch starke Hybridstabilisierung beeinflussen können. Zum Schluß wurden die OT mit H_2O gespült und getrocknet.

Simultane Doppelhybridisierung mit unterschiedlich markierten Sonden

Um die Möglichkeiten der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung auszunutzen, wurden während einer Hybridisierung je 1 µl von zwei mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markierten Sonden unterschiedlicher Spezifität eingesetzt, z.B. die FLUOS-markierte EUB338-Sonde mit der TAMRA-markierten *Lactococcus*-Sonde LLA271.

2.6.4. Gesamtzellzahlbestimmung mit DAPI

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl einer Probe wurde der OT nach der Hybridisierung mit DAPI-Lösung (1 µg/ml 4´,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid in H_2O) überschichtet und 5 min im Dunkeln inkubiert. Der OT wurde mit H_2O gespült und bei RT getrocknet. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenz-Farbstoffe zu verlangsamen, wurden die OT in ein Citifluor-Vectashield-Gemisch eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt. Dazu

wurden die Lösungen Citifluor (Citifluor Ltd. London, UK) und Vectashield (Vecor Laboratories Inc., Burlingame, USA) im Verhältnis 4:1 gemischt.

2.6.5. Detektion der Hybridisierungsergebnisse

Die mikroskopische Auswertung der Ganzzellhybridisierungssignale und der DAPI-Färbung erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan oder Axiophot 2, Carl Zeiss, Jena) Die Mikroskope waren mit Neofluar- und Plan-Apochromat-Objektiven in den Vergrößerungen 10-, 40-, 63- und 100-fach ausgestattet und verfügten über für die Farbstoffe Fluorescein (FLUOS), Carboxytetramethyl-Rhodamin (TAMRA) und DAPI geeigneten Filtersätze.

Farbstoff	*Filtersatz*	*Anregungsfilter [nm]*	*Farbteiler [nm]*	*Emissionsfilter [nm]*
FLUOS	09	BP 470/40	FT 510	LP 520
TAMRA	HQ-Cy3	HQ 545/50	Q 565 LP	HQ 610/75
DAPI	01	BP 365/12	FT 395	LP 397

Mit Hilfe eines Zählokulars (10x10 Teilfelder, Zeiss, Oberkochen) wurde die Zahl der pro Gesichtsfeld gefärbten Zellen ermittelt. Zur Vermeidung von Bleicheffekten wurden zuerst die FLUOS-, dann die TAMRA- und zum Schluß die DAPI-Signale jedes Gesichtsfeldes ausgezählt. Um statistisch signifikante Zählwerte zu erhalten, wurden mindestens 20 unabhängig ausgewählte Felder bewertet und die Zähldaten durch die mit der Negativkontrolle NON338 ermittelten Werte korrigiert. Anschließend wurde die Mittelwerte der Zählergebnisse bestimmt. Reichte die Anzahl der unabhängigen Stichproben nicht aus, wurden weitere Felder in die Auswertung mit einbezogen, bis die Standardabweichung bei maximal 10 bis 15% lag.

2.7. PCR-Amplifikationen

2.7.1. Probenaufarbeitung

Um eine schnelle Analyse der Isolate zu ermöglichen, wurden alle PCR-Reaktionen mit aus Zelllysaten freigesetzter DNA ohne deren Isolierung durchgeführt. Bei der Überprüfung von Einzelisolaten wurde eine frische ÜN-Kultur der jeweiligen Probe wie unter beschrieben 2.2.1 in LM17-Medium angezogen, 2x mit 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 9,0 gewaschen und zur Lyse der Zellen 10 min bei 95°C und 800 rpm in einem Thermoschüttler (Thermomixer 5436,

Eppendorf) inkubiert. Zur Analyse der Probe aus den Fermentationsstadien und den Quarkkulturen wurde der Zellaufschluß ohne vorherige Kultivierung durchgeführt.

2.7.2. Spezifischer Nachweis von Lactococcus-Genen

Der PCR-Nachweis von Genen für die Phagenresistenz bzw. für den Citrat- und Lactose-Stoffwechsel wurde entweder im Titerplattencycler GeneAmp 9600 (Perkin Elmer) oder im MJ Research (Biozym) in Volumina von 50 µl durchgeführt. Der PCR-Ansatz enthielt 4 µl Zelllysat, 3 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,0, je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 1 Unit Taq-Polymerase (Pharmacia), sowie je 0,4 µM Primer. Da alle in 2.4.2 und 2.4.3 aufgeführten Primer ihren Schmelzpunkt in einem Temperaturfenster von 4°C haben, konnten alle 44 zur Verfügung stehenden Primerpaare unter den selben PCR-Bedingungen eingesetzt werden: Anfangsdenaturierung 2 min bei 95°C, 30 Zyklen Amplifikation mit je 0,75 min 95°C, 0,75 min 50°C und 1,5 min 72°C und abschließender Polymerisierungsphase von 5 min 72°C.

2.7.3. Identifizierung von Lactococcus-Phagen der 936-, P335- und C2-Spezies

Der Nachweis der verschiedenen Phagen-Spezies in Säurewecker- oder Fermentationsproben erfolgte ohne vorherige Kultivierung oder Reinigung durch direkte Zugabe von 4 µl Probe bzw. deren Verdünnungsstufe in den PCR-Ansatz. Darüber hinaus enthielt der PCR-Ansatz 3 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,0, je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 1 Unit Taq-Polymerase, sowie je 0,4 µM Primer. Das PCR-Programm entsprach den in 2.7.2 angegebenen Bedingungen. Bei den Primerpaaren P482c9_Xnest und P482c18_Xout wurde die Annealingtemperatur auf 44°C herabgesetzt, bei dem Primerpaar P936all_X1nest wurde sie auf 56°C erhöht.

2.7.4. Agarosegelelektrophorese

Die Analyse der Bandengröße erfolgte im 1,5%igen TBE-Agarosegel in Gelkammern mit 50 bzw. 200 ml Volumen (Biometra bzw. Pharmacia). Dazu wurden 15 µl PCR-Ansatz mit 3 µl 5x Probenpuffer versetzt und mit 10 µl Molgewichtsmarker (40ng/µl 1 kb Ladder, Gibco BRL) aufgetragen. Die Anfärbung der DNA-Fragmente erfolgte durch 30 minütige Inkubation des Gels in 1x TBE-Puffer, der 3µg/ml Ethidiumbromid enthielt. Anschließend wurde das Gel im UV-Transilluminator (Reprostar; Cannag) bei 302 nm ausgewertet.

2.7.5. Sequenzanalyse der PCR-Amplifikate

Da die richtige Bandengröße im Agarosegel zwar auf das Vorhandensein des gesuchten Gens hinweist, aber keinen Beweis darstellt, wurden die jeweiligen Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraktions-Kit (Qiagen) gereinigt. Die Sequenzierung erfolgte ohne vorherige Klonierung mit den für die Generierung der Bande verwendeten Primern und wurde von der Firma GAG Biosciences, Bremen durchgeführt.
Der Vergleich der Sequenz der PCR-Produkte mit den in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms Blast. Zur Bewertung der Signifikanz eines Basenaustausches wurde die Nukleotidsequenz mit dem für Bakterien gültigen Code der NCBI-Datenbank in Aminosäuren übersetzt (Jukes und Osawa, 1993; Osawa et al., 1992). Zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei den ausgetauschten Aminosäuren um physikochemisch ähnliche Aminosäuren handelt oder nicht, erfolgte eine Einteilung der Aminosäuren nach folgendem Schema (Taylor, 1986):

L, I, V	hydrophobe, aliphatische AS	⇔	F, Y, W	hydrophobe, aromatische AS
N, Q	polare, amidische AS	⇔	S, T	polare, alkoholische AS
D, E	polare, negativ geladene AS	⇔	H, K, R	polare, positiv geladene AS
A, G	kleine aliphatische AS	⇔	M, C	schwefelhaltige AS
P	AS mit Aminogruppe			

2.8. DNA-Sequenzanalyse des Phagen P482

2.8.1. Gewinnung der Phagen im präparativen Maßstab

Die Anreicherung des Phagen P482 zur Gewinnung der DNA für die Sequenzierung erfolgte im wesentlichen wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben. 10 x 100 ml GM17-Medium werden mit je 5 ml frischer Übernachtkultur eines sensitiven Bakterienstammes beimpft und bei 30°C bis zu einer OD von 0,3 - 0,4 bebrütet. Anschließend werden je 1 ml 40 mM $CaCl_2$ und je 5 ml Phagenlysat (Titer ca. 10^7) zugegeben und bis zur Lyse (OD 0,1-0,2) inkubiert.
Nach der Vereinigung der 10 Kulturen zu 1 l Lysat werden je eine Spatelspitze DNase und RNase zugegeben und bei 38°C 20 min inkubiert. Nach Zugabe von NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1 M wird die Phagenlösung 1 h auf Eis gerührt und anschließend 10 min bei 4°C und 11.000g zentrifugiert. Das Pellet wird in 15 ml SM-Puffer (10 mM NaCl, 0,8 µM $MgSO_4$ x H_2O, 50 mM Tris, 0,1%ig Gelatine) gelöst.

10% PEG6000 wird unter Rühren in H_2O gelöst, 1 h auf Eis gelagert und anschließend 30 min bei 4°C und 11.000g zentrifugiert.

Zum Aufbau des $CsCl_2$-Gradienten werden 1 ml $CsCl_2$-Lösung mit einer Dichte von δ=1,7; 2 ml Lösung δ=1,5; 3 ml Lösung δ=1,4; 3 ml Lösung δ=1,3; 2-3 ml Lösung δ=1,2 in einem Zentrifugenröhrchen übereinander pipettiert und mit ca. 5 ml Phagenlysat überschichtet. Die Abtrennung der Phagen erfolgt im Swing-Out-Rotor der Ultrazentrifuge nach 20-stündigem Zentrifugieren bei 22.000 rpm und 10°C.

Die Ernte der Phagenbande erfolgt wie bei Sambrook et al. beschrieben mit einer Spritze und anschließender Kontrolle auf Phagen im Elektronenmikroskop (Sambrook et al., 1989).

Die Phagen sind in $CsCl_2$ bei 4°C lagerfähig.

2.8.2. Sequenzierung des Phagen P482

Für die Gewinnung der Phagen-DNA wurde zunächst eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt und dann die DNA durch Dialyse in Slide-A-Lyzer-Rähmchen (Pierce) nach Herstellerangaben entsalzt. Alle weiteren Schritte zur Klonierung der Phagen-DNA erfolgten analog Sambrook et al. (1989) Kapitel 2.80. Die mit Sau3A bzw. Taq I restringierte genomische DNA wurde in die Vektoren pZero 2.1 (Invitrogen) bzw. pBluescript (Stratagene) kloniert. Nach der Transformation der Plasmide in E. coli k12 wurde das Vorhanden sein des Inserts durch PCR überprüft. Die DNA-Sequenz der Inserts wurde von der Firma GAG Bioscience GmbH mit Hilfe eines Sequenziergerätes (Abi 373A) ermittelt. Die Anordnung der P482-Fragmente in Contigs erfolgte mit dem Programm Seqman (DNA-Star, LaserGene Inc., Madison, Wisconsin, USA). Zur Schließung der zwischen den Contigs vorhandenen Sequenzlücken wurde mit Hilfe der Programme ClustalW (EBI), MultAlin (INRA) und Genedoc 2.5. ein Alignment mit in den Datenbanken enthaltenen Phagensequenzen der 936-Spezies durchgeführt. Durch gezielte Auswahl von Primern in stark konservierten, aber noch nicht aus P482-bekannten Bereichen konnten die Lücken zwischen den Contigs zu einer kompletten Sequenz des Phagen P482 geschlossen werden.

2.8.3. Vergleichende DNA-Analyse

Für die Auswertung der Sequenz des Phagen P482 wurden die in 2.3 beschriebenen Software-Pakete und Einzelprogramme verwendet. Um die Ergebnisse zu verifizieren, erfolgte die Analyse der Sequenz wenn möglich mit mehr als einem Programm. So wurden die ORFs durch Bewertung der Ergebnisprotokolle aus den Programmen ORF Finder und Omiga 2.0

bestimmt. Die Promotorsequenzen wurden durch Kombination der Programme Omiga 2.0 und Promotorpredictor ermittelt. Darüber hinaus wurden Promotorstrukturen aus nahe verwandten Phagen, die in der Literatur beschrieben worden waren, in die Ermittlung der Promotorsequenzen mit einbezogen. Nach der Identifizierung der ORFs wurde die Nukleotidsequenz durch das Programm "Protein Machine" in Aminosäuren übersetzt und das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt der vorhergesagten Proteine mit den entsprechenden Tools des Expasy-Servers bestimmt. Mit dem Programm Blast wurde ein Vergleich der Aminosäuresequenzen mit in den Datenbanken hinterlegten Proteinen durchgeführt. Um Informationen über die Funktion der vorhergesagten Proteine zu bekommen, wurden Programme wie BLOCKS, InterPro Sequence Analysis, PFAM und Prosite eingesetzt, die nach für Enzymklassen charakteristischen Aminosäuremotiven suchen.

2.9. DNA-Chip-Hybridisierung

2.9.1. Vorbereitung der Sonden und Anbindung an die Chipoberfläche

Die in Tab. 14 aufgeführten Sonden wurden als Stammlösung mit einer Konzentration von 100 µM in H_2O gelöst. Die Verdünnung auf die 10 µM Arbeitskonzentration erfolgte ebenfalls in H_2O mit 1% Glycerin. Zur Reinigung der Sonden wurden Millipore Ultrafree-DA-Titerplatten (Cat.nr. 42600) verwendet. 200 µl Sondenarbeitslösung wurden 15 min bei 1000 rpm in der Eppendorf Zentrifuge mit Swing-Out-Rotor für Titerplatten durch die Filtereinheit in eine neue Mikrotiterplatte (Nunc, heat resistent) zentrifugiert. Die so vorbereiteten Sonden können entweder direkt im Pipettierroboter RoboDrop (Eigenentwicklung des Centrums für angewandte Gensensorik) verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

Die Anbindung der Oligonukleotide auf die Chipoberfläche erfolgte nach Aufbringung der Sonden mit dem Pipettierroboter über Nacht in einer feuchten Kammer. Zur Entfernung nicht-gebundener Sonden und zur chemischen Deaktivierung der Oberfläche wurden die Chips einmal kurz mit Aminohexanol (117,19 g/mol) gewaschen und danach 1 h darin inkubiert.

2.9.2. Extraktion und Restriktion der genomischen DNA

DNA-Extraktion

Die Starterkulturen 8/0, 8/20 und 8/21 wurden über Nacht in 3x 5 ml GM17-Medium angezogen (2.2.1). Um später einen direkten Vergleich der Ergebnisse durch PCR-Nachweis zu ermöglichen, wurde pro Starterkultur je 1 ml Bakteriensuspension entnommen und dem

PCR-Protokoll entsprechend aufgearbeitet (2.7.1). Die genomische DNA wurde mit dem Genomic-Tip 500/G-Kit (Qiagen) laut dem beigelegten Protokoll extrahiert und in 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen. Die durchschnittliche Fragmentgröße beträgt nach Herstellerangaben 20-160 kb. Die Charakterisierung der tatsächlichen Länge der erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese, die DNA-Quantifizierung mittels Photometer, wobei 1 OD_{260} 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht.

Restriktion mit Sau3A

Nach Zugabe von 3 µl Sau3A (10 U/µl, MBI Fermentas) und 3 µl Puffer R wurden 10 µg genomische DNA in einem 30 µl Restriktionsansatz bei 37°C 2 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5 minütiges Erhitzen auf 95°C abgestoppt. Danach wurde die geschnittene DNA mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen) gereinigt und mit 30 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5 von der Säule eluiert. Die Bestimmung der durchschnittlichen Fragmentlänge und die Quantifizierung der DNA erfolgte wiederum mittels Agarosegel und Photometer.

2.9.3. DNA-Markierungsmethoden

Einbau Cy5-markierter dCTPs während der PCR-Reaktion

Die PCR mit den Primerpaaren AbiB und P936_X1out wurde analog zu 2.7.2 und 2.7.3 durchgeführt (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,0, 3 mM $MgCl_2$, je 0,2 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP, je 0,4 µM Primer, 1 Unit Taq-Polymerase, 4 µl DNA im 50 µl Ansatz). Um eine gute Markierung der in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente zu erhalten, wurde das Verhältnis von markierten zu unmarkierten FluoroLink™ Cy5™-dCTP (Amersham Pharmacia Bioscience) im Verhältnis 1:40, 1:20 und 1:4 variiert.

Verhältnis unmarkierten / markierten Cy5-dCTPs	*Konz. unmarkierter dCTPs*	*Konz. markierter dCTPs*	*Konz. dCTPs im Ansatz*
1:40	0,195 mM	0,005 mM	0,2 mM
1:20	0,19 mM	0,01 mM	0,2 mM
1:4	0,15 mM	0,05 mM	0,2 mM

Random Primed Labelling der DNA mit Cy5-dCTP

Die Markierung von 2 µg geschnittener genomischer DNA erfolgte mit dem BioPrime DNA Labelling System (Life Technologies) in Abwandlung des Protokolls der Stanford University

(http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/4_genomic.htm). Zur DNA wurden 20 µl 2,5x Random Primer Lösung und H_2O bis zu einem Gesamtvolumen von 40 µl zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend durch Kühlung auf Eis eine Anlagerung der Primer ermöglicht. Nach Zugabe von 5 µl dNTP-Mix (1 mM dCTP, 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP in 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA), 3 µl 1 mM FluoroLink™ Cy5™-dCTP (Amersham Pharmacia Bioscience) und 2 µl Klenow-Fragment (40 U/µl) wurde der Ansatz gemischt und 3 h bei 37°C inkubiert. Durch 5 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 wurde die Reaktion gestoppt.

Nick Translation System

Der Einbau von Cy5-dCTP erfolgte mit leichten Modifikationen über das Nick Translation System (Promega) nach dem Protokoll für den Einbau radioaktiv-markierter Nukleotide. 1 µg geschnittene genomische DNA wurde mit 5 µl 10x Nick Translation Buffer (500 mM Tris-HCl pH 7,2, 100 mM $MgSO_4$, 1 mM DTT), je 3,3 µl dATP, dGTP und dTTP (Konzentration je 300 µM), 1 µl 1 mM FluoroLink™ Cy5™-dCTP (Amersham Pharmacia Bioscience), 5 µl Nick Translation Enzyme Mix (1.000 U/ml DNA Polymerase I, 3 U/ml DNase I, 50% Glyzerin, 50 mM Tris-HCl pH 7,2, 10 mM $MgSO_4$, 0,1 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA) gemischt und bis zu einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit H_2O aufgefüllt. Für die Markierungsreaktion wurde der Ansatz 2 h bei 15°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 5 µl 0,25 M EDTA pH 8,0 gestoppt.

Reinigung der markierten DNA

Die Abtrennung der dNTPs und der Markierungsenzyme erfolgte mit Microcon YM 30 Filtern (Millipore) wie im Firmenprotokoll beschrieben. Die geschnittene und gelabelte genomische DNA wurde in einem Endvolumen von 12 µl TE pH 7,4 aufgenommen und durch einen Photometerscan vermessen. Die Berechnung der Markierungseffizienz erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Markierungseffizienz} = \frac{c_{\text{Nukleotide}}}{c_{\text{Cy5}}} = \frac{E_{260\,\text{nm}} \bullet \varepsilon_{\text{Cy5}} \bullet d}{E_{649\,\text{nm}} \bullet \varepsilon_{\text{Nukleotide}} \bullet d}$$

mit ε_{Cy5} =250.000 $M^{-1}cm^{-1}$ und $\varepsilon_{\text{Nukleotide}}$ = 12.025 $M^{-1}cm^{-1}$.

Bis zur Hybridisierung auf dem DNA-Array wurde die DNA bei -20°C gelagert.

2.9.4. (Prä-)Hybridisierung der Mikroarrays

Die Zusammensetzung verschiedener Hybridisierungslösungen ist in Tab. 18 dargestellt. Das Rezept für Lösung 1 wurde freundlicherweise von Frau Dipl. Biol. (t.o.) Denja Drutschmann zur Verfügung gestellt. Die Lösungen 2 und 3 basieren auf dem Mikroarray-Hybridisierungsprotokoll der Stanford University bzw. auf der aus der *in situ*-Hybridisierung (vgl. 2.6.3) bekannten Vorgehensweise. Dabei wurden jeweils 2 verschiedene Stringenzen ausgetestet. Die Prähybridisierung der DNA-Mikroarrays erfolgte in 50 ml der jeweiligen Hybridisierungslösung ohne markierte Target-DNA für 1 Stunde bei 46°C.

	Hybridisie-rungslsg. 1	***Hybridisierungslsg. 2***		***Hybridisierungslsg. 3***	
Formamid	20%	20%	0%	20%	0%
SSC	-	4x	4x	-	-
EDTA pH 7,0	1 mM	-	-	-	-
NaCl	600 mM	-	-	900 mM	900 mM
Tris pH 8,0	10mM	-	-	20 mM	20 mM
SDS	-	0,02%	0,02%	0,01%	0,01%
Denhardt`s Reagenz	1x	1x	1x	-	-
Fish-DNA	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	-	-

Tab. 18. Hybridisierungslösungen für die DNA-Chip-Hybridisierung.

Die für die Hybridisierung benötigten Deckgläser wurden mit Spülmittel gereinigt und gründlich mit Wasser abgespült. Nach der Prähybridisierung wurde die Flüssigkeit vom DNA-Array abgetropft, dieser aber nicht getrocknet. Zur Vorbereitung der Hybridisierungsreaktion wurden 170 µl Hybridisierungslösung mit 30 µl markierter DNA gemischt und zur Denaturierung 10 min im PCR-Cycler (Landgraf) bei 95°C erhitzt. Als Positivkontrolle wurde 1 µl eines Cy3-markierten, zur EUB338-Sonde revers komplementären Oligonukleotids zugegeben. Sofort nach der Denaturierung wurde der DNA-Array mit der Hybridisierungslösung überschichtet, luftblasenfrei mit den vorbereiteten Deckgläsern abgedeckt und über Nacht bei 46°C in einer equilibrierten feuchten Kammer inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurde der DNA-Mikroarray solange in Waschlösung 1 getaucht bis sich das Deckglas abgelöst hatte. Anschließend wurde durch unterschiedlich stringente, 20-minütige Waschschritte nicht-gebundene DNA von der Oberfläche entfernt (Waschlösung 1: 2x SSC, 0,2% SDS; Waschlösung 2: 1x SSC, 0,1% SDS; Waschlösung 3: 0,5x SSC, 0,05%

SDS). Da SDS-Reste den Hintergrund erhöhen können, wurde der Mikroarray zuletzt mit SDS-freier Waschlösung 3 gespült und entweder im N_2-Strom oder durch 5 minütiges Zentrifugieren im Greiner-Röhrchen (Eppendorf-Zentrifuge mit Swing-Out-Rotor 500-1.000 rpm) getrocknet. Die Signaldetektion erfolgte im Fluoreszenz-Scanner (Axon, Firma Biozym) unter Verwendung der GenePix 3.0-Software.

3. Ergebnisse

3.1. Populationsanalyse mit Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

3.1.1. Die Permeabilität der LowGC Gram-positiven Zellwand und Autofluoreszenz fermentierter Milchprodukte

Die Anwendbarkeit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ganzer Zellen mit rRNA-gerichteten Sonden wurde anhand der Sonde EUB338, die mit allen Eubakterien außer den *Planctomycetes* ein positives Hybridisierungssignal liefert, und verschiedener Referenz-organismen (vgl. 2.5.1), die in Milchfermentationen vorkommen können, gezeigt. Nach der Permeabilisierung der Gram-positiven Zellwand mit Lysozym waren die Zellen der 6 Referenzstämme und die in den Fermentationsproben enthaltenen unbekannten Zellen für die Sonden zugänglich und lieferten Signale in etwa der gleichen Intensität. Zu Beginn der Fermentation waren durchschnittlich 98% der durch DAPI-Färbung sichtbaren Zellen für die EUB338-Sonde zugänglich.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde bei jeder Hybridisierung die Sonde NON338 mitgeführt, die in allen Experimenten negative Signale zeigte. Einer Verfälschung der Zählergebnisse durch die Autofluoreszenz der Milchproteine konnte durch Waschen der Zellen mit 40mM NaOH vor der Fixierung entgegengewirkt werden. Durch diesen Waschschritt wurde die Autofluoreszenz des Hintergrundes weitgehend unterdrückt.

Die sonst übliche Bestimmung der Gesamtzellzahl durch Filtration eines definierten Volumens auf Polycarbonatfilter konnte aufgrund des verbleibenden Proteinanteils aus den Fermentationsrückständen nicht durchgeführt werden. Alle angegebenen Werte beziehen sich deshalb auf die durch unspezifische Färbung der Zellen mittels DAPI ermittelte Zellzahl und sind relative Angaben.

3.1.2. Phagentiter, stoffwechselaktive Zellen und Säuerungsänderung

In den ersten 7 Stunden der unnatürlich säuernden Fermentation B sinkt der pH-Wert nur langsam um durchschnittlich 0,14 pH-Einheiten pro Stunde. Nach einer 30 minütigen Säuerungspause bei einem pH-Wert von 5,8 tritt eine zweite, stärkere Säuerungsphase ein, in der der pH-Wert um 0,38 Einheiten pro Stunde abnimmt (Abb. 3).

Nach der Inokulation der Milch mit der Starterkultur sind weniger als 10 Phagen pro ml nachweisbar (Dr. H. Neve, BAfM, persönliche Mitteilung). Während der ersten 2,5 h steigt

der Phagentiter auf 10^9 Phagen pro ml an und bleibt während der ganzen Fermentation auf diesem hohen Niveau.

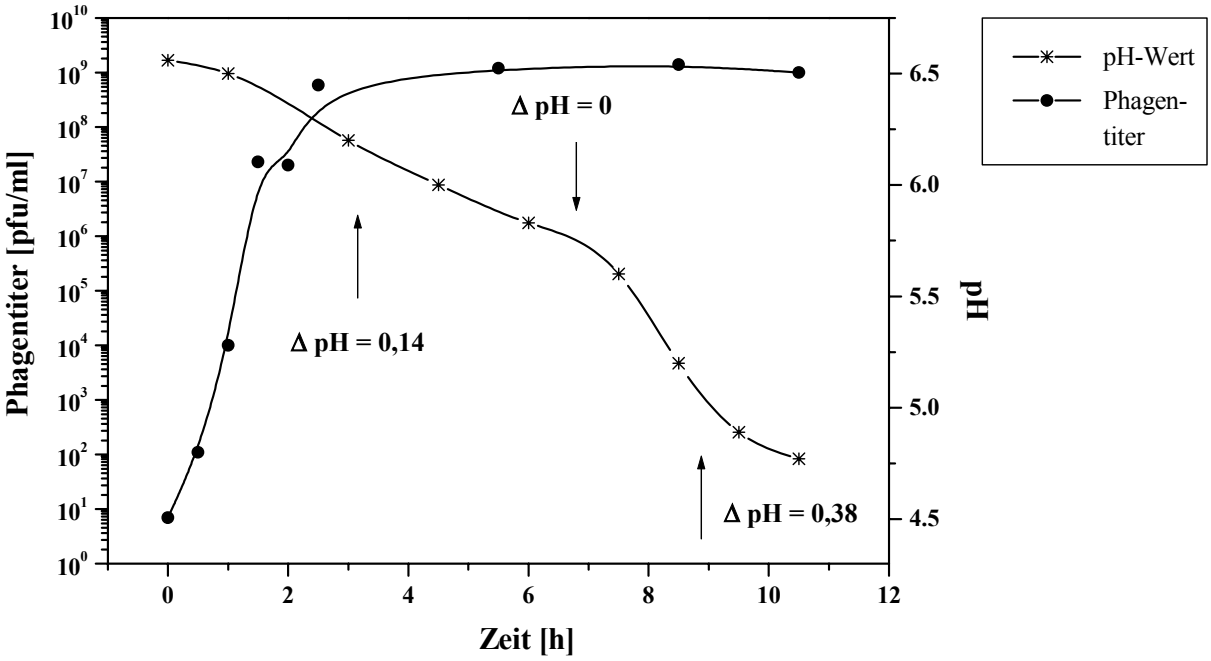


Abb. 3. Säuerungskurve und Phagentiter einer instabilen Quarkfermentation.

Um die fixierten Zellen für die Hybridisierung mit rRNA-Sonden zugänglich zu machen, wurde die Zellwand mit Lysozym, das das Peptidoglycan hydrolysiert, permeabilisiert. Am Anfang der Fermentation waren 98% der mit dem Farbstoff DAPI erkennbaren Zellen mit der Sonde EUB338 detektierbar. Im weiteren Verlauf der Säuerung unterschieden sich wie aus Abb. 4 ersichtlich die mit der DAPI-Färbung ermittelten Gesamtzellzahlen von der mit der EUB338-Sonde gezählten Zellzahlen. Nach 7 Stunden war nahezu keine Säuerung mehr feststellbar und der Phagentiter erreichte seinen Höhepunkt an dem nur noch etwa 20% der Zellen mit der Sonde EUB338 detektierbar waren. Da die Signalstärke der rRNA-gerichteten Sonden direkt vom Ribosomengehalt der Zellen und damit von deren metabolischer Aktivität abhängt, war bei 80% der Zellen der Ribosomengehalt zu diesem Zeitpunkt aufgrund schlechter Wachstumsbedingungen sehr gering. Erst nach 8 Stunden, nach Beginn der zweiten starken Säuerungsphase, stieg die Zahl der mit der Eubakterien-Sonde detektierbaren Zellen wieder bis zum Ende der Fermentation an.

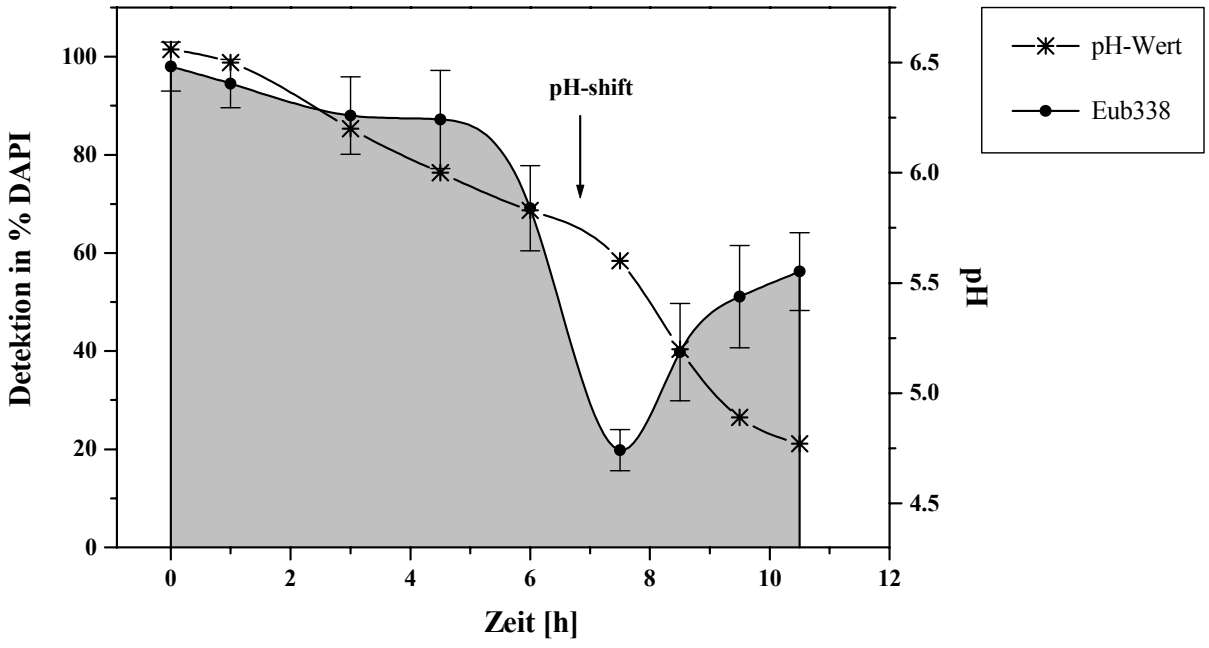


Abb. 4. Vergleich der stoffwechselaktiven Zellen und der Säuerungsaktivität.

3.1.3. Zusammensetzung der Bakterienpopulation

Zur Identifizierung der im Quark enthaltenen Mikroorganismen wurde das Prinzip der hierarchisch angeordneten Sonden verfolgt. Mit einer in der Hierarchieebene untergeordneten Sonde wie der Sonde LGC354 läßt sich eine Teilmenge der übergeordneten Sonde EUB338 detektieren. Wie aus Abb. 5 hervorgeht, sind die Zellzahlen für beide Sonden im Rahmen der Standardabweichung gleich. In der untersuchten Fehlfermentation kommen also keine Eubakterien vor, die nicht zur Gruppe der LowGC Gram-positiven gehören. Damit ist eine Verunreinigung mit quarkfremden Organismen, die zu Fehlfermentationen führen können, in der untersuchten Fermentation ausgeschlossen.

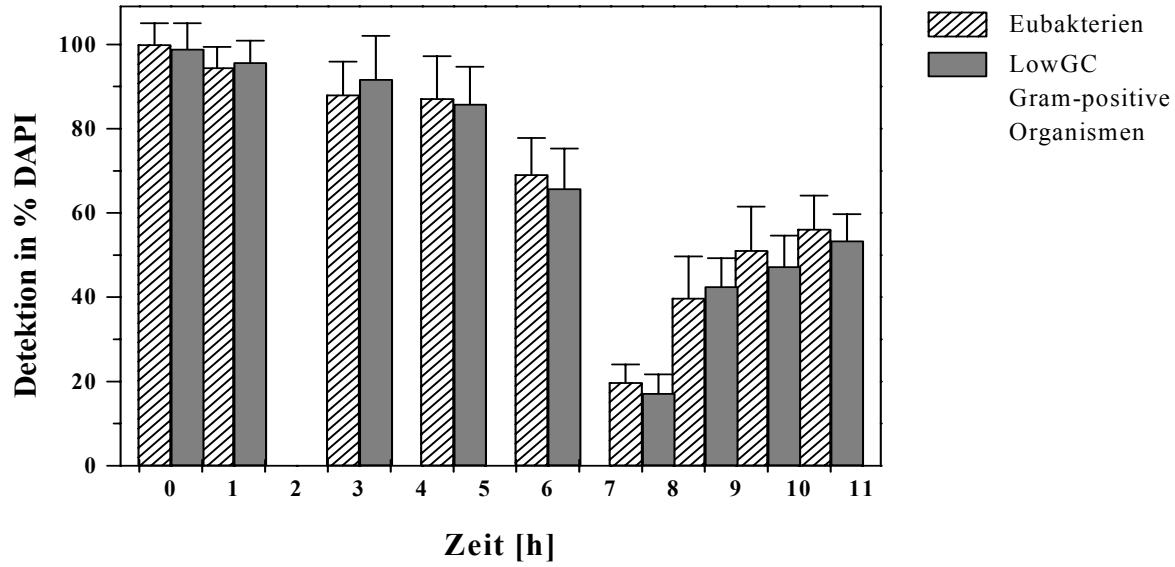


Abb. 5. Prozentualer Anteil der Eubakterien-Sonde EUB338 und der Sonde LGC354 für LowGC Gram-positive Bakterien an der Gesamtzellzahl.

Ein Vergleich der Bakterienzusammensetzung im Molke- und im Quarkanteil der Fermentation zeigt, dass die Unterschiede der für die Spezies *L. lactis* ssp. *lactis* und *L. lactis* ssp. *cremoris* gefundenen Zellzahlen im Rahmen der Standardabweichung zu vernachlässigen sind (Abb. 6). Aus diesem Grund wurden die Zählergebnisse aus beiden Anteilen für die Gesamtbetrachtung der Fermentation zusammengefaßt.

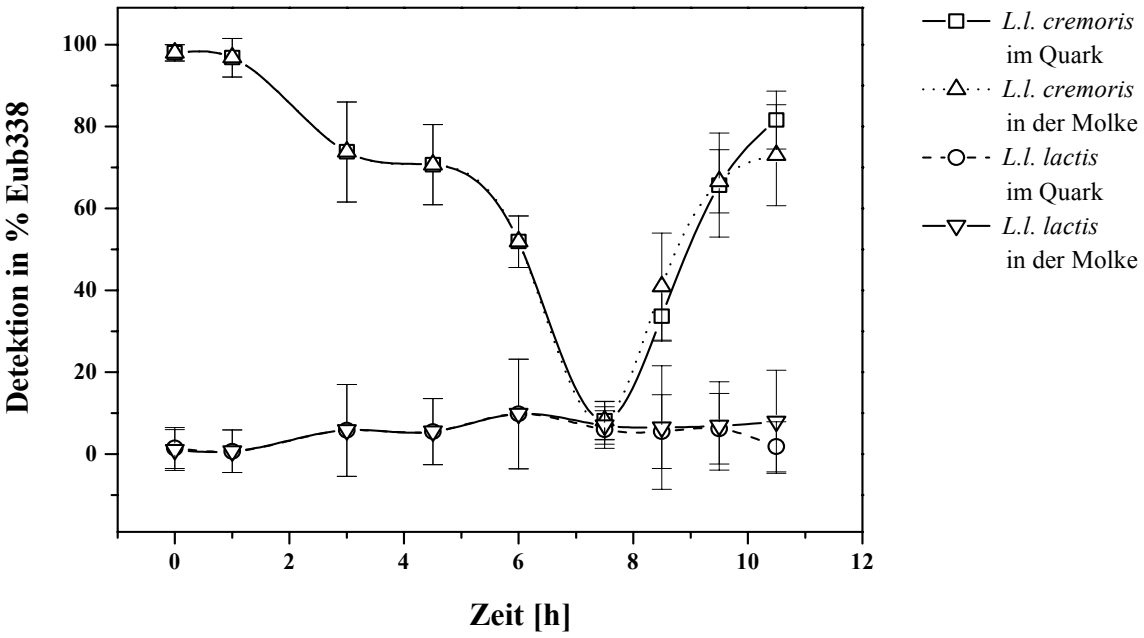


Abb. 6. Zellzahlen von *L. lactis* ssp. *lactis* und *L. lactis* ssp. *cremoris* im Molke- und im Quarkanteil der Fermentation.

Während der Fermentation veränderte sich der Anteil der einzelnen Bakterienstämme an der Gesamtpopulation erheblich (Abb. 7). In den ersten drei Stunden der Säuerung hybridisierten zwischen 87 und 97% der Bakterien mit der für *L. lactis* ssp. *cremoris* spezifischen Sonde LLC68. Nur 2-13% waren den anderen in der Starterkultur enthaltenen Stämmen *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* und *Leuconostoc mesenteroides* zuzuordnen. Die *Lactococcus*-Subspezies *cremoris* war also der zu Beginn der Fermentation dominierende Organismus. Nach 2 h Säuerung zeigte sich eine Änderung in der Populationszusammensetzung. Der Anteil der *L. lactis* ssp. *cremoris* nahm ab und betrug nach 7,5 h weniger als 1% der mit DAPI detektierbaren Zellen. Während der Prozentsatz von *L. lactis* ssp. *lactis* während der ganzen Fermentation nur einen sehr niedrigen Bakterienanteil zwischen 1-6% ausmachte, erhöhte sich die Anzahl der Low G+C Gram-positiven, die nicht zur Gattung *Lactococcus* gehören, auf 26% der Gesamtpopulation. In der zweiten Säuerungsphase blieb dieser Wert konstant hoch und der Anteil der *L. lactis* ssp. *cremoris*-Stämme in der Gesamtkultur stieg wieder auf ca. 40% an.

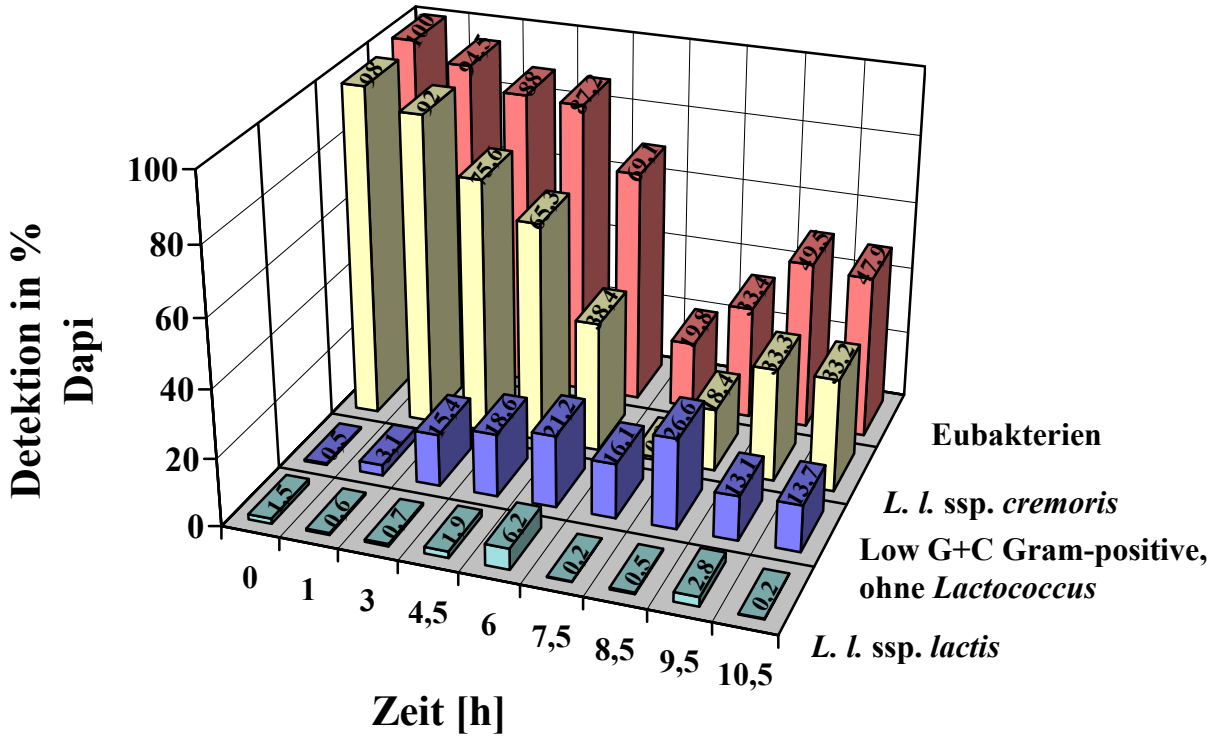


Abb. 7. Prozentualer Anteil von *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* und sonstigen LowGC Gram-positive Mikroorganismen in einer instabil säuernden Fermentation.

3.2. Phagenresistenz bei *Lactococcus lactis*

3.2.1. Phagenresistenzgene in Starterkulturen

3.2.1.1 Qualitative Analyse der Starterkulturen und der Einzelisolate des Kulturenherstellers

Bei der Analyse des Phagenresistenz-Spektrums von 7 verschiedenen Starterkulturen und 3 Einzelstämmen einer Starterkulturfirma konnten insgesamt 28 der 35 mit Primern detektierbaren Resistenzgene nachgewiesen werden. Die Gene für die Blockierung der Phagenadsorption, die Inhibition der DNA-Injektion, 11 der 13 Gene für die Restriktion der Phagen-DNA und 14 der 19 Gene für den Abort der Phageninfektion waren in den Kulturen enthalten (Tab. 19). Die Restriktionsenzyme *Lla*KR2 und *Lla*FI bzw. die "Abortive Infection"-Gene *abiD*, *abiF*, *abiI*, *abiL1* und *abiL2* konnten nicht nachgewiesen werden.

In 5 der 7 untersuchten Starterkulturen kamen mindestens 9 verschiedene Resistenzmechanismen vor. Die beiden Ausnahmen stellten die Starterkulturen Probat 8/20 und 8/21 dar, in denen nur *abiN* als einziges Resistenzgen identifiziert werden konnte. Das breiteste Spektrum wurde in den Starterkulturen Probat 8/0 und Probat 505 festgestellt. Hier wurden je 17 verschiedene Resistenzgene nachgewiesen. Am häufigsten traten die Gene der Restriktionsenzyme auf, von denen jede Starterkultur außer Probat 8/20 und 8/21 mindestens 7 enthielt. Die beiden Gene des Restriktionstyps I wurden in allen Isolaten identifiziert, nicht aber in Probat 8/20 und 8/21. Das Gen, das die Injektion der Phagen-DNA verhindert, konnte nur einmal im Einzelstamm W3 nachgewiesen werden. Obwohl 19 Gene bekannt sind, die in der Lage sind die Reifung der Phagen innerhalb der Wirtszelle zu stoppen, konnten in den Starterkulturen Probat 8/20, 8/21, M4, M7 und G3-Mix 6 nur je 1-4 verschiedene Gene dieses Typs identifiziert werden.

Gene	*Starterkulturen*							*Einzelisolate*		
	Probat 8/0	*Probat 8/20*	*Probat 8/21*	*Probat M4*	*Probat M7*	*G3-Mix 6*	*Probat 505*	*W 1*	*W 2*	*W 3*
Adsorptionsresistenz										
ads	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Inhibition der Injektion										
pip	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Restriktion der Phagen-DNA										
***lld* I**	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
***lla* 1403**	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
***scr*FI**	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
***lla* I1**	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
***lla* I2**	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
***lla* I3**	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
***lla* II**	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
***lla* BI**	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
***lla* BII**	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
***lla* CI**	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
***lla* DII**	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
***lla* FI**	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Abortive Infektion der Phagen-DNA										
abiA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
abiB	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
abiC	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiD1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
abiE1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
abiE2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
abiG1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiH	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
abiN	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
abiP	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
abiQ	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Summe	17	1	1	13	11	9	17	5	6	8

Tab. 19. Phagenresistenzgene in Starterkulturen und Einzelstämmen einer Starterkulturfirma.

3.2.1.2 Quantitative Analyse der Starterkultur Probat 8/0

Das Vorkommen der 17 in der Starterkultur Probat 8/0 enthaltenen Phagenresistenzgene wurde anhand von Einzelisolaten quantitativ untersucht. Wie in Abb. 8 gezeigt, waren das Gen für die Adsorptionsresistenz, die beiden Gene für die Restriktionsenzyme des Typs I und das Gen *abiB* in mehr als 40% der untersuchten Isolate vorhanden. Die Gene *lla*BI, *lla*DII und *abiM* spielen mit Prozentsätzen von 16, 10 und 7% eine untergeordnete Rolle. Die restlichen Gene sind nur in 2-3% der Starterkulturisolate nachweisbar.

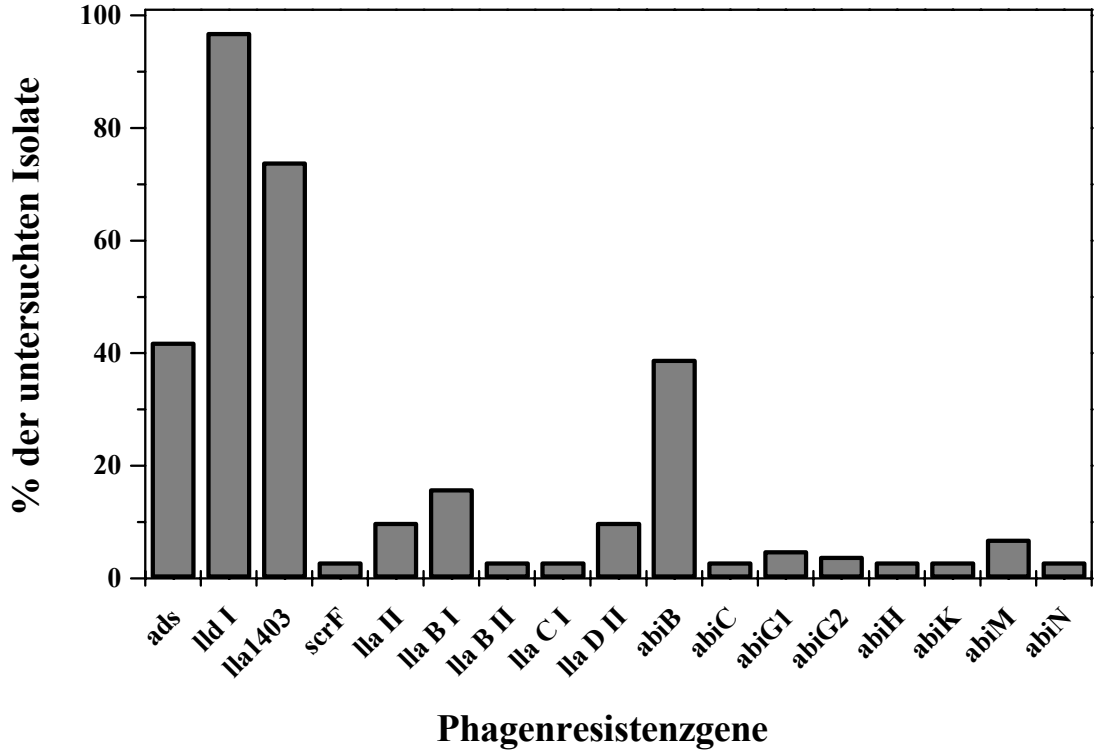


Abb. 8. Die Häufigkeit der Phagenresistenzgene in der Starterkultur Probat 8/0.

3.2.2. Phagenresistenzgene in verschiedenen Speisequarks

In den 4 getesteten Speisequarks wurden 27 verschiedene Phagenresistenzgene identifiziert. Der Nachweis der Gene *abiL1* und *abiL2* im Speisequark Q3 zeigte, dass die für diese Gene designten Primer das gewünschte PCR-Produkt liefern. Somit konnte ein falsch-negatives Ergebnis bei den vorher untersuchten Proben ohne PCR-Produkt ausgeschlossen werden. Die Gene *abiA*, *abiG1* und *abiG2* konnten in den hier untersuchten Quarkproben nicht nachgewiesen werden. Obwohl die Probe Q1 einen handelsüblichen Speisequark, der durch Fermentation mit der Starterkultur Probat 8/0 hergestellt worden war, enthielt, konnten im

Gegensatz zu den untersuchten Starterkultur- und Fermentationsproben die Gene *abiG1* und *abiG2*, die in der Starterkultur in 3% der Isolate gefunden worden waren, nicht mehr identifiziert werden. Bei der hier untersuchten Quarkprobe wurde statt dessen das Gen für die Inhibition der Phagen-DNA-Injektion und eine 830 bp lange Variante des *abiP*-PCR-Produkts (vgl. 3.2.3) nachgewiesen. Die Gesamtzahl der Phagenresistenzen bleibt also konstant bei 17. Etwa die gleiche Anzahl läßt sich in Q2 und in Q4 feststellen. Im Quark Q3 liegt die Zahl der Phagenresistenzen mit 22 verschiedenen Genen von allen untersuchten Proben am höchsten.

Gene	***Q1***	***Q2***	***Q3***	***Q4***
ads	+	+	+	+
pip	+	+	+	-
lld I	+	+	+	+
lla 1403	+	+	+	+
scrF	+	+	+	+
lla I1	-	+	+	-
lla I2	-	-	+	-
lla I3	-	-	-	-
lla II	+	+	+	+
lla BI	+	+	+	+
lla BII	+	+	+	+
lla CI	+	+	+	+
lla DI	+	-	+	+
lla FI	-	+	+	-
abiB	+	+	+	+
abiC	+	-	-	-
abiD1	-	+	-	-
abiE1	-	-	+	-
abiE2	-	-	+	-
abiH	+	+	+	-
abiK	+	-	-	-
abiL1	-	-	+	-
abiL2	-	-	+	-
abiM	+	+	+	+
abiN	+	+	+	+
abiP	+	-	+	+
abiQ	-	-	-	+
Summe	17	16	22	14

Tab. 20. Phagenresistenzgene in verschiedenen Quarkproben.

Mit den für die Gene *lla*KRII, *abiD*, *abiF* und *abiI* designten Primern konnten weder aus den Referenzstämmen, den Starterkulturen oder den Quarkproben PCR-Produkte amplifiziert werden. Da es trotz intensiver Bemühungen nicht möglich war, die in der Literatur angegebenen Stämme als Referenzstämme zu bekommen, standen für diese Primer keine Positiv-Kontrollen zur Verfügung. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die Gene in den untersuchten Kulturen vorhanden, die Primer aber nicht funktionsfähig sind.

3.2.3. Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Phagenresistenzgenen

Die DNA-Sequenzierung der in der PCR-Reaktion amplifizierten Resistenzgen-Fragmente ergab eine 97 bis 100%ige Übereinstimmung mit den in den Datenbanken hinterlegten Einträgen. Beispielsweise ist das PCR-Produkt, das dem Nachweis von *abiM* dient, 650 bp lang. Somit werden 76,6% der 849 bp langen kodierenden Sequenz amplifiziert. Die Sequenzanalyse zeigt reproduzierbar 16 ausgetauschte Basen. Das entspricht einer 97,4%igen Identität auf DNA-Ebene. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt, dass 3 der ausgetauschten Basen zu stummen Mutationen führen. 8 Mutationen verursachen einen Austausch von Aminosäuren mit ähnlichen funktionellen Gruppen, wie z.B. Valin gegen Isoleucin. Die restlichen 5 Mutationen führen zu gravierenderen Änderungen in der Aminosäuresequenz. Ob sich diese Veränderungen positiv oder negativ auf die Funktionsfähigkeit des Phagenresistenzmechanismus auswirken, kann nur experimentell geklärt werden.

Bei der Analyse der Starterkultur Probat 8/0 und ihren Fermentationen trat bei der *abiP*-PCR statt dem 625 bp-Fragment ein 830 bp langes PCR-Produkt auf. Im Bremerland-Quark konnten diese beiden PCR-Fragmente in der selben Probe identifiziert werden. Beide Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert. Das 625 bp-Fragment zeigt auf DNA-Ebene 96,2% Sequenzidentität zur Referenzsequenz U90222 in der Datenbank (Schouler et al., 1998a). Die Änderung der Nukleotidsequenz führt zum Austausch von 7 Aminosäuren. Das entspricht einem Prozentsatz von 3,6% (Abb. 9). Das generierte Primerpaar amplifiziert also das Gen *abiP*.

Die Sequenzanalyse des größeren PCR-Fragments umfasst 828 Basen. Die ersten 138 Basen zeigen 91,3%, die letzten 300 Basen 95,7% Sequenzidentität zur aus der Literatur bekannten Sequenz. Dazwischen liegt ein 390 Basen langer Bereich, der keine Ähnlichkeit mit in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen aufweist. Mit 147 Basen ist der zwischen den

konservierten Bereichen liegende Sequenzabschnitt im 625-bp-Fragment deutlich kürzer. Wie Abb. 9 zeigt, bleiben die auf DNA-Ebene gefundenen Homologiebereiche auch in der Aminosäuresequenz erhalten. Die beiden Bereiche mit hoher Sequenzähnlichkeit weisen 17 ausgetauschte Aminosäuren auf, das entspricht 11,5%. Das aus dem 828 bp-Fragment resultierende Protein würde aus 325 Aminosäuren bestehen und wäre 33% länger als das aus der Literatur bekannte AbiP-Protein.

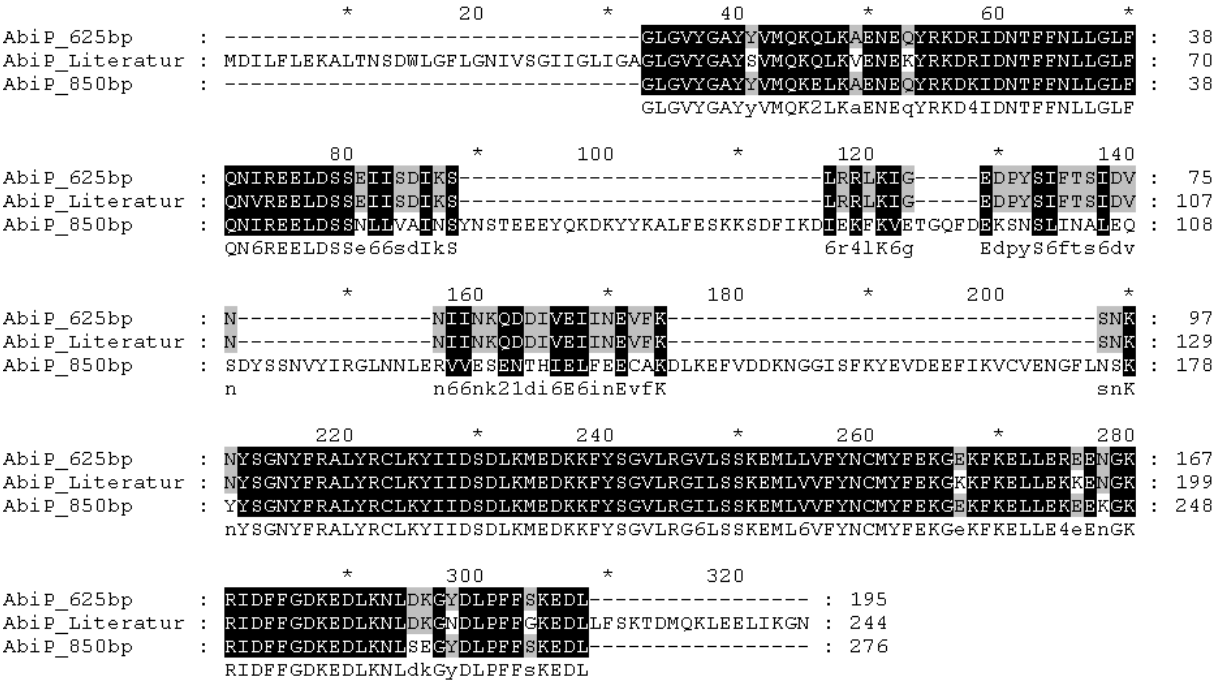


Abb. 9. Vergleich der Aminosäuresequenzen des aus Literatur bekannten Phagenresistenz-mechanismuses AbiP mit den aus dem Bremerland-Quark isolierten Sequenzen.

3.2.4. Phagenresistenz in Fermentationen mit unterschiedlicher Säuerung

Aus 3.2.1 geht hervor, dass die Starterkultur Probat 8/0 das Resistenzgen für die Abwehr der Phagenadsorption, 8 Gene für die Restriktion der Phagen-DNA und 8 Gene, die die Reifung und Freisetzung der Phagen verhindern, enthält. Bei Fermentationen dieser Starterkultur wurde die Anzahl der verschiedenen Phagenresistenzgene im Verlauf der Säuerung verglichen. Die Gene für die Adsorptionsresistenz, die Restriktionsenzyme *Lld*I, *Lla*1403, *Lla*II, *Lla*B I, *Lla*D I und für AbiB traten während den Fermentationen in signifikanten Mengen auf. Die Gene *scr*F, *lla*B II, *lla*C I, *abiC*, *abiG1*, *abiG2*, *abiH*, *abiK*, *abiM* und *abiN* spielten bei allen Fermentationen eine untergeordnete Rolle und wurden in maximal 5% der untersuchten Isolate eines Probennahmezeitpunktes nachgewiesen.

Nach erfolgter Säuerung zeigte sich bei Fermentationen mit kontinuierlicher pH-Absenkung eine im Vergleich zur Starterkultur gleichbleibende bzw. gesteigerte Menge an Phagenresistenzgenen (Abb. 10). Diese Steigerung trat im phagenfreien Säurewecker und im phagenbelasteten Labtank auf. Bei der Fermentation mit ungleichmäßigem Säuerungsverlauf waren bei pH 4,7 sehr viel weniger Phagenresistenzgene vorhanden als in der Starterkultur.

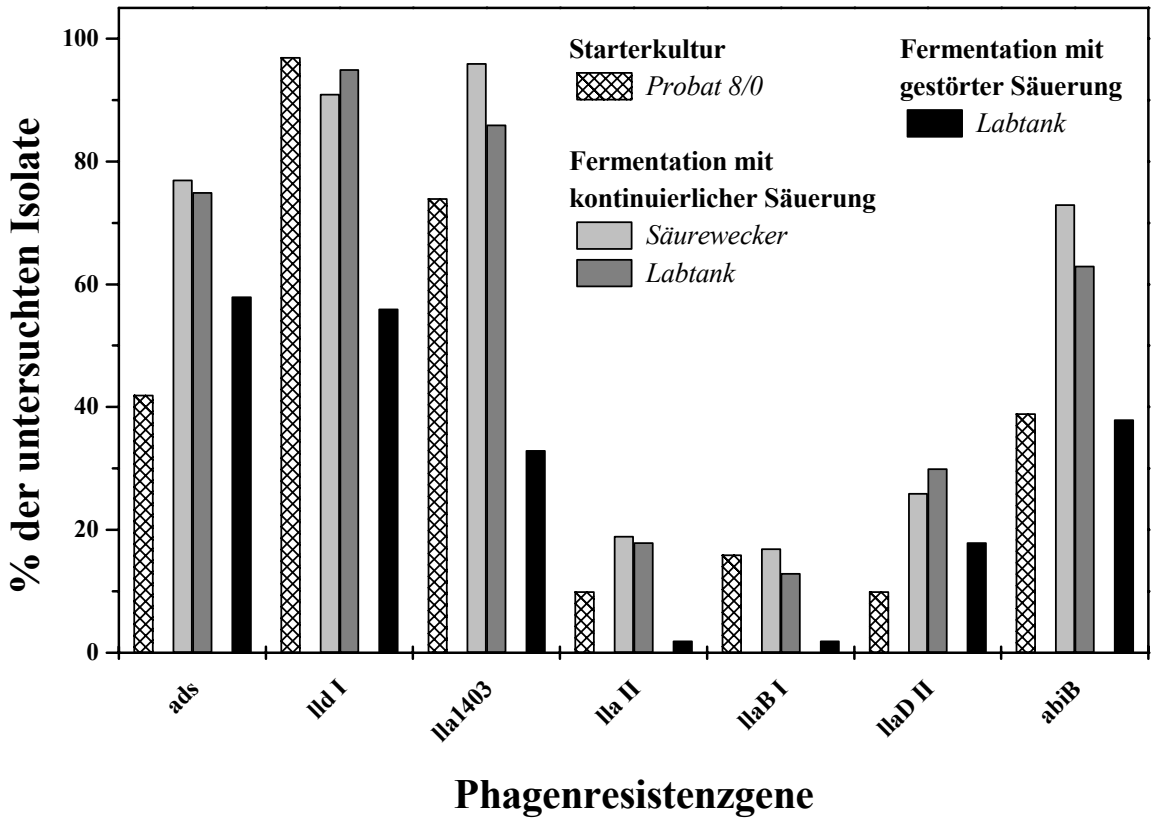


Abb. 10. Phagenresistenzgene nach Fermentationen mit normaler bzw. gestörter Säuerung.

Bei der normal säuernden Fermentation treten alle Phagenresistenzgene in höheren Prozentsätzen auf als bei der Fermentation mit verzögerter Säuerung. Ein Vergleich von Abb. 11 und Abb. 12 zeigt, dass die Adsorptionsresistenz bei beiden Fermentationen bei einem pH-Wert von 5,8 bei etwa 65% der *Lactococcus*-Stämme vorhanden war. Bei einer guten Fermentation stieg dieser Prozentsatz während der weiteren Säuerung auf 81% an, während er bei einer gestörten Säuerung abnahm. Ein ähnlicher Verlauf war bei *lla*II und beim "Abortive Infection of Phages"-Gen *abiB* zu beobachten, das bei einem pH-Wert von 5,8 in 66 bzw. 70% der Isolate vorhanden war. Nach der schlechten Säuerung enthielten nur noch 38% der untersuchten Stämme das Gen, bei der gleichmäßigen Säuerung blieb der Prozentsatz auf seinem hohen Niveau.

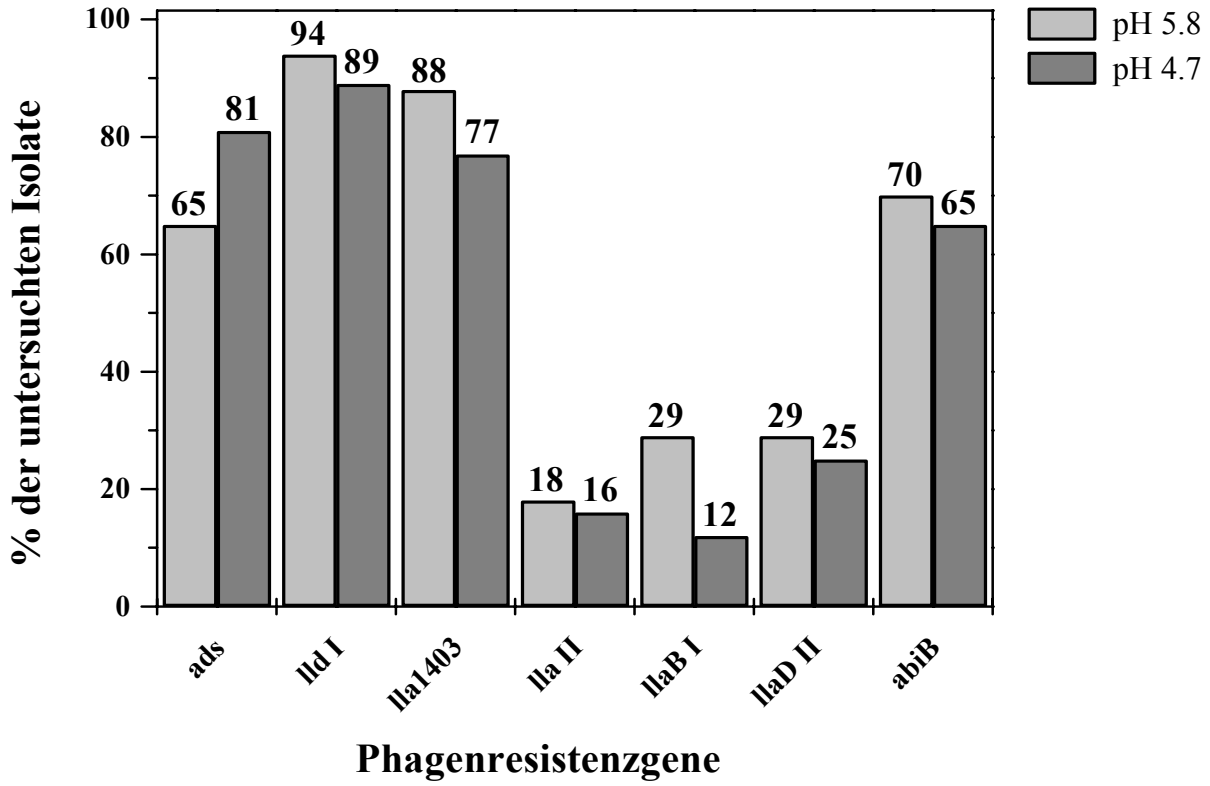


Abb. 11. Phagenresistenzgene in einer normal säuernden Fermentation im Labtank.

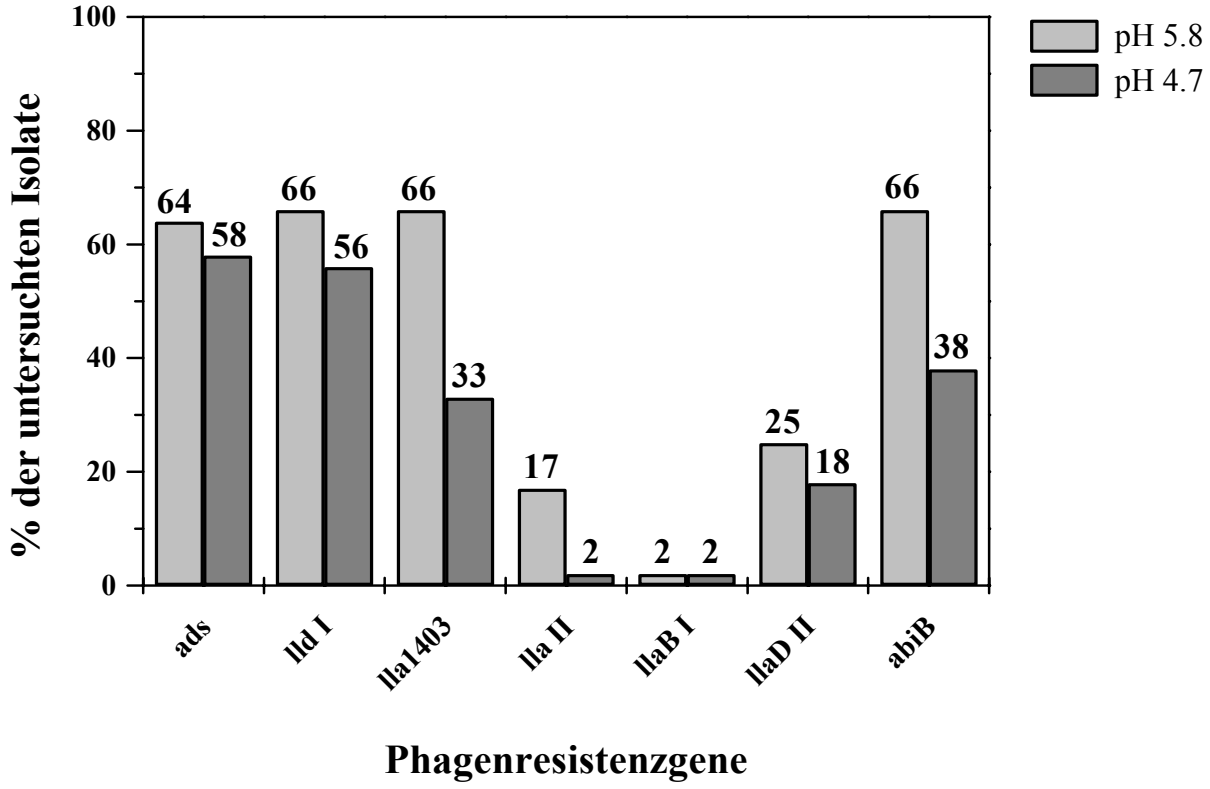


Abb. 12. Phagenresistenzgene in einer Labtank-Fermentation mit gestörter Säuerung.

Der prozentuale Anteil der Resistenzgene *lld*I, *lla*1403 und *lla*B I lag bei der konstant säuernden Fermentation mindestens 20% höher als bei der Fermentation mit verzögerter Säuerung. Das Resistenzgen *lla*D II war unabhängig vom pH-Verlauf bei allen Fermentationen in 18-29% der untersuchten Isolate vorhanden.

3.2.5. Vergleich der Phagenresistenzgenanalyse mit den RAPD-Ergebnissen

Aus den Arbeiten von U. Irps (1998) und S. Peters (1999) geht hervor, dass sich die aus der Starterkultur Probat 8/0 und deren Fermentationen isolierten *Lactococcus*-Stämme in 11 verschiedene RAPD-Typen unterteilen lassen (Irps, 1998; Peters, 1999). Die zum Grundtyp (GT) C zusätzlich auftretenden Banden entstehen durch den Austausch von Plasmiden bei der Konjugation oder durch Umordnungen im Bakterienchromosom. Die in Tab. 21 gezeigte, vereinfachte Darstellung der RAPD-Ergebnisse fasst die RAPD-Typen in Gruppen mit gleicher Anzahl von zusätzlichen Banden zusammen.

	GT	***GT + 1***			***GT + 2***					***GT + 3***	***GT + 4***
RAPD-Typ	***C***	***A***	***B***	***J***	***D = CAB***	***F = CAJ***	***G = CBJ***	***H***	***I***	***E***	***E2***
Banden-muster	C	C + 600	C + 1900	C + 450	C + 600 + 1900	C + 600 + 450	C + 1900 + 450	C + 2100 + 450	C + 450 + 1000	C + 1500 + 900 + 550	C + 1500 + 900 + 550 + 450
∅ PRG / Gruppe	*2,3*	*3,14*			*3,33*					*3,5*	*4,2*
Standard abw. / Gr	*0,8*	*2,0*			*1,8*					*1,0*	*0,8*
∅ PRG	2,3	1,7	2,8	4,9	3,6	2,3	2,4	4,1	3,9	3,5	4,2
Standard abw.	0,8	0,8	1,0	2,4	1,7	1,4	1,1	2,0	1,6	1,0	0,8

Tab. 21. Einteilung der RAPD-Typen nach der Anzahl ihrer zum Grundtyp C zusätzlichen Banden und deren durchschnittliche Anzahl an Phagenresistenzgenen.

Das Bandenmuster des RAPD-Typs C ist in allen anderen Mustern enthalten und stellt somit den Grundtyp dar, der möglicherweise durch chromosomale Banden erzeugt wird. Die Typen A, B und J beinhalten jeweils eine zusätzliche Bande. D, F und G tragen je zwei dieser Banden. D kann auch als CAB, F als CAJ und G als CBJ beschrieben werden. Die RAPD-Typen H (Banden bei 2100 und 450 bp) und I (Banden bei 1000 und 450 bp) enthalten

ebenfalls 2 im Vergleich zum Grundtyp zusätzliche Banden. Isolate mit nur einer zusätzlichen 2100 bp bzw. 1000 bp langen Bande traten nicht auf. Die 3 Banden mit 550, 900 und 1500 bp sind nur im RAPD-Typ E und dessen Variante E2, die 4 Banden enthält, nachweisbar. Sie entstehen entweder durch die Bindung der RAPD-Primer an das gleiche Plasmid oder die zugrunde liegende Plasmidkombination bietet einen Selektionsvorteil.

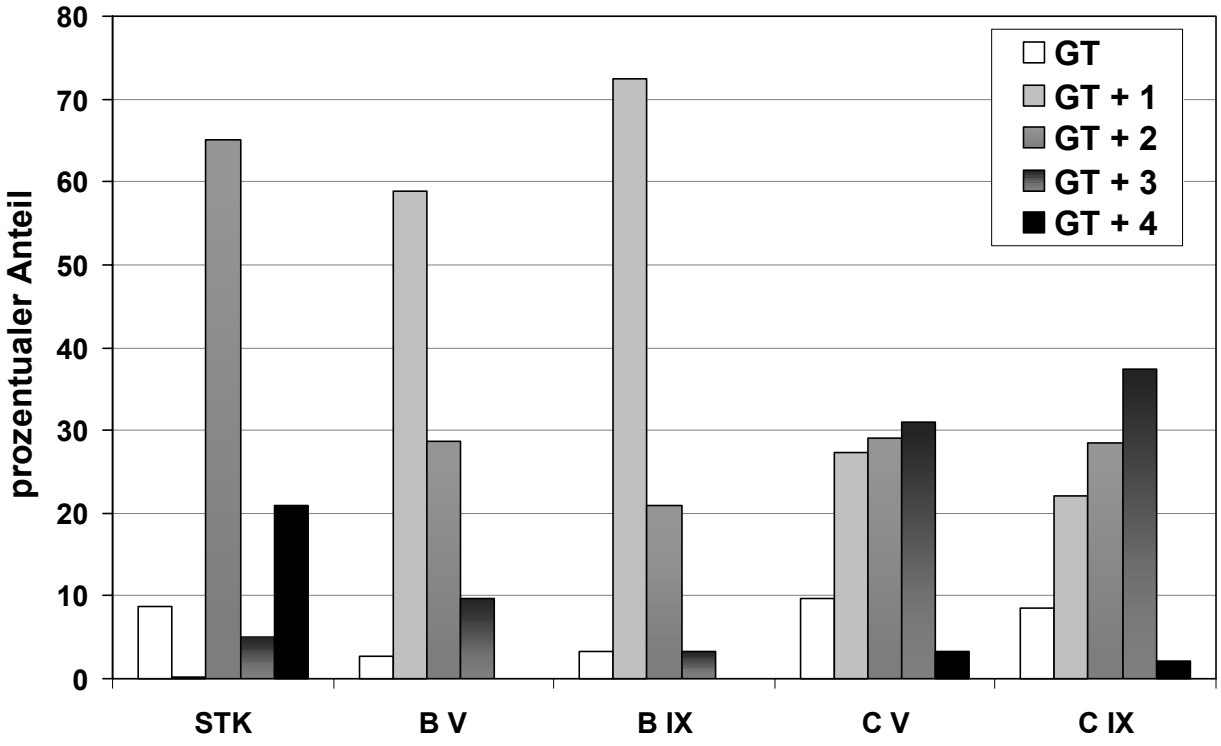


Abb. 13. Anteil der zum Grundtyp C zusätzlichen RAPD-Banden in einer Starterkultur (STK) und einer Fermentation mit gestörter (B) bzw. normaler (C) Säuerung: Fermentation nach 6 (B V und C V) bzw. nach 10,5 Stunden (B IX und C IX).

In der Starterkultur überwiegen RAPD-Typen mit 2 zusätzlichen Banden (Abb. 13). Auffällig ist die hohe Anzahl an Isolaten des Typs E2 (4 zusätzliche RAPD-Banden). Hierbei könnte es sich um eine gezielte Anreicherung der Starterkultur mit plasmidhaltigen Isolaten handeln, die einen phagenresistenten Phänotyp vermitteln. Während der Fermentation mit gestörtem Säuerungsverhalten nimmt die Anzahl der Isolate, die zwei und mehr zusätzliche Bande haben, ständig ab. Zuletzt beträgt der Anteil der Lactococcus-Stämme mit nur einer zusätzlichen Bande über 70 Prozent. Im Gegensatz dazu bleibt in der Fermentation mit kontinuierlicher Säuerung der Anteil an Isolaten mit zwei und mehr zusätzlichen Banden konstant hoch.

Obwohl dieses Ergebnis eine Korrelation zwischen der Anzahl der RAPD-Banden und der pro Isolat gefundenen Phagenresistenzgene vermuten lässt, konnte keinem RAPD-Typ ein eindeutiges Resistenzgenmuster zugeordnet werden. Wie aus Tab. 21 hervorgeht, steigt die Zahl der durchschnittlich pro Gruppe gefundenen Phagenresistenzgene mit der Anzahl der Plasmide kontinuierlich an. Betrachtet man allerdings die einzelnen RAPD-Typen getrennt, zeigen sich hohe Standardabweichungen bei den RAPD-Mustern H und J. Hier variiert die Anzahl der Resistenzgene zwischen 1 und 8 bzw. 1 und 10 pro Isolat. Hinter diesen beiden Typen verbirgt sich also ein großes Spektrum an DNA-Variabilität.

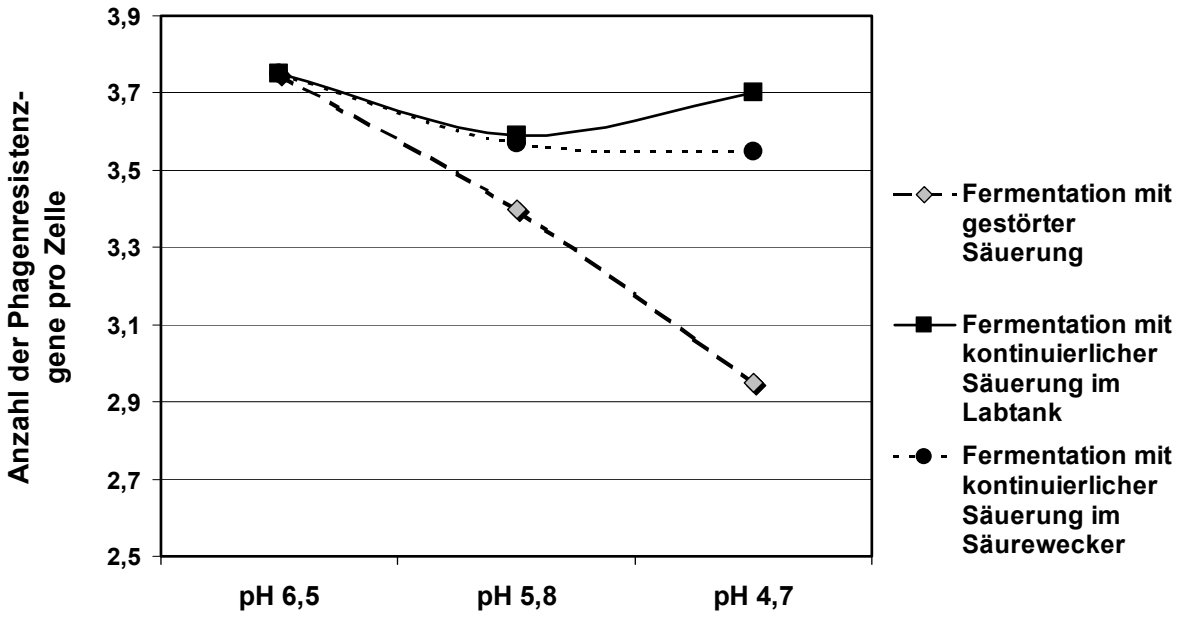


Abb. 14. Durchschnittliche Anzahl der Phagenresistenzgene in zwei Fermentationen mit normaler Säuerung und einer Fermentation mit gestörtem Säuerungsverlauf.

Für eine Abschätzung der durchschnittlich pro Isolat vorhandenen Anzahl an Phagenresistenzgenen wurde die Verteilung der RAPD-Typen in den untersuchten Fermentationszeitpunkten mit der pro RAPD-Typ ermittelten Zahl der Resistenzgene in Beziehung gesetzt. Wie Abb. 14 zeigt, nimmt die durchschnittliche Anzahl der Phagenresistenzgene während einer Fermentation mit gestörtem Säuerungsverlauf ständig ab. Im Gegensatz dazu enthalten alle Isolate der normal säuernden Fermentationen eine gleichbleibend hohe Anzahl von Phagenresistenzgenen. In der phagenfreien Säurewecker-Fermentation bleiben die Resistenzgene erhalten, obwohl kein Selektionsvorteil vorliegt. Unter dem Phagendruck sinkt die Anzahl der Resistenzgene in der Labtank-Fermentation mit ungestörter Säuerung anfänglich geringfügig. Durch den Selektionsvorteil der

phagenresistenten Stämme erreicht sie aber nach kurzer Zeit wieder das gleiche Resistenzgenniveau wie in der Starterkultur. Dieser Effekt wird durch die höhere Gesamtzellzahl, die in der normal säuernden Fermentation gemessen worden ist, noch verstärkt (Irps, 1998).

3.3. Citratstoffwechsel und Aromastoffe

3.3.1. Vergleich verschiedener Starterkulturen

Die Funktionsfähigkeit aller in 2.4.3 dargestellten Primerpaare zum Nachweis des Citratstoffwechsels und der Aromabildung konnte mit Hilfe von Referenzstämmen der DSMZ und der BAfM sichergestellt werden. Auf diese Weise wurden auch die PCR-Bedingungen für diese Primer etabliert.

Der Vergleich verschiedener Starterkulturen zeigte, dass die *Lactococcus*-Gene für den Citrat- und Lactoseimport und die Gene Acetolactat-Dehydrogenase, Pyruvat-Formiat-Lyase und L-Lactat-Dehydrogenase in allen Starterkulturen vorhanden sind (Tab. 22). Die *Leuconostoc*-Gene für die Lactose-Permease und die D-Lactat-Dehydrogenase konnten nur in den Starterkulturen Probat 8/0, Probat M4, Probat M7 und Probat 505 nachgewiesen werden. Das Gen für die Citrat-Permease der Spezies *Leuconostoc* war nur in der Starterkultur Probat 8/0 in ausreichender Menge vorhanden, um ein PCR-Produkt zu liefern. Die genetische Voraussetzung für das Enzym α-Acetolactat-Synthase, das die Aromastoffe Acetat, Formiat und Ethanol bildet, war nur in den Starterkulturen Probat 8/0, Probat M7 und Probat 505 nachweisbar.

Starterkultur / Gene	Probat 8/0	Probat 8/20	Probat 8/21	Probat M4	Probat M7	G3-Mix 6	Probat 505
Citrat-Permease Lactoc.	+	+	+	+	+	+	+
Citrat-Permease Leuc.	+	-	-	-	-	-	-
AL-Synthase	+	-	-	-	+	-	+
AL-Decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+
PF-Lyase	+	+	+	+	+	+	+
Lactose-Permease Lactoc.	+	+	+	+	+	+	+
Lactose-Permease Leuc.	+	-	-	+	+	-	+
L-LDH	+	+	+	+	+	+	+
D-LDH	+	-	-	+	+	-	+

Tab. 22. Gene für den Citratstoffwechsel und die Aromabildung in verschiedenen Starterkulturen.

3.3.2. Citratstoffwechselgene in der Starterkultur Probat 8/0 und während der Fermentation

Der prozentuale Vergleich der in der Starterkultur bzw. am Ende der Fermentationen vorhandenen Gene für den Citratstoffwechsel und die Aromabildung zeigte die gleiche Tendenz, die zuvor schon bei den Phagenresistenzgenen beobachtet worden war (Abb. 15). *Lactococcus*-Stämme, die nach der kontinuierlichen Säuerung aus dem Säurewecker oder Labtank isoliert worden waren, enthielten im Vergleich zur Starterkultur sehr viel häufiger die untersuchten Gene. Für die Gene L-Lactat-Dehydrogenase, Pyruvat-Formiat-Lyase und α-Acetolactat-Dehydrogenase betrug diese Steigerung 19, 27 bzw. 31%. Die α-Acetolactat-Synthase und die Citrat-Permease wurden in der untersuchten Starterkultur und ihren Fermentationen in so geringen Konzentrationen detektiert, dass keine Aussage über eine signifikante Steigerung gemacht werden konnte.

In der Fermentation mit gestörtem Säuerungsverlauf konnte ein im Vergleich zur Starterkultur geringerer Anteil an Fermentationsisolaten identifiziert werden, der die gesuchten Gene enthielt. Der Anteil der Gene Lactose-Permease und L-Lactat-Dehydrogenase, deren Produkte für die pH-Absenkung verantwortlich sind, nahm um 41 bzw. 11% ab.

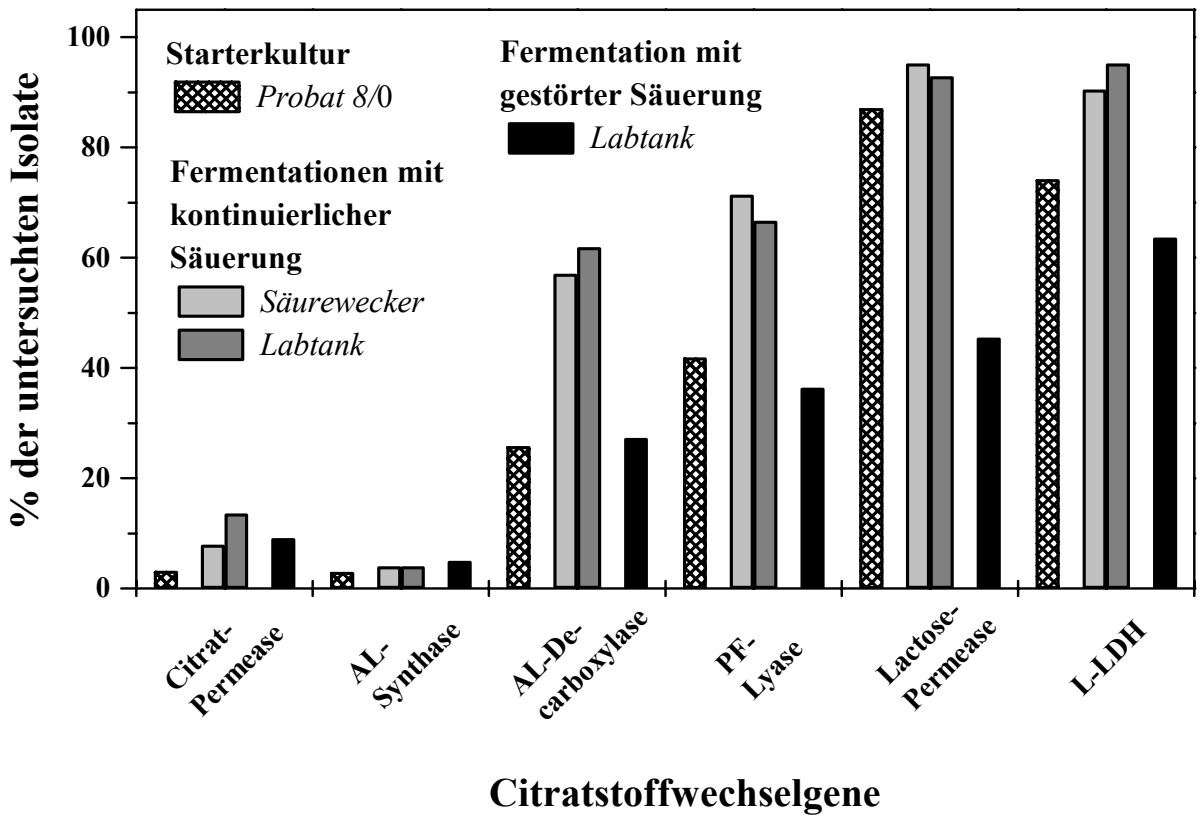


Abb. 15. Gene des Citratstoffwechsels und der Aromabildung in einer normal bzw. gestört säuernden Fermentation bei einem pH-Wert von 4,4.

3.4. Phagenspezies und Phagentiter in "Mixed Strain"-Kulturen

3.4.1. Nachweisgrenze der Phagen-DNA bei der PCR-Analyse

Zur schnellen Erfassung der Phagenproblematik während der Fermentationen wurde ein PCR-Test etabliert, der im Vergleich zum mehrtägigen Plaque-Test auch eine qualitative Bewertung der Phagenbelastung erlaubt. Der Einsatz der in 2.4.4 aufgeführten Primer ermöglichte es, die 3 für Milchfermentationen relevanten Spezies der *Lactococcus*-Phagen 936, C2 und P335 ohne weitere Aufarbeitung des Probenmaterials in der PCR-Reaktion nachzuweisen. Zusätzlich zum PCR-basierten Nachweis der 936-Spezies wurde eine für den Hausphagen P482 spezifische PCR entwickelt.

Die Nachweisgrenze von DNA in der PCR-Reaktion liegt theoretisch bei 1-10 Molekülen pro Reaktionsansatz. Um Aussagen über den tatsächlich nachweisbaren Phagentiter machen zu können, wurden Verdünnungsreihen des Phagenlysats von P482, das eine Konzentration von 3 x 10^{11} Pfu/ml aufwies, mit verschiedenen Primerpaaren untersucht.

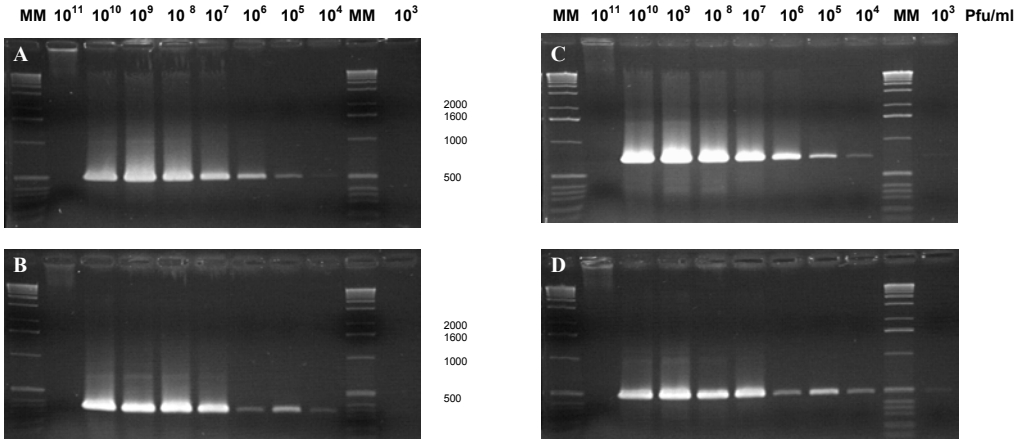


Abb. 16. PCR-Nachweis einer Verdünnungsreihe der P482-DNA mit den speziesspezifischen Primerpaaren P936all_X2out (A) bzw. P936all_X2nest (B) und den artspezifischen Primern P482c9_Xout (C) und P482c18_Xout (D).

Die Abb. 16 A und B zeigen den PCR-Nachweis einer Verdünnungsreihe der P482-DNA mit den Primerpaaren P936all_X2out bzw. P936all_X2nest, die alle Phagen der 936-Spezies erfassen. In Abb. 16 C und D sind PCR-Reaktionen mit den für P482 spezifischen Primern dargestellt. Daraus war ersichtlich, dass weniger als 100 Phagen ausreichten, um unabhängig vom verwendeten Primerpaar ein positives PCR-Signal zu erhalten. Im Gegensatz zum Plaque-Test wurden durch diese Methode auch freie Phagen-DNA bzw. nicht infektiöse Phagen erfaßt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungseffekts der PCR ist mit dieser Methode ein Phagennachweis ab einer Konzentration von 10^3 bis 10^4 Pfu/ml möglich.

3.4.2. Phagentiterbestimmung durch PCR im Vergleich mit der Bestimmung durch Plaque-Tests

Zur Phagenanalyse wurden Molkerei-Proben herangezogen bei denen der Phagentiter von der BAfM wie folgt bestimmt worden war.

Probe 1	SW 24.01.2000	< 10 Pfu/ml
Probe 2	SW 25.01.2000	1,2 x 10^8 Pfu/ml
Probe 3	Viskubator mit Molke	1,2 x 10^7 Pfu/ml
Probe 4	Labtanksimulation	3,3 x 10^7 Pfu/ml

Wie Abb. 17 A zeigt, lag der Phagentiter der 936-Spezies in Probe 1 für die PCR-basierende Methode wie beim Phagen-Plaque-Test unter der Nachweisgrenze (Spuren 2 und 3). Mit spezifischen Primern für die 936 Spezies war es jedoch möglich Phagen in den Proben 2-4 nachzuweisen, und zwar nicht nur wie hier gezeigt in den Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100, sondern bis zu einer Verdünnung von 1:1000 bzw. 1:10000. Unter Berücksichtigung der im Experiment ermittelten Nachweisgrenze, entspricht dieses Ergebnis einem Phagentiter von 10^7 bzw. 10^8 Pfu/ml in der ursprünglichen Probe.

In weiteren Tests wurden die Proben auf Phagen der Spezies P335 und C2 untersucht. Während die PCR mit C2-spezifischen Primern bei keiner der Proben eine Bande ergab (Daten nicht dargestellt), zeigte sich bei allen untersuchten Proben die P335-spezifische 682bp-Bande (Abb. 17 B). Zur sicheren Identifizierung dieser Spezies wurde diese Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten, die DNA eluiert und sequenziert. Der Vergleich mit in der Datenbank hinterlegten DNA-Sequenzen ergab 98 bzw. 97% Sequenzidentität zu den beiden anderen sequenzierten Phagen der P335-Spezies Tuc2009 und r1t.

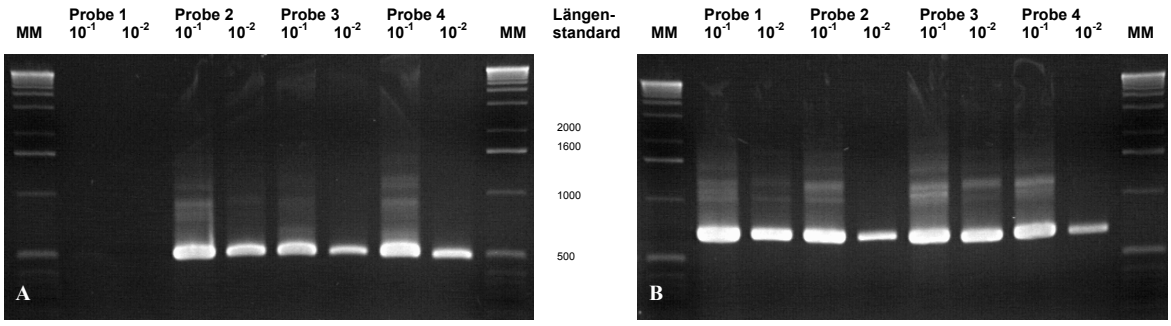


Abb. 17. PCR-basierende Analyse verschiedener Säureweckerproben mit den 936-spezifischen Primern P936all_X2out (A) bzw. mit P335-spezifischen Primern (B).

Ein Vergleich der PCR-Ergebnisse der Säureweckerprobe vom 24.01.2000 (Probe1) zeigte in Abb. 17 A keine Bande. In der PCR-Reaktion mit den P335-spezifischen Primern ist ein starkes Signal zu erkennen (Abb. 17 B), das einen hohen Phagentiter voraussetzt. Da der Phagentiter dieser Probe im Plaque-Test mit weniger als 10 Pfu/ml angegeben wurde, muß davon ausgegangen werden, dass die Phagen entweder nicht in infektiösem Zustand vorgelegen haben oder, dass die *Lactococcus*-Stämme mit denen der Phagentiter bestimmt wurde, sensitiv für Phagen der 936-Spezies waren, von Phagen der P335-Spezies aber nicht infiziert werden konnten.

3.4.3. Phagenanalyse der Starterkulturen

Aufgrund des positiven Nachweises von Phagen der 936- und der P335-Spezies in den Fermentationsproben, wurde untersucht, ob diese durch die Starterkultur oder durch die Handhabung im Betrieb in die Fermentation gelangten. Zwei Aliquots der Starterkultur Probat 8/0 aus dem Jahr 1998, 1 Aliquot von 1999 und die Starterkulturen Probat 8/20 und 8/21 wurden einer PCR-analytischen Phagenidentifizierung unterzogen.

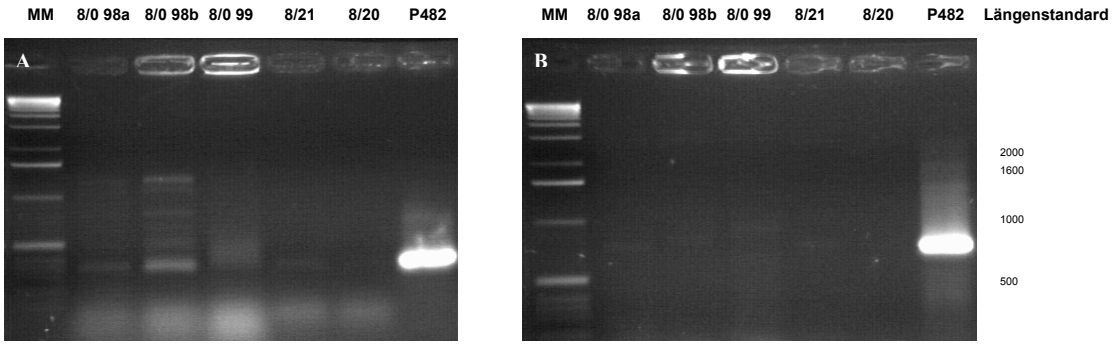


Abb. 18. PCR mit den 936-speziesspezifischen Primern P936all_X2nest (A) bzw. mit den für den Hausphagen P482 spezifischen Primern P482c9_Xout (B).

Wie Abb. 18 zeigt, konnten in keiner der Starterkulturen Phagen der 936-Spezies nachgewiesen werden. Lediglich in den Positivkontrollen mit dem Phagen P482 war eine Bande zu erkennen. Die PCR mit Primern für die Spezies C2 blieb ebenfalls ohne Befund.
Anders verhielt es sich mit den in der Fermentation nachgewiesenen Phagen der P335-Spezies. Aus Abb. 19 A geht hervor, dass bei der PCR-Reaktion der Aliquots von Probat 8/0 und in Probat 8/21 die für die P335-Spezies spezifische 682 bp-Bande auftritt. Um auszuschließen, dass diese Primer auch mit DNA der Phagen der 936-Spezies ein positives Signal geben, wurde die DNA des Hausphagen P482 als Negativkontrolle mitgeführt.

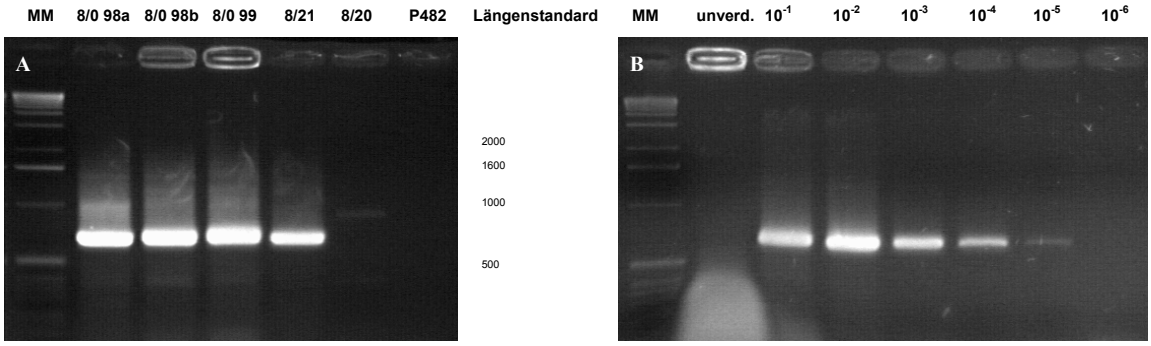


Abb. 19. Phagenanalyse der Starterkulturen mit P335-speziesspezifischen Primern (A) und Konzentrationsbestimmung am Beispiel von Probat 8/0 (B).

In Abb. 19 B ist die PCR mit einer Verdünnungsreihe von Probat 8/0 dargestellt. Bis zu einer Verdünnung von $1:10^5$ waren Phagen nachweisbar. Unter Berücksichtigung der in 3.4.1 ermittelten Nachweisgrenze, ergibt sich ein Phagentiter von 10^9 pro ml. In der Starterkultur Probat 8/21 war die Phagenbelastung ebenso hoch. Die Phagen der P335-Spezies gelangten also durch die Starterkulturen Probat 8/0 und Probat 8/21 in die Fermentation.

3.4.4. Phagenbelastung in Fermentationsproben

Die Phagentiter der Fermentationsproben waren direkt nach der Probennahme durch die BAfM bestimmt worden. Dabei wurde die Spezieszugehörigkeit der in den Proben enthaltenen Phagen allerdings nicht berücksichtigt. Durch PCR-Analyse der Proben, die während einer Labtank-Fermentation mit normaler Säuerung bzw. einer Fehlfermentation genommen worden waren, konnten zu jedem Probennahmezeitpunkt Phagen der Spezies 936 nachgewiesen werden. Da die Intensität der PCR-Bande bei den ersten Proben der Fermentationen schwächer war als die darauffolgenden, wurde durch eine Verdünnungsreihe ein Phagentiter von 10^4 Pfu/ml ermittelt. Beim nächsten Probennahmezeitpunkt nach 4 Stunden lag der Phagentiter bereits bei 10^8-10^9 Pfu/ml. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen der BAfM überein. In den Säureweckerproben konnten weder mit zwei 936-spezifischen noch mit zwei P482-spezifischen Primerpaaren Phagen der 936-Spezies identifiziert werden (P936all_X2nest, M936_X1, P482c18_Xout und P482c9_Xout).

Die PCR-Analyse mit Primern, die die Phagenspezies P335 erkennen, ergab für alle Säurewecker- und Labtank-Proben ein positives Ergebnis. Der ermittelte Phagentiter lag mit 10^4-10^5 Phagen/ml aber an der unteren Grenze der Nachweisbarkeit und nahm auch während der Fermentation nicht zu.

3.5. Sequenzanalyse des Phagen P482

3.5.1. Nukleotidsequenz des Phagen P482

Die Sequenz des von der BAfM isolierten Phagen P482 wurde zu 59% durch die Shotgun-Methode ermittelt. Dafür wurden 47 Klone mit genomischer DNA, die mit Sau3A bzw. Taq I geschnitten, in die Vektoren pZero bzw. pBluescript kloniert und in *E. coli* transformiert worden war, sequenziert. Die Sequenzen wurden in 15 Contigs mit z.T. 4-6 kb Länge zusammengefaßt. Ein Vergleich dieser insgesamt 17,4 kb langen Sequenz mit den Datenbanken ergab eine hohe Ähnlichkeit mit den beiden anderen Phagen der 936-Spezies für die komplette Sequenzen vorlagen und ermöglichte eine grobe Anordnung der Contigs. Die zwischen den Contigs liegenden DNA-Sequenzen wurden durch "Primer Walking" auf der Phagen-DNA bestimmt.

Die Sequenz des linearen Genoms von Phage P482 umfaßt 30945 bp doppelsträngige DNA und wird von der 12 bp langen *cos*-Site 5'-GCACAAAGGACT-3' eingerahmt. Die Sequenz ist bei allen 8 an dieser Stelle sequenzierten Phagen der 936-Spezies identisch. (Chandry et al., 1994b). Die durchschnittliche Coverage für die Sequenzierung des gesamten Phagengenoms betrugt 3,8. Jede Basenposition wurde mindestens 2-fach sequenziert. Der A+T-Gehalt der Phagensequenz lag mit 65,2% etwas höher als der des zu den Low-GC Gram-positiven Mikroorganismen zählenden Wirtsbakteriums *L. lactis*, das zu 62,7% aus Adenin und Thymin besteht (Kilpper-Bälz et al., 1982). Er entsprach damit dem A+T-Gehalt des *Lactococcus*-Phagen sk1, der mit 65,5% bestimmt worden war (Chandry et al., 1997).

Beim derzeitigen Stand des Sequenzierprojektes gibt es 3 Bereiche mit insgesamt 43 Ambiguities, die im Moment nicht aufgelöst werden können. Bezogen auf das gesamte Phagengenom entspricht das einem Anteil von 0,1%.

Bereich	***Anzahl der Ambig.***	***vorliegende Sequenzierungen***	***ORF***	***Grad der Konserviertheit***
5750-5919	16	3-fach (3 Klone, 2 ident. 1 anders)	ORF 7 u. ORF 8	sehr konserviert, d.h. sk1, bIL170 und bIL41 ident.
16719-16963	13	5-fach (3 PCR-Fragm. mit Ambig, 2 ident. Klone ohne Ambig.)	ORF 20	variabler Bereich innerhalb eines konservierten ORFs
18932-19441	14	2-fach (2 PCR-Fragm.)	ORF 25 u. ORF 26	sehr konserviert, d.h. sk1 und bIL170 ident.

Bei den beiden konservierten Ambiguity-Bereichen beschränkt sich der Basenaustausch meist auf die 3. Basenposition. 23 der 30 Basenabweichungen führen zu stummen Mutationen. Im Bereich zwischen 16719 bis 16963 bp weichen die beiden anderen vollständigen Sequenzen der 936-Spezies voneinander ab. Meist handelt es sich bei den Ambiguities in P482 um die beiden Varianten, die aus sk1 und bIL170 bekannt sind. In Position 17093 liegt z.B. bei sk1 ein Adenin, in bIL170 ein Thymin und in P482 ein W vor, das sowohl für A als auch für T stehen kann.

In zwei unabhängig sequenzierten Klonen (Plasmidlück600 und P12-45.11nest2) lagen Sequenzabschnitte, die aus den konservierten Bereichen vor bzw. nach ORF 11 stammen, hintereinander. Durch PCR-Amplifikation der DNA aus dem Phagenlysat konnte eine 28910 bp lange Variante des Phagen P482 identifiziert werden in der die Basen 6808 bis 8845 fehlen. Das entspricht exakt dem ORF 11. Um das gleichzeitige Vorhandensein beider Varianten im Phagenlysat zu bestätigen, wurden die im Insert liegenden Vorwärtsprimer P482_Ins1 und P482_Ins2 in Kombination mit dem hinter dem Insert liegenden Rückwärtsprimer P482_R in der PCR eingesetzt. Durch das Auftreten der beiden 1400 bzw. 2174 bp langen Banden konnte die vollständige Sequenz des Phagen P482 eindeutig bestätigt werden. Die PCR-Amplifikation eines 982 bp Fragmentes mit dem vor dem Insert liegenden Primer P482_V und dem Primer P482_R lieferte den eindeutigen Beweis, dass auch die 28910 bp lange Variante im Phagenlysat vorhanden war.

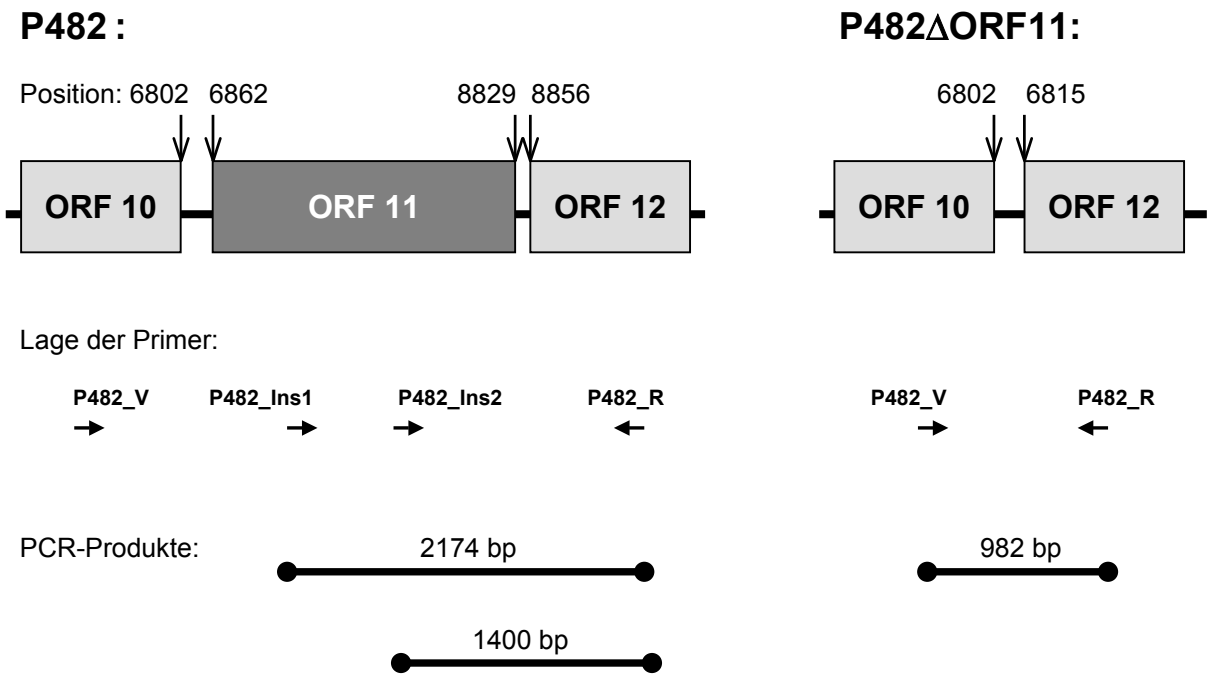


Abb. 20. Nachweis von P482 und P482ΔORF11 durch PCR-Produkte.

3.5.2. Genetische Elemente des Phagen P482

3.5.2.1 Open Reading Frames

Die Analyse der Phagensequenz zeigte 55 Open Reading Frames (ORF) (Tab. 23), die den folgenden Kriterien für die Identifizierung der ORFs entsprachen: (1) der ORF umfaßte mindestens 30 Codons, (2) er begann mit einem der für *L. lactis* ermittelten Startcodons: AUG, GUG, UUG oder AUA (Shearman et al., 1994; van de Guchte et al., 1992), (3) jedem ORF ging eine Ribosomenbindungsstelle (RBS) voraus, die komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA (3'-UCUUUCCUCCA-5') war (Ludwig et al., 1985), bzw. es bestand die Möglichkeit für translationale Kopplung. Die 55 ORFs waren modular angeordnet und konnten analog der sk1-Sequenz in frühe, mittlere und späte Regionen unterteilt werden. Zur frühen Region gehören 29 ORFs (ORF 23-51), die von rechts nach links gelesen werden. Die mittlere und späte Region des Phagen P482 enthält 4 (ORF 52-55) bzw. 22 ORFs (ORF 1-22), deren Leseraster von links nach rechts verläuft.

Meist schließen die ORFs direkt aneinander an oder überlappen um einige Basen. Das Phagengenom enthält 11 intergenische Regionen (IGR), die größer als 30 bp sind. Drei dieser IGR befinden sich zwischen der frühen, späten bzw. mittleren Region der Phagengene (ORF 22 - ORF 23 279 bp, ORF51 - ORF 52 150 bp, ORF 55 - ORF 1 665+262 bp). Das ist ein Hinweis für die Synthese polycistronischer mRNAs, die für die Translation der zu den einzelnen Regionen gehörenden Gene gebildet werden. Weitere IGRs befinden sich am Anfang und/oder am Ende der P482-spezifischen Proteine ORF 13, ORF 35, ORF 48 bzw. von ORFs, die nur bei bIL170 oder sk1 vorkommen (ORF 11, ORF 37, ORF 47 und ORF 49). Bei den IGR zwischen ORF 28 und 29 bzw. ORF 43 und 44 liegt der umgekehrte Fall, nämlich eine Deletion im Phagen P482, vor.

Das Molekulargewicht der Phagenproteine schwankt zwischen 3,2 kDa im ORF 34 und 70,2 kDa im ORF 11. Die isoelektrischen Punkte der vorhergesagten Proteine variieren zwischen 4,0 (ORF 50) und 10,2 (ORF 27). Der durchschnittliche Anteil der Basen Guanin und Cytosin an der gesamten Nukleotidsequenz der ORFs liegt bei 33,9% und damit 1% niedriger als der G+C-Gehalt der Gesamtsequenz. Das G+C-Verhältnis der einzelnen ORFs unterliegt einer erheblichen Schwankungsbreite zwischen 22,0 und 40,2%. In Tab. 23 sind darüber hinaus die durch Datenbankabfrage ermittelten Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Phagen bzw. deren Proteinen und die daraus abgeleitete mögliche Funktion der P482-Proteine dargestellt. Der Sequenzvergleich ermittelt sehr häufig einen der beiden anderen *Lactococcus*-Phagen der 936-Spezies, von dem die vollständige Sequenz bekannt ist, als nächsten Verwandten von

P482. Die Ähnlichkeiten auf Proteinebene liegen meist zwischen 95 und 99%. Etwas geringere Ähnlichkeiten werden für *Lactococcus*-Phagen der beiden anderen Spezies c2 und P335 gefunden. Als weitläufigere Verwandte ermittelt der Computer Vertreter *der Streptococcus thermophilus*-Phagen. Der phylogenetische Baum weist diese Bakterienspezies ebenfalls als nächste Verwandte der Spezies *Lactococcus* aus. Die Analyse der Codon Usage der einzelnen ORFs ergab keine signifikanten Abweichungen zu der in *L. lactis* (Chopin, 1993) verwendeten Häufigkeit der einzelnen Codons.

ORF	***Start-Stop***	***Länge [AS]***	***MW [kDa]***	***pI***	***%GC***	***Inter-genic Dist.***	***Ähnlich-keiten***	***% Iden-tität***	***Mögliche Funktion***
Späte Region									
1	+ 262-783	174	19,9	5,3	37,9	262	ϕvi (ORF1), P008 (ORF1), bIL170 (L1)	87	Terminase - kleine Untereinheit
							sk1 (ORF 1), 712 (L1), bIL41 (L1)	86	"
2	+ 787-2406	540	63,0	5,8	36,3	3	sk1 (ORF 2), P008 (ORF 2)	95	Terminase - große Untereinh.
							bIL170 (L2)	93	"
							bIL41 (L2)	93	"
3	+ 2399-2680	94	11,2	9,1	39,4	- 8	bIL41 (L3)	98	Strukturprotein
							bIL170 (L3)	97	"
							sk1 (ORF 3)	96	"
4	+ 2696-3829	378	43,3	5,0	32,9	15	bIL170 (L4)	98	Strukturprotein
							sk1 (ORF 4)	94	Unbekannt
							bIL41 (L4)	92	"
5	+ 3813-4346	178	20,0	4,6	36,0	- 17	bIL170 (L5), sk1 (ORF 5)	97	Unbekannt
							bIL41 (L5)	96	"
6	+ 4342-5520	393	44,5	6,0	35,4	- 4	sk1 (ORF 6)	98	Strukturprotein
							bIL170 (L6/7)	97	"
							bIL41 (L6/7)	95	"
7	+ 5544-5804	87	10,0	6,2	31,0	23	bIL170 (L8)	100	Strukturprotein
							sk1 (ORF 7)	99	"
							bIL41 (L8)	97	"
8	+ 5807-6118	104	10,9	8,0	35,8	2	bIL170 (L9), sk1 (ORF 8)	98	Strukturprotein
									"
							bIL41 (L9)	97	

9	+ 6111-6446	112	12,7	4,1	35,4	- 7	bIL170 (L10)	99	Unbekannt
							bIL41 (L10)	98	"
							sk1 (ORF 9)	51	"
10	+ 6440-6802	121	13,7	10,1	36,2	- 6	sk1 (ORF 10)	99	Unbekannt
							bIL170 (L11)	96	"
							bIL41 (L11)	69	"
11	+ 6862-8829	656	70,2	5,0	36,0	59	bIL170 (L12)	79	Unbekannt
							Tuc2009 (ORF 56)	73	"
							r1t (ORF 47)	71	"
							TP901-1 (ORF 51)	70	Kragenprotein
							bIL41 (L12)	70	"
							c2 (L15)	41	kleines Struktur-protein
							Sfi21	12	Protein f. Wirts-spezifität
12	+ 8856-9758	301	32,3	5,2	39,1	26	Q7	93	Hauptcapsid-protein
							bIL170 (L13)	88	"
							sk1 (ORF 11)	88	"
13	+ 9847-10443	199	22,5	5,7	33,2	88	c2 (L15)	28	kleines Struktur-protein
							Sfi19 (ORF 1291), Sfi21 (ORF1276)	28	Protein f. Wirts-spezifität
							Sfi11 (P1)	23	“
							BK5-T (ORF 1904)	16	“
14	+ 10468-10740	91	10,5	5,1	33,7	24	bIL170 (L14)	97	Strukturprotein
							sk1 (ORF 12)	96	"
							F4-1	96	"
15	+ 10763-11272	170	19,9	4,8	32,2	22	bIL170 (L15)	97	Unbekannt
							sk1 (ORF 13)	96	"
16	+ 11275-14022	916	96,7	9,3	38,4	2	sk1 (ORF 14), bIL170 (L16)	77	Struktur-protein
							F4-1 (Teil)	85	
							Sfi19 (ORF1626)	18	Tail-Komponente 1626
							7201 (ORF33)	15	Unbekannt
							bIL67 (ORF31)	13	kleines Schwanzprotein

17	+ 14025-14918	298	34,5	5,2	33,4	2	bIL170 (L17) sk1 (ORF 15)	92 90	Unknown "
18	+ 14921-16045	375	42,6	5,1	34,0	2	sk1 (ORF 16) bIL170 (L18)	94 93	Unknown "
19	+ 16023-16328	102	11,9	9,3	33,7	- 22	sk1 (ORF 17) bIL170 (L19)	95 94	Unbekannt "
20	+ 16321-17112	264	27,4	7,8	36,3	- 7	sk1 (ORF 18) bIL170 (L20)	82 80	Unbekannt Basisplatten-protein
21	+ 17137-17487	117	13,4	7,9	34,5	23	sk1 (ORF 19), bIL170 (L21)	93	Holin
22	+ 17487-18188	234	26,0	6,1	40,2	- 1	bIL170 (L22) sk1 (ORF 20)	82 80	Lysin "
Frühe Region									
23	- 18469-18732	88	101,2	4,7	30,4	279	sk1 (ORF 21) bIL170 (E33)	95 94	Unbekannt "
24	- 18729-18908	59	7,0	9,7	30,0	- 3	bIL170 (E32) sk1 (ORF 22) Phage PZA (ORF 9) phi 29 (P9)	89 84 25 25	Unbekannt " Tailprotein “
25	- 18908-19252	115	12,2	6,8	35,3	- 1	sk1 (ORF 23) bIL170 (E31)	77 64	Unbekannt "
26	- 19255-19419	55	6,9	6,6	34,8	- 3	bIL170 (E30) sk1 (ORF 24)	96 27	Unbekannt "
27	- 19422-19595	58	6,7	10,2	35,1	2	bIL170 (E29)	85	Unbekannt
28	- 19591-19842	84	9,5	6,2	34,3	- 4	sk1 (ORF 25) bIL170 (E28)	89 71	Unbekannt "
29	- 19919-20224	102	12,5	4,8	36,4	75	sk1 (ORF 26) bIL170 (E24)	84 83	Unbekannt "
30	- 20227-20343	39	4,2	8,4	35,2	3	sk1 (ORF 27) bIL170 (E23)	89 84	Unbekannt "
31	- 20352-21044 91%	231	26,4	4,6	36,1	8	r1t (ORF 22) phi31.1 (ORF 230) Str. pyogenes MGAS8232	96 94 36	Unbekannt “ "
32	- 21070-21975	302	35,0	9,1	33,7	25	Str. pyogenes MGAS8232	33	Unbekannt
33	- 21971-22216	82	9,9	6,7	35,0	- 4	sk1 (ORF 30) bIL170 (E21)	88 32	Unbekannt "

34	- 22220-22309	30	3,2	9,8	28,0	- 4	bIL170 (E19)	86	Unbekannt
35	- 22305-22475	57	6,7	4,4	33,3	- 4	-	-	Unbekannt
36	- 22513-22812	100	11,4	5,5	30,3	37	sk1 (ORF 31)	67	Unbekannt
							bIL170 (E17)	62	"
37	- 22812-23246	145	17,0	9,8	27,1	- 1	bIL170 (E20) (E37)	58 41	Endodeoxy-ribonuclease
							r1t (ORF 41)	41	Unbekannt
							phi-E (ORF 1)	31	Endodeoxy-ribonuclease
							SP82 (ORF 2)	29	“
38	- 23322-23831	170	20,2	9,5	36,9	75	sk1 (ORF 32), bIL170 (E15)	92	Unbekannt
							bIL67 (ORF 16)	31	“
							C2 (E11)	31	“
39	- 23831-24043	71	8,3	4,5	37,6	- 1	sk1 (ORF 33), bIL170 (E14)	98	Unbekannt
40	- 24059-24415	119	13,0	5,1	38,1	15	bIL170 (E13)	94	Unbekannt
							sk1 (ORF 34)	93	"
							c2 (E16)	35	“
							bIL67 (ORF 14)	33	“
41	- 24422-24973	184	21,3	6,1	36,8	6	sk1 (ORF 35)	54	Unbekannt
							bIL170 (E12)	49	"
							TP901-1 (ORF11)	39	“
							Tuc2009 (ORF14)	39	Putative Topoisomerase I
42	- 24945-25343	133	15,9	9,7	36,1	- 27	sk1 (ORF 38)	76	Unbekannt
							bIL170 (E10)	73	"
43	- 25183-25470	96	11,7	9,9	34,0	- 159	sk1 (ORF 39)	94	Unbekannt
							bIL170 (E9)	91	"
							C2 (E13)	32	“
							bIL67 (ORF 10)	36	“
44	- 25520-25789	90	10,6	9,0	32,2	49	sk1 (ORF 41)	94	Unbekannt
							bIL170 (E7)	85	"
45	- 25776-25895	40	4,9	5,0	26,0	- 12	sk1 (ORF 42)	75	Unbekannt
46	- 25891-26835	315	35,5	6,0	37,4	3	bIL170 (E5)	95	DNA-Polymerase subunit
							sk1 (ORF43)	90	"
							bIL67 (ORF3)	41	"
							C2 (E5)	41	"

47	- 26956-27303	116	13,5	9,8	29,1	120	bIL170 (E20) (E37)	38 37	Endodeoxy-ribonuclease
48	- 27398-27640	81	9,6	9,4	31,7	95	-	-	-
49	- 28115-28231	39	4,5	4,7	27,5	474	bIL170 (E2)	100	Unbekannt
50	- 28648-29061	138	16,2	9,9	22,0	416	bIL170 (E20) (E37)	45 32	Endodeoxy-ribonuclease
51	- 29061-29225	62	7,6	10,0	32,8	- 1	sk1 (ORF 50)	91	Unbekannt
							bIL170 (E1)	87	"
Mittlere Region									
52	+ 29376-29501	42	4,8	4,0	32,6	150	sk1 (ORF 51)	95	Unbekannt
							bIL170 (M1)	92	"
							bIL66 (ORF1)	90	"
							712 (M1)	88	"
53	+ 29509-29637	43	5,1	4,9	27,3	7	712 (M2)	97	Unbekannt
							bIL170 (M2)	95	"
							sk1 (ORF52)	93	"
							bIL66 (ORF2)	92	"
54	+ 29637-30116	160	18,0	5,9	36,0	- 1	bIL66 (ORF3)	96	Unbekannt
							712 (M3)	96	"
							bIL170 (M3)	94	Holliday-Junction Endonuklease
							sk1 (ORF 53)	94	"
							C2 (L2)	46	Holin
							bIL67 (ORF 23)	40	Unbekannt
55	+ 30116-30280	55	6,2	6,5	32,1	- 1	sk1 (ORF 54)	96	Unbekannt
							bIL170 (M4)	94	"
							712 (M4)	87	"
							bIL66 (ORF4)	78	"

Tab. 23. "Open Reading Frames" des Phagen P482.

3.5.2.2 Promotoren

Zur Identifizierung von Promotorstrukturen wurden die -10 und -35 Sequenz, die von *L. lactis* σ^{39} erkannt wird (TTGACA - 17 bp- TATAAT) herangezogen. Die RBS wurde aufgrund der zur 16S rDNA komplementären Nukleotidsequenz ermittelt. In P482 konnten 7 Promotoren identifiziert werden (Tab. 24 und Abb. 25). Aus dem Alignment mit anderen *Lactococcus*-Phagen geht hervor, dass diese Strukturen in Bereichen mit hohen Homologien zu sk1 und

bIL170 liegen ($P_{E28} \cong P_{E6}$ aus sk1, $P_{E37} \cong P_{E3}$ aus sk1, $P_{E43} \cong P_{E5}$ aus sk1, $P_{E47} \cong P_{E2}$ aus sk1, $P_{E51} \cong P_{E7}$ aus sk1, $P_{E52} \cong P_M$ aus sk1). Am Beispiel von sk1 konnte die Funktionsweise der Promotoren P_{E1}, P_{E7} und P_M im Experiment bestätigt werden (Chandry et al., 1997).

P_{E28} (19899-19837 bp):

TGC**TTGACA**GTGTGAACTTTTTTTGA**TAATAT**TGTTTTATAG*AAAGGAG*ATTAAACA**ATG**GCA

P_{E35} (22533-22470 bp):

TGC**TTGACA**ATTAAAAACAAATAGCT**TATAAT**TGTGTATAGAAT*AAAGGAG*AACAACA**ATG**GAA

P_{E37} (23300-23241 bp):

GGC**TTGACA**GCTTAGAGTTTTTT**TATTAT**ACTTAATACATCG*AG*TT*AAAG*AAAG**ATG**AAA

P_{E43} (25529-25465 bp):

TAC**TTTACA**ATAGTAAATAATTTTCA**TATAAT**AGTATATATAGAAAT*AAAGGAG*AACTT**ATG**ATA

P_{E47} (27351-27296 bp):

GGC**TTGACT**TTTCAAGTCTTTTTTCT**TATTAT**ATACT*AAAGGAG*AAATAA**ATG**GGA

P_{E51} (29295-29220 bp):

TGA**TTGACT**TTGTAGGTATTTTGTGT**TATAAT**CTTTAT*AGGAGGT*AACA**ATG**GCT

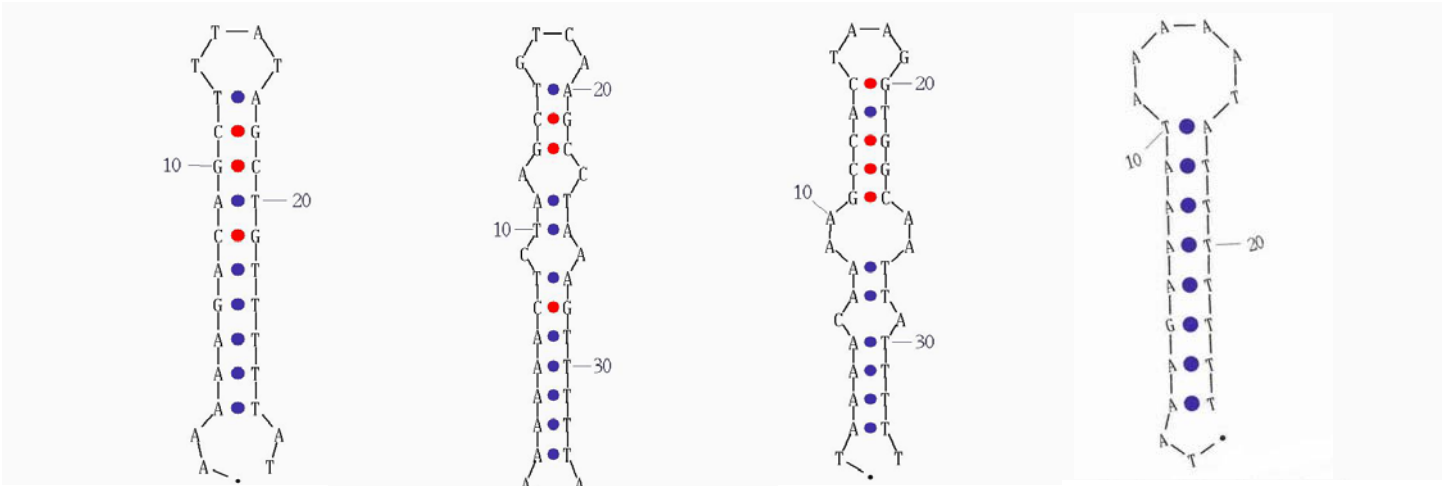
P_{M52} (26412-26476 bp):

ACT**CCAAAA**AGTGGATATGC**TATAAT**AGATACAGAAGTTA*A*GA*GAGG*AAAGCAA**ATG**ACA

Tab. 24. Promotorstrukturen in P482.
Die -10 und -35-Region ist unterstrichen und dick gedruckt, die RBS ist kursiv gedruckt und ebenfalls unterstrichen und der Transkriptionsstart ist dick gedruckt und eingerahmt dargestellt.

3.5.2.3 Terminatoren

Die Bestimmung von möglichen Terminator-Strukturen erfolgte mit dem Programm "Terminator" des Software-Pakets HUSAR. Zwischen der Region der späten und frühen Gene befindet sich Terminator 1 (18201 - 18228 bp), der einen sehr stabilen "stem"-Bereich von 10 bp und einem ΔG-Wert von -6,4 kcal/mol bildet (Abb. 21). Terminator 2 stoppt die Transkription nach ORF 38 (23276 - 23309 bp). Der 3. Terminator befindet sich zwischen ORF 49 und ORF 50 und beendet die von Promotor P_{E51} ausgehende Transkription (28610 - 28644 bp). Das Transkript der mittleren Phagengene und der tRNAs wird von Terminator 4 begrenzt (30865 - 30888 bp).



Terminator 1
ΔG = -6.4 kcal/mol

Terminator 2
ΔG = -5.0 kcal/mol

Terminator 3
ΔG = -6,2 kcal/mol

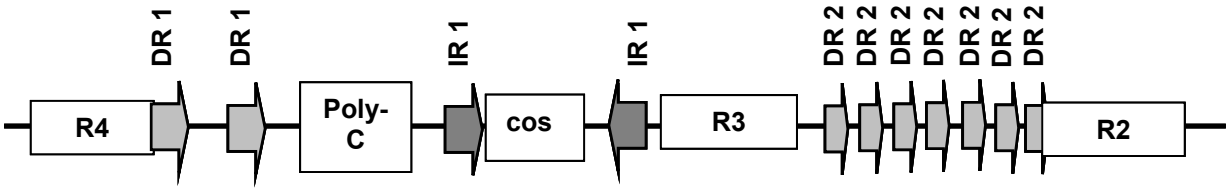
Terminator 4
ΔG = -4,6 kcal/mol

Abb. 21. Terminator-Strukturen des Phagen P482.

3.5.2.4 Signalstrukturen

Direkt Repeats (DR) wurden mit dem Programm Repeat des Software-Pakets Husar identifiziert. Vor dem ersten ORF der späten Gene wiederholt sich die 9 bp lange Sequenz (5'-TAATCTTGC-3') 4 mal (71-117 bp). Bei der fünften Wiederholung bleibt das DR unvollständig und endet mit 5'-TAATCTT-3'. Diese DR sind Teil einer Signalstruktur die Sensitivität oder Resistenz gegen das Phagenresistenzgen *abiF* vermittelt und sich über die ganze *cos*-Region ausdehnt (Rince et al., 2000). Nach dem letzten ORF der mittleren Phagengene im Bereich der *cos*-Site wurden bei P482 3 7 bp lange DR identifiziert. Ein Vergleich der *cos*-Regionen der Phagen P482, sk1 und 712 (Abb. 22) zeigt bei P482 erhebliche Abweichungen von den für sk1 und 712 ermittelten, resistenz-gebenden Signalstrukturen. Neben den beiden fehlenden Terminase-Bindungsstellen R2 und R4 weicht auch die Anordnung der die *cos*-Site flankierenden IR in P482 von der aus sk1 und 712 bekannten Signalstruktur ab. Der *cos*-Site umspannende Hairpin kann in P482 nicht ausgebildet werden.

sk1 und 712



P482

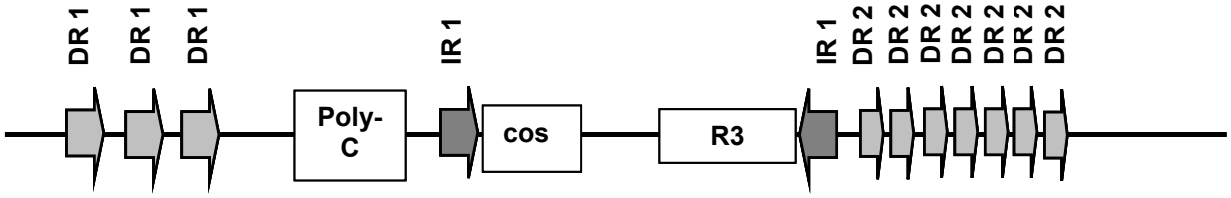


Abb. 22. Organisation der *cos*-Region bei den *Lactococcus*-Phagen P482, sk1 und 712.

Die IGR zwischen der späten und frühen Region der Phagengene enthält zwischen den Basen 18187 und 18493 insgesamt 8 verschiedene 7 bis 9 bp lange DR, die zum Teil ineinander geschachtelt vorkommen (Abb. 23) (DR 1 5'-TAAAAAA-3', DR 2 5'-CTTTATA-3', DR 3 5'-TTTATATTT-3', DR 4 5'-TTCTTCA-3', DR 5 5'-TGCTTTCTC-3', DR 6 5'-TTGCTTT-3', DR 7 5'-GCCTTTT-3', DR 8 5'-TGCTTCAAT-3').

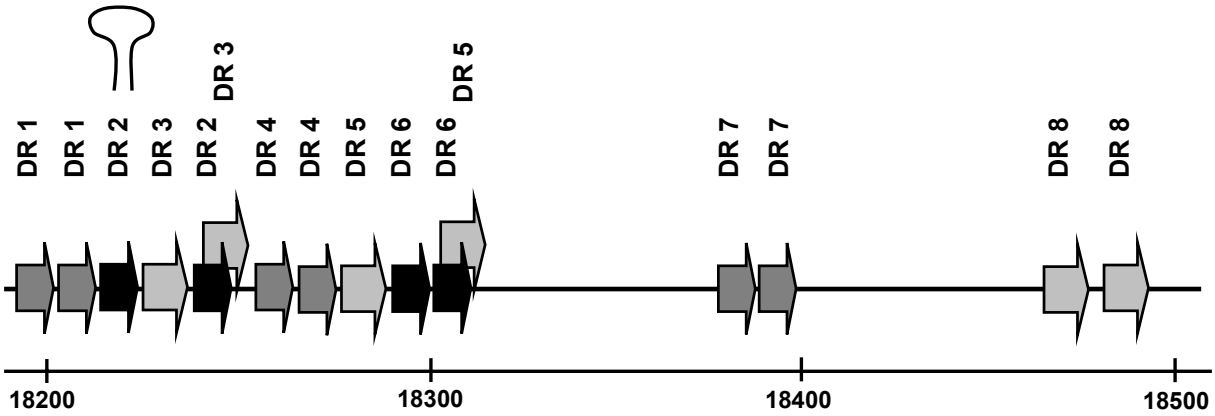


Abb. 23. "Direct Repeats" und Terminator-Struktur in der IGR zwischen dem späten und frühen Transkript der Phagengene.

Im Gegensatz zur Häufung der DR in den IGRs zwischen den späten und frühen Phagengenen bzw. den mittleren und späten Genen treten in der Region zwischen den frühen und mittleren Genen nur 2 kurze 7 bp lange DR auf, die sich über 120 bp erstrecken. Das entspricht etwa der statistischen Verteilung der DR im ganzen Phagengenom. Eine Signalfunktion ist eher unwahrscheinlich.

Zwischen dem ORF 11, der außer in P482 in bIL170 und bIL41, nicht aber in sk1 vorkommt, und dem ORF 12, der wiederum in allen sequenzierten Phagen der 936-Spezies vorhanden ist, konnte ein weiteres "Direct Repeat"-Motiv lokalisiert werden. Die 7 bp lange Sequenz 5'-ATAAAAA-3' wird zwischen den Basen 8829 und 8855 3mal wiederholt. In der 59 bp langen IGR vor ORF 11 liegt ebenfalls ein DR, das aus 8 bp besteht und einmal wiederholt wird (5'-TGAAATTA-3').

Abb. 24A

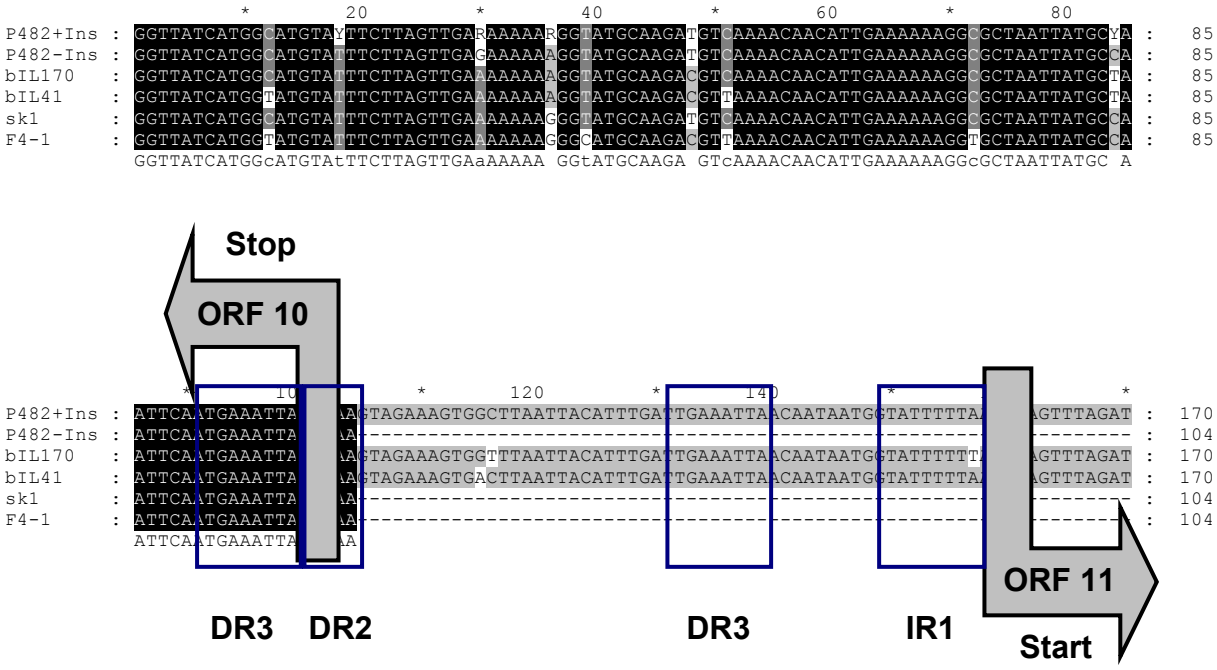


Abb. 24B

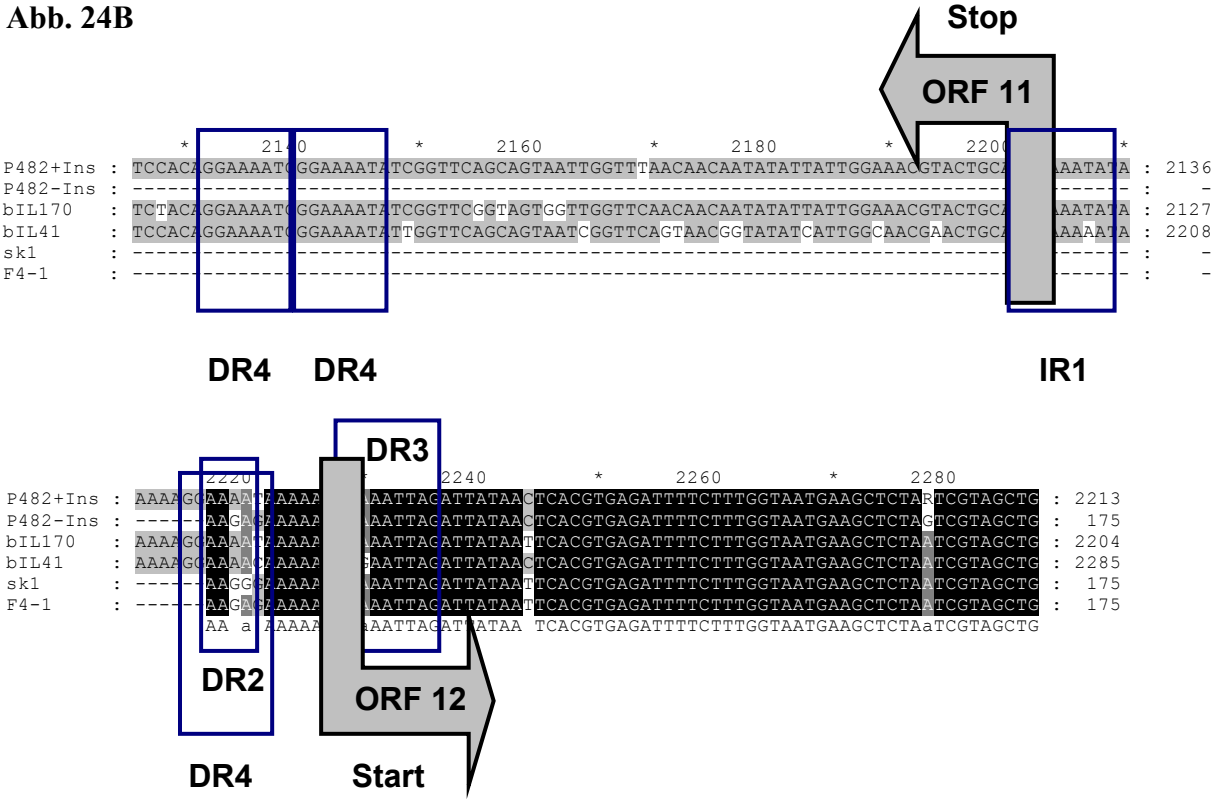


Abb. 24. Anordnung möglicher Signalstrukturen vor ORF 11 (Abb. 24A) und nach ORF 11 (Abb. 24B).

3.5.2.5 Gene für tRNAs

Mit dem Programmpaket Omiga 2.0 konnten zwei Gene identifiziert werden, die für tRNAs codieren (Abb. 25). Nach dem letzten ORF der mittleren Phagenregion zwischen den Basenpaaren 30488 und 30558 befindet sich ein Sequenzabschnitt, der für eine Tryptophan-tRNA codiert. Nach einem kurzen Spacer wurde zwischen den Basen 30628 und 30699 eine Prolin-tRNA lokalisiert. Darauf folgt der Terminator 4 (vgl. 3.5.2.3)

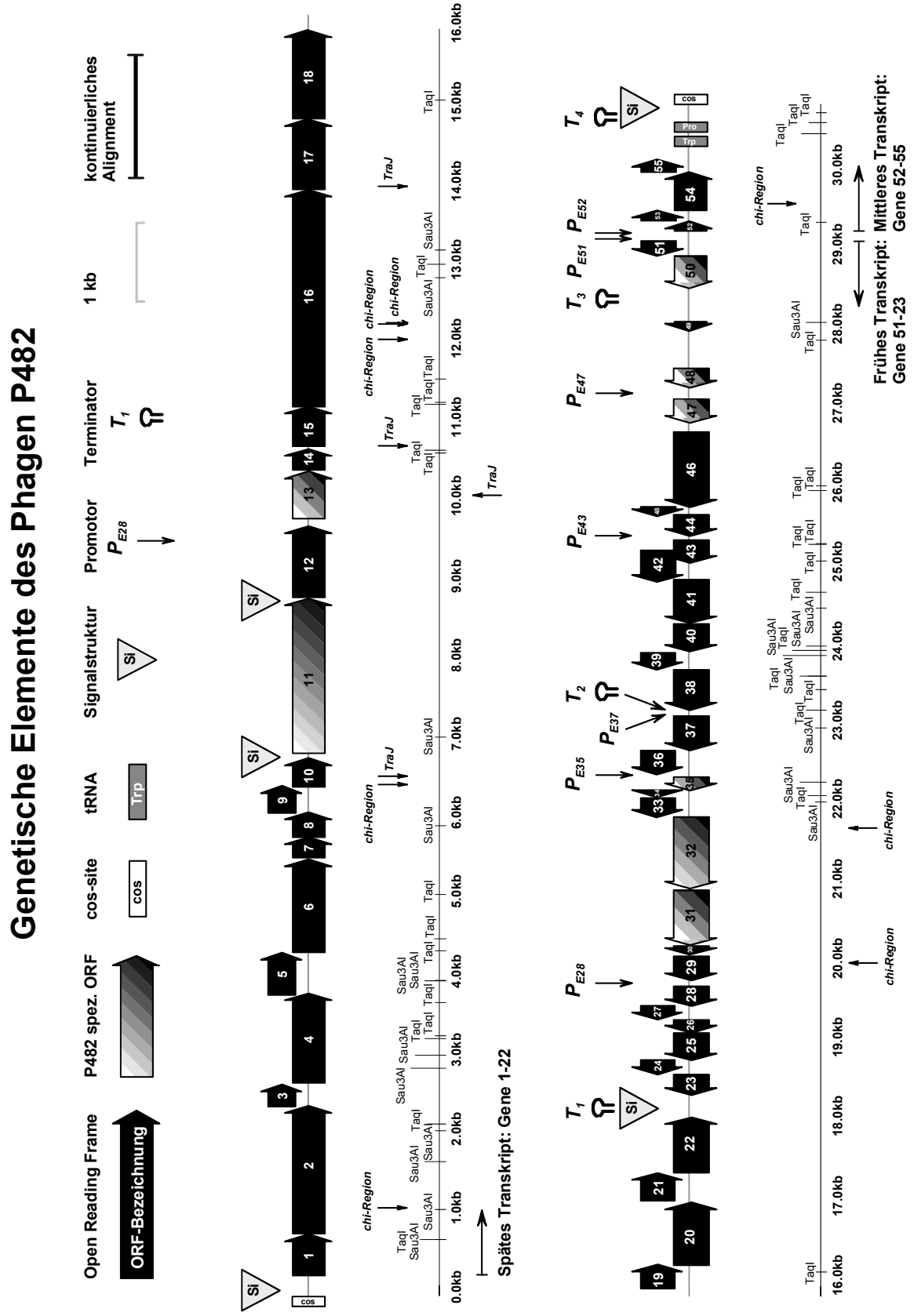


Abb. 25. Genetische Elemente des Phagen P482.

3.5.3. Ähnlichkeiten zur DNA anderer Lactococcus-Phagen

Der Sequenzvergleich von P482, sk1 und bIL170, den 3 *Lactococcus*-Phagen der 936 Spezies, deren Genom komplett sequenziert wurde, ermöglicht eine Unterteilung in höher und niedriger konservierte Bereiche. Die Übergänge dieser Bereiche korrespondieren meist exakt mit den codierenden Bereichen der ORFs. Ähnliches wurde auch für *L. lactis* ssp. *lactis* und *cremoris* festgestellt: in konservierten Bereichen betragen die Unterschiede auf Aminosäureebene maximal 10-20%, sonst 35-65% (Delorme et al., 1994).

Beim Vergleich der frühen Phagenregionen (Abb. 26) zeigt sich für die ORFs 23, 24, 28, 29, 30, 33, 38, 39, 40, 43, 44, 46 und 51 eine Identität auf Aminosäureebene zwischen 80 und 100%. Auch die Anordnung dieser Gene ist in den Phagen P482, sk1 und bIL170 identisch. In den Genen der ORFs 25, 36, 41, 42 und 45 spiegelt sich ein mittlerer Grad der Konserviertheit von 40-80% wider. Die Sequenzen von ORF 27, 34 und 37 kommen in ähnlicher Form nur in bIL170, nicht aber in sk1 vor. ORF 26 und ORF 49 weisen eine hohe Ähnlichkeit zu ORF E30 und E2 von bIL170, aber nur eine geringe Ähnlichkeit zu ORF 24 und ORF 49 aus sk1 auf. Die P482 spezifischen ORFs 31, 32, 35, 47, 48 und 50 konnten in keinem der beiden anderen Phagen identifiziert werden. Im Gegensatz dazu enthalten sowohl sk1 als auch bIL170 ORFs, die lediglich in diesem Phagen enthalten sind (sk1 ORFs 28, 29, 36, 37, 40, 44, 45, 47, 48, 49 bzw. bIL170 ORFs E37, E36, E35, E34, E27, E26, E25, E22, E21, E20, E11, E8, E4, E3).

Im Gegensatz zu den Regionen der frühen Phagengene, in denen sich die Phagen P482, sk1 und bIL170 zum Teil erheblich unterscheiden, sind die Regionen der mittleren und späten Phagentranskripte in allen 3 Phagen sehr konserviert (Abb. 27). 9 Gene weisen 95 bis 100% Identität der Aminosäuresequenzen auf (ORF 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15). Bei den anderen ORFs werden Sequenzähnlichkeiten von 75 - 95% erreicht. Die relative Anordnung der einzelnen ORFs bleibt in allen Phagen erhalten. Lediglich in sk1 fehlt ORF 11. Der P482 spezifische ORF 13 ist in keinem der anderen Phagen zu finden.

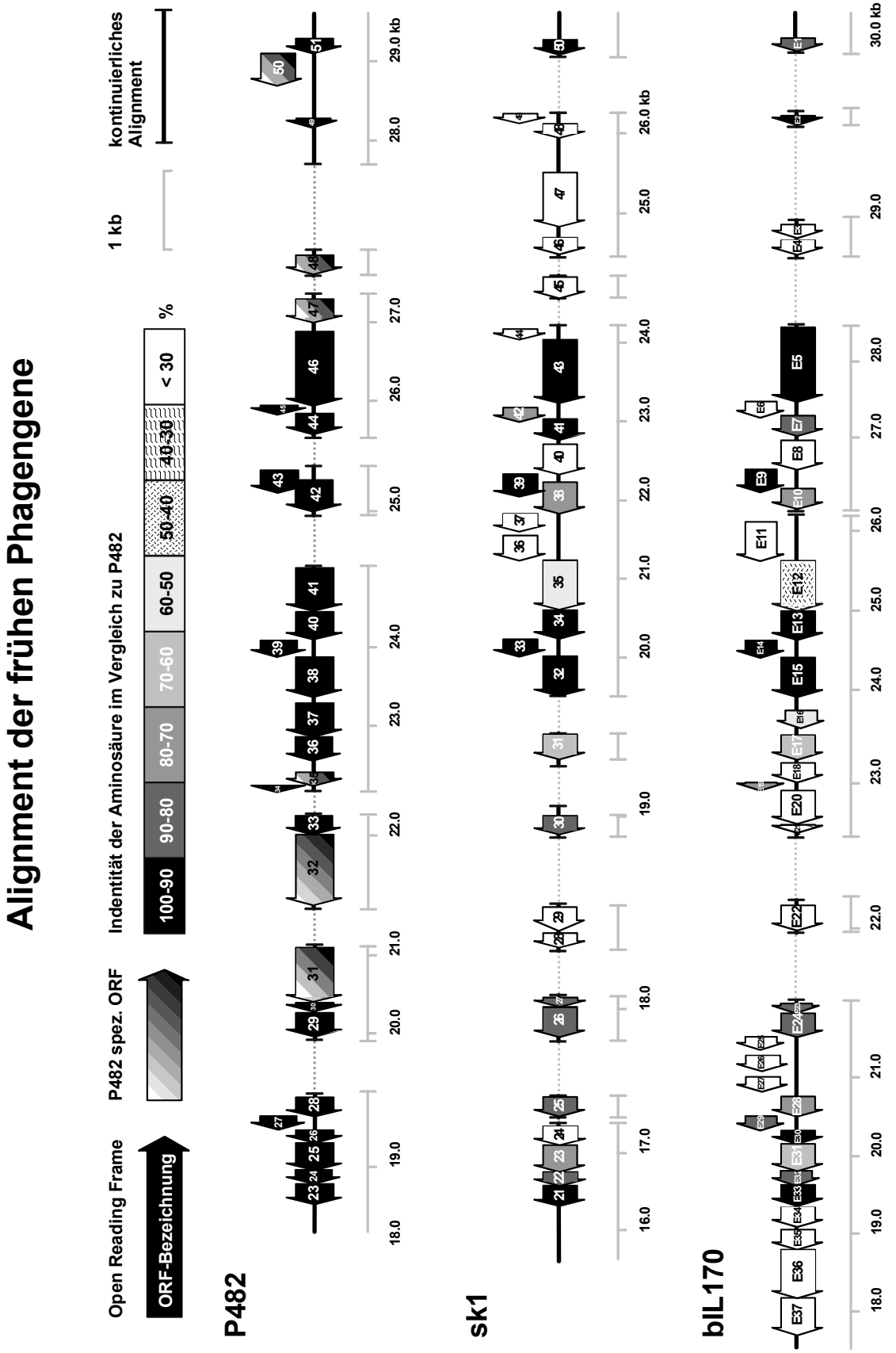


Abb. 26. Die "Early Region" der Phagen P482, sk1 und bIL170.

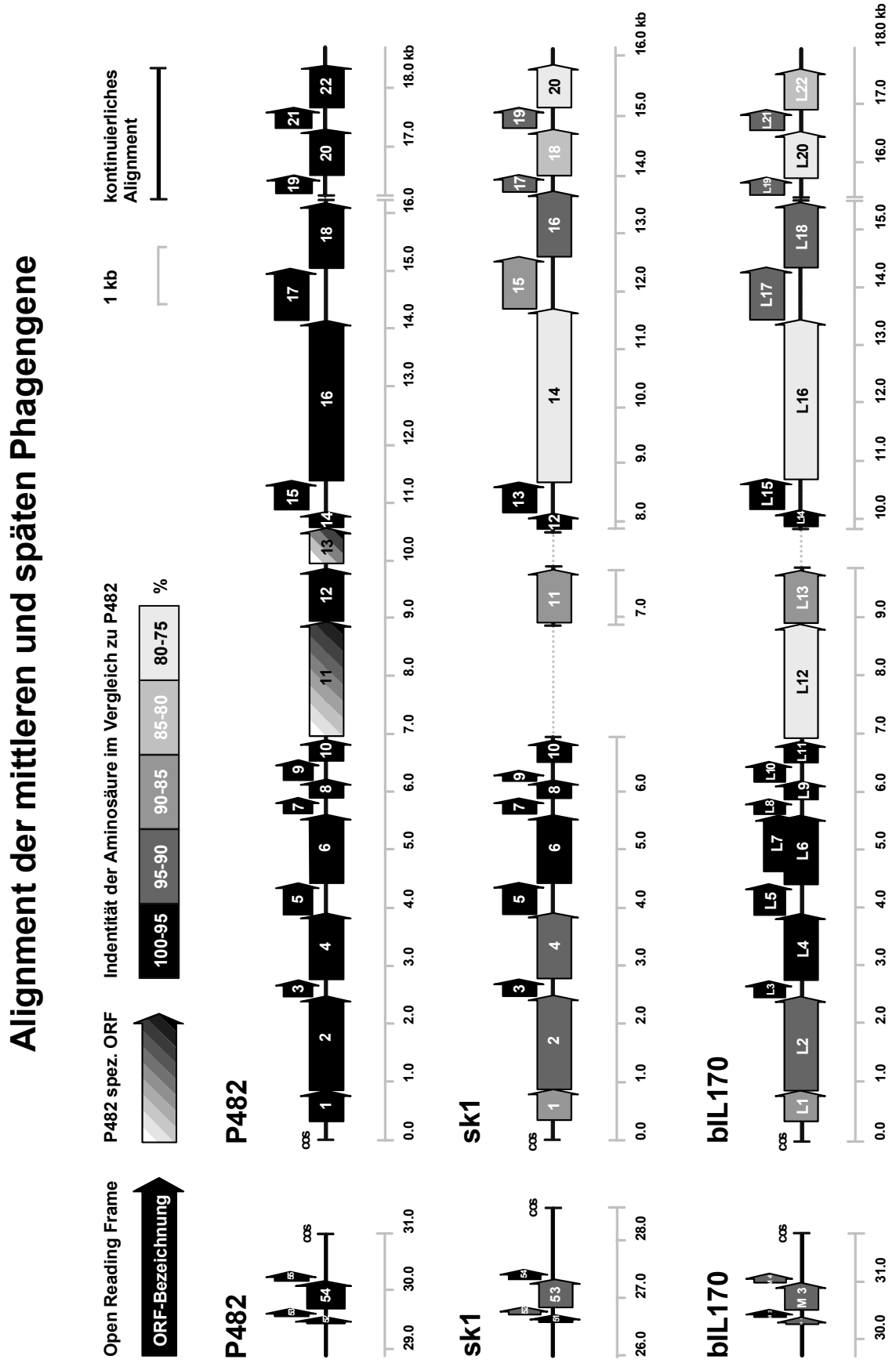


Abb. 27. Die Anordnung der mittleren und späten Gene der Phagen P482, sk1 und bIL170.

3.5.4. Analyse der P482 spezifischen "Open Reading Frames"

ORF 11 kommt außer in P482 auch bei den *Lactococcus*-Phagen bIL170 und bIL41 der 936-Spezies, und Tuc2001, r1t und TP901-1, die der P335-Spezies angehören, mit Ähnlichkeiten von 70 bis 79% auf der Gesamtlänge des Proteins vor (Tab. 25). Geringere Sequenzähnlichkeiten auf einem 200 AS langen Fragment weisen auf eine Verwandtschaft mit *Streptococcus*-Phagen hin. Die beiden *Streptococcus thermophilus*-Phagen Sfi21 und Sfi19 zeigen in ihren ORFs 1276 bzw. 1291 sogar höhere Homologien als die *Lactococcus*-Phagen phi67 und BK5-T. Aus den Sequenzähnlichkeiten läßt sich nur schwer eine Funktion des Proteins ableiten. Denkbar wäre ein Strukturprotein des Phagen, das am Aufbau des Phagenschwanzes beteiligt ist.

Organismus	*ORF-Bezeichnung*	*% Ähnlichkeit*	*vorhergesagte Funktion*
L. l. Phage bIL170	L12	79	unbekannt
L. l. Phage Tuc2009	ORF56	73	"
L. l. Phage r1t	ORF 47	71	"
L. l. Phage TP901-1	ORF 51	70	Kragenprotein
L. l. Phage phi41	L12	70	unbekannt
L. l. Phage c2	L15	41	kleines Strukturprotein
Str. therm. Phage Sfi21	ORF 1276	40% auf 200 AS	Protein f. d. Wirtsspezifität
Str. therm. Phage Sfi19	ORF 1291	39% auf 200 AS	Protein f. d. Wirtsspezifität
L. l. Phage phi67	ORF 35	39% auf 160 AS	unbekannt
L. l. Phage BK5-T	ORF 1904	28% auf 200 AS	Protein f. d. Wirtsspezifität
Str. therm. Phage Sfi11	ORF 695	27% auf 200 AS	Anti-Rezeptor

Tab. 25. Proteinsequenzen mit Ähnlichkeiten zu ORF 11.

Beim Sequenzvergleich von ORF 13 mit der Datenbank werden nur geringe Ähnlichkeiten zu BK5-T, den *Streptococcus*-Phagen Sfi11, Sfi19 und Sfi21 bzw. zu c2 aufgeführt. Als mögliche Funktion könnte die Beteiligung des Proteins am Aufbau des Phagenschwanzes abgeleitet werden.

Der P482-spezifische ORF 31 weist 96% Sequenzähnlichkeit zu ORF 22 von r1t (Nauta et al., 1996; van Sinderen et al., 1996) und 94% Ähnlichkeit zu ORF 230 von phi31.1 auf (Durmaz und Klaenhammer, 2000). Diesen beiden aus der P335-Spezies der *Lactococcus*-Phagen stammenden ORFs konnte bisher noch keine Funktion zugeordnet werden, so dass trotz der großen Sequenzähnlichkeit für ORF 31 keine Proteinfunktion abgeleitet werden kann. Wie Abb. 28 zeigt besteht auch Ähnlichkeit zu Proteinen aus *Streptococcus pyogenes* MGAS8232

und M1GAS (Ferretti et al., 2001; Smoot et al., 2002) und aus *Listeria inocua* (Glaser et al., 2001). Die Proteine enthalten zwischen 34 und 36% identische und zwischen 51 bis 57% ähnliche Aminosäuren. Sequenzen, die aus den *Streptococcus thermophilus*-Phagen Sfi11 und Sfi19 bekannt sind, zeigen eine größere Identität zu den Bakteriensequenzen als zu den Sequenzen der *Lactococcus*-Phagen (Lucchini et al., 1998; Lucchini et al., 1999a) . Keinem der aufgeführten Proteine konnte bisher eine Funktion zugeordnet werden.

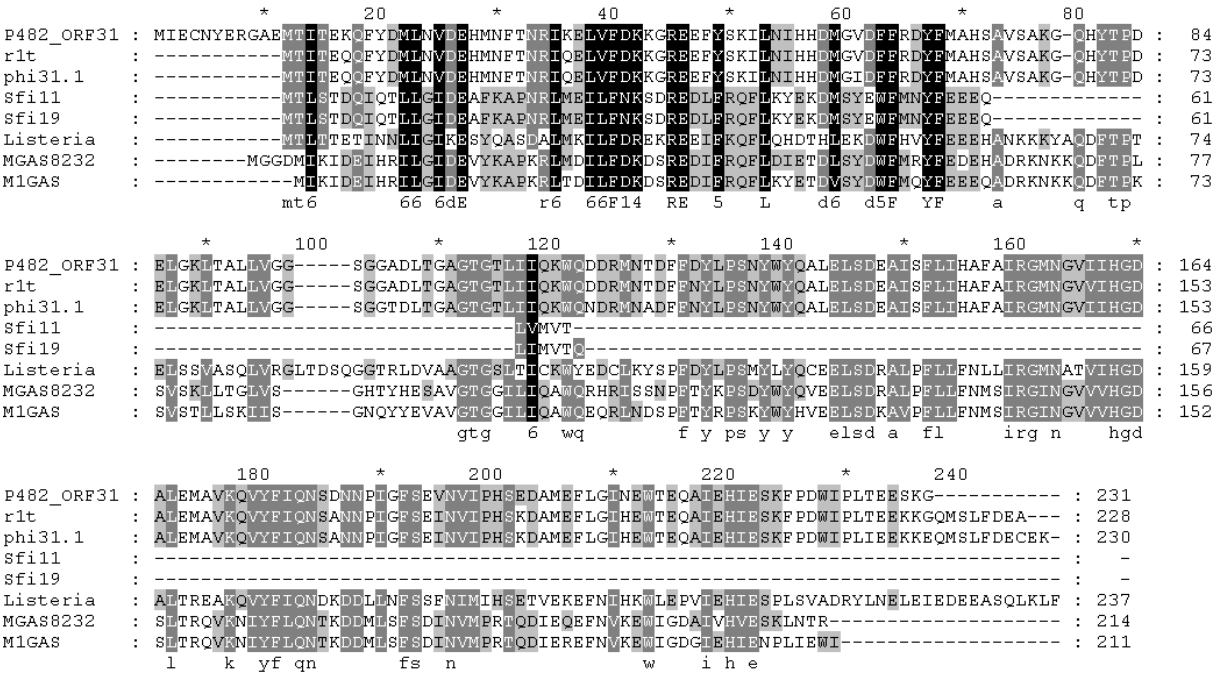


Abb. 28. Alignment des P482-spezifischen ORFs 31 mit anderen Sequenzen aus der Datenbank.

Für die P482 spezifischen ORFs 32, 35 und 48 wurden auf DNA- oder Proteinebene nur geringe Sequenzähnlichkeiten zu Einträgen in den Datenbanken ermittelt.

Die ORFs 47 und 50 weisen beide Ähnlichkeiten zu den aus bIL170 bekannten Proteinen E11, E20 und E37 auf. In diesem Phagen liegt eine Verdreifachung dieser ähnlichen Gene vor, die ebenfalls an unterschiedlichen Stellen des Genoms lokalisiert sind. In P482 befinden sich mit ORF 37 ebenfalls 3 Varianten des Proteins mit unterschiedlichen Ähnlichkeit zu den bIL170-Proteinen. Als mögliche Funktion kann diesen Proteinen Endodeoxyribonuklease-Aktivität zugeordnet werden.

Alle Sequenzen zeigen große Ähnlichkeiten zu den DNA-Polymerase-Genen der *B. subtilis* Phagen phi-E und SP82 bzw. zum *L. lactis* Phagen r1t (Abb. 29) (Goodrich-Blair und Shub, 1994).

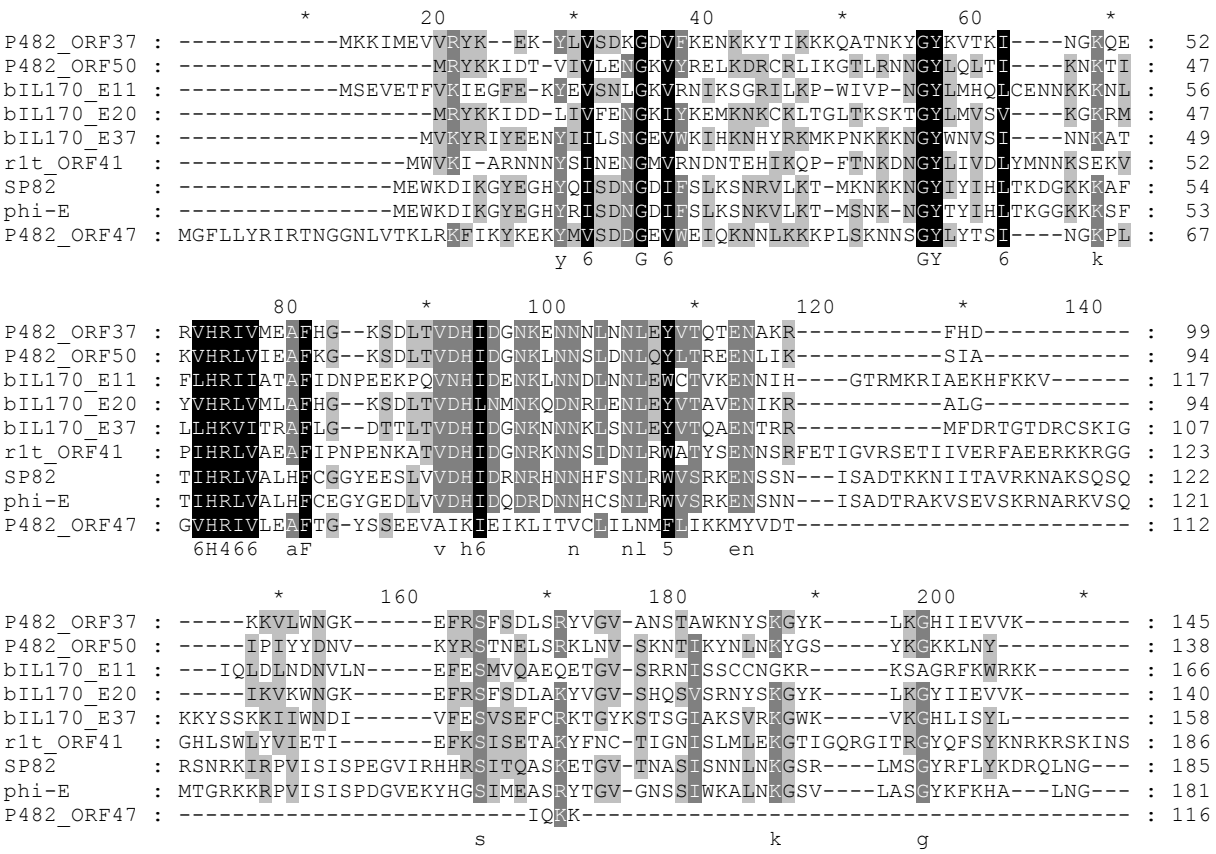


Abb. 29. Alignment der P482-Proteine mit Deoxyribonuklease-Funktion und deren nächstähnlichen Vertretern.

3.5.5. Funktionelle Analyse des Phagengenoms

Zusätzlich zur Suche nach Sequenzähnlichkeit mit den BLAST-Algorithmen für DNA- und Proteinsequenzen wurden die ORFs des Phagen P482 auch hinsichtlich des Vorhandenseins bestimmter Aminosäuremotiv analysiert. Tritt beispielsweise das Aminosäuremotiv [LIMAC]-[LIVFYWA]-x-[DN]-P-P-[FYW] weist das Programm PROSITE auf die Ähnlichkeit mit DNA-(Adenin-N^6)-Methyltransferasen (PS00092) hin. Das "ATP-GTP binding site A (P-Loop)"-Motiv wird durch [AG]-x(4)-G-K-[ST] beschrieben.

Wie Tab. 26 zeigt, enthalten einige Proteinsequenzen des Phagen P482 charakteristische Aminosäuremotive. Der für HNH-Endonukleasen typische Sequenzabschnitt wurde unabhängig von mehreren Programmen in den ORFs 37 und 50 identifiziert. Das durch BLAST-Vergleich gefundene Ergebnis, dass es sich bei ORF 22 um eine N-Acetylmuramoyl L-Alanin-Amidase handelt, wurde durch 2 Programme bestätigt. Obwohl der P482-spezifische ORF 32 keine Sequenzähnlichkeiten zu in den Datenbanken hinterlegten DNA-

oder Proteinsequenzen aufweist, enthält er für DNA-(Adenin-N^6)-Methyltransferasen typische Aminosäuremotive. Die Aminosäuren 222-228 haben die Sequenz L-Y-L-D-P-P-Y. Dahinter verbirgt sich das konservierte Motiv (CM) II. Die Konsensus-Sequenz für das CM I lautet F-x-G-x-G (Timinskas et al., 1995). Auch dieses Motiv läßt sich in ORF 32 zwischen den Aminosäuren 38 bis 42 (Sequenz F-G-G-G-G) identifizieren. Der Abstand zwischen den beiden konservierten Motiven entspricht in etwa den in anderen Vertretern dieser Proteinklasse gefundenen Distanzen. Damit kann das Protein des ORFs 32 der D12-Klasse der DNA-(Adenin-N^6)-Methyltransferasen zugeordnet werden.

ORF	***PIR***	***PROSITE patterns***	***PFAM Domains***	***BLOCKS***
3	-	-	-	HNH Endonuklease
12	wichtiges Hüll-protein	-	-	-
17	-	ATP-GTP Bindungs-stellenmotiv A	-	Zink-abhängige Phospholipase C
21	Transmembran-protein	-	-	-
22	Hydrolase	-	N-Acetylmuramoyl L-Alanin Amidase	N-Acetylmuramoyl L-Alanin Amidase
32	-	DNA-(Adenin-N^6)-methyltransferase	-	-
37	Endodeoxyribo-nuklease	-	HNH-Endonuklease	-
50	Endodeoxyribo-nuklease	-	HNH-Endonuklease	-
54	-	ATP-GTP Bindungs-stellenmotiv A	-	-

Tab. 26. Charakteristische Aminosäuremotive in den Sequenzen der putativen Proteine des Phagen P482.

3.6. Vorarbeiten zur DNA-Chip-Hybridisierung

3.6.1. Markierungsraten bei PCR, Nick Translation und "random primed labelling"

Einbau markierter dCTPs in der PCR-Reaktion

Beim Einbau von Cy5-markierten dCTPs in den DNA-Doppelstrang der PCR-Reaktion wurden verschiedene Verhältnisse von markierten zu unmarkierten dCTPs eingesetzt. Bei konstanter dGTP-, dTTP- und dATP-Konzentration von 0,2 mM waren im ersten Ansatz 0,195 mM unmarkiertes dCTP und 0,005 mM Cy5-markiertes dCTP vorhanden (Verhältnis 1:40). Im 2. Ansatz wurde ein Label-Verhältnis von 1:20 eingesetzt (0,19 mM dCTP + 0,01 mM Cy5-dCTP). Der 3. PCR-Ansatz enthielt 0,15 mM unmarkiertes dCTP und 0,05 mM Cy5-markiertes dCTP (Verhältnis 1:4). Die Konzentration der Nukleotide betrug also in allen Fällen 0,2 mM. Bei einem gleichmäßigen Einbau der dCTPs sollte im ersten Ansatz jedes 40. im 2. Ansatz jedes zwanzigste und im 3. Ansatz jedes vierte dCTP eine Markierung tragen. Geht man von einem G+C-Gehalt von 30% aus, müßte alle 250, alle 125 bzw. alle 25 Basen ein gelabeltes Nukleotid eingebaut werden.

Diese theoretischen Betrachtungen konnten im Experiment nicht bestätigt werden. Bei einem Nukleotid-Labelling-Verhältnis von 1:40 bzw. 1:20 wurden im 828 bp langen *abiB*-PCR-Produkt bzw. im 1197 bp langen P936all_X1-PCR-Produkt kein bzw. maximal 1-2 markierte dCTPs eingebaut. Die Erhöhung des Labelling-Verhältnisses auf 1:4 brachte eine Verbesserung Markierungseffizienz auf 96-112 Basen. Dieser Wert liegt jedoch weit hinter dem errechneten Label-Abstand von 25 Basen.

Markierung genomischer DNA durch Nick-Translation.

Die genomische DNA der Starterkulturen Probat 8/0, Probat 8/20 und Probat 8/21 wurde wie in 2.9.3 beschrieben durch Nick-Translation mit Cy5-dCTP markiert. Anschließend wurde das Enzym und die nicht eingebauten dNTPs durch Reinigung mit Microcon-Filtern entfernt. Um eine Verfälschung des Markierungsergebnisses durch nicht abgetrennte Cy5-dCTPs auszuschließen, wurde die Reinigung nach der ersten photometrischen Bestimmung der Markierungseffizienz wiederholt. Die bei der zweiten Bestimmung der Einbauraten gefundenen Abweichungen lagen mit 1-5% innerhalb der Schwankungsbreiten der Meßungenauigkeit des Photometers bzw. weit unter den Schwankungsbreiten der einzelnen Nick-Translations-Ansätze.

In 10 verschiedenen Markierungsexperimenten lag die durchschnittliche Einbaurate bei einem Cy5-Label pro 39 Basen. Die Schwankungsbreite der Markierungseffizienz folgte einer Gauß-Verteilung zwischen 20 und 59 Basen (20, 23, 23, 31, 34, 44, 47, 49, 58, 59).

Random geprimtes Labelling der genomischen DNA mit Cy5-dCTP.

Wie bei der Nick-Translation erfolgt der Einbau der Cy5-markierten dCTPs auch hier durch Enzyme. Die Markierungseffizienz der Random geprimten Labelling-Methode lag in zur Nick-Translation vergleichbaren Größenordnungen von 1 Label pro durchschnittlich 33 Basen nach der 2. Reinigung. Die Einbauraten schwankten zwischen 1 Label pro 24 und 1 Label pro 41 Basen.

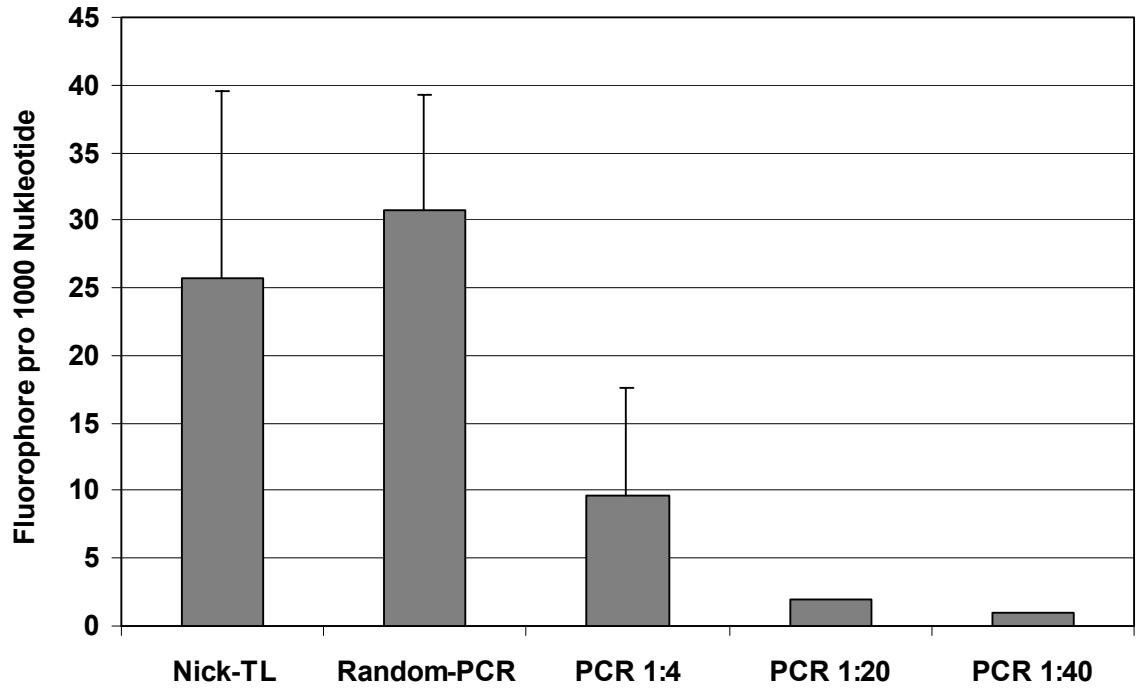


Abb. 30. Einbau fluoreszenz-markierter Nukleotide in der Nick-Translation, dem "random primed labelling" oder der PCR.

Die Hybridisierung der markierten DNA zeigte auf dem Mikroarray nur sehr schwache Signale. Trotz der vergleichsweise hohen Kosten pro Reaktion reichte die DNA-Konzentration von 0,5-1,5 µg DNA für ein befriedigendes Hybridisierungsergebnis nicht aus.

4. Diskussion

4.1. Die Bakterienpopulation in einer instabil säuernden Fermentation

Die direkte und kultivierungsunabhängige *in situ* Identifizierung der an Milchfermentationen beteiligten Mikroorganismen bietet eine neue Möglichkeit der Qualitätskontrolle und Produktsicherheit in der Milchindustrie. Erstmals wurde gezeigt, dass die Methode der Fluoreszenz- *in situ*- Hybridisierung ganzer Zellen während der Fermentation eines Milchproduktes anwendbar ist. Zahlreiche Beispiele aus anderen Ökosystemen wie dem Belebtschlamm (Snaidr et al., 1997) oder marinen und limnischen Gewässern (Glöckner et al., 1999) belegen die universelle Einsatzfähigkeit dieser Nachweistechnik (Amann et al., 1995).
Die Sequenzen der 16S und 23S rRNA erwiesen sich als geeignetes Zielmolekül für die schnelle, kultivierungsunabhängige Identifizierung von Mikroorganismen (Hugenholtz et al., 1998; Stahl und Amann, 1991). Die Spezifität der Sonden für die Detektion der *Lactococcus*-Subspezies *lactis* (Betzl et al., 1990) und *cremoris* (Salama et al., 1993), die zu den wichtigsten Vertretern der Milchsäurebakterien gehören, wurde erstmals anhand von Koloniehybridisierungsexperimenten gezeigt. Beimfohr et al. setzten die Sonden im Rahmen von FISH-Experimenten zur Identifizierung der Spezies *Lactococcus*, *Streptococcus* und *Enterococcus* ein (Beimfohr et al., 1993). Mögliche Probleme, die bei der Permeabilisierung der Gram-positiven Zellwand entstehen können, wurden durch eine Lysozymbehandlung im Vorfeld der Hybridisierung gelöst. Die Autofluoreszenz des in Milchprodukten enthaltenen Proteins konnte durch einen Waschschritt mit NaOH minimiert werden.
Der Einsatz hierarchischer Sonden ermöglichte es, die Zusammensetzung der Bakterienpopulation während einer Fermentation mit Säuerungsstörung zu verfolgen. Die Differenz der Zellzahlen, die mit den Bakterien- bzw. Gruppen-spezifischen Sonden EUB338 und LGC354 ermittelt worden war, lag im Rahmen der Zählungenauigkeit (Abb. 5). Es kann also ausgeschlossen werden, dass in der Fermentation Gram-negative Mikroorganismen wie *Salmonella typhimurium*, *Yersinia*, enterotoxisches *E. coli* (ETEC) und andere coliforme Keime, die u. a. an der Schadflora des Quarks beteiligt sein können, vorkommen (Krämer, 1997).
Bakterien der Gattung *Lactococcus* sind zu Beginn der Fermentation mit 99,5% an der Fermentation beteiligt (Abb. 7). Die Subspezies *L. l. lactis*, auf die während der gesamten Fermentation nur max. 6% der Bakterien entfallen, dürfte eine eher untergeordnete Rolle spielen. Im Gegensatz dazu folgt die Anzahl der als *L. l.* ssp. *cremoris* identifizierten Bakterien der Periodik der Säuerungskurve. Solange der pH-Wert der Fermentation

kontinuierlich sinkt, können zwischen 98 und 65% der Bakterien dieser Subspezies zugeordnet werden. Bei einem pH-Wert von 5,8 stoppt die Säuerung kurzzeitig und nahezu keine *L. l.* ssp. *cremoris* sind mehr nachweisbar. Erst bei erneuter Säuerung nimmt ihre Anzahl wieder zu. Der Säuerungsausfall ist also auf den Verlust der *L. l.* ssp. *cremoris*-Population zurückzuführen.

Die beiden *L. lactis*-Subspezies unterscheiden sich in ihren physiologischen Eigenschaften. Während *L. l.* ssp. *lactis* bei 40°C, 4% NaCl oder pH-Werten von pH 9,2 nicht im Wachstum eingeschränkt ist, zeigt *L. l.* ssp. *cremoris* kein Wachstum mehr. Die Fähigkeit Arginin zu hydrolysieren besitzt ebenfalls nur *L. l.* ssp. *lactis* und zeigt damit eine allgemein höhere Toleranz gegenüber sich verändernden Wachstumsbedingungen (Teuber et al., 1993). Kim et. al. konnten zeigen, dass *L. l.* ssp. *cremoris* sehr viel anfälliger auf Streß reagiert als *L. l.* ssp. *lactis* und sich weniger gut an durch Säuren, Salze oder Kälte ausgelösten Streß anpassen kann (Kim et al., 1999). Die Anwesenheit von Phagen bzw. deren Abwehr stellt ebenfalls einen Streßfaktor dar. In *E. coli* konnte ein Protein identifiziert werden, das, ähnlich wie das Hitzeschock-Protein bei erhöhten Temperaturen, beim Auftreten von Phagen exprimiert wird und aus diesem Grund "Phage shock" Protein Psp genannt wird (Brisette et al., 1990). Die Induktion erfolgt nach der Infektion durch filamentöse Phagen, aber auch durch Hitze, Ethanol oder osmotischen Streß und hängt nicht vom Hitzeschock-Faktor σ^{32} ab (Kobayashi et al., 1998; Weiner et al., 1991). Möglicherweise hängt die bei *L. l.* ssp. *lactis* beobachtete hohe Toleranz gegen Streß mit dem Vorhandensein solcher Streßproteine zusammen. Sie ermöglichen der Zelle eine schnelle Reaktion auf extreme Wachstumsbedingungen oder die Abwehr gegen Phagen. Wie am Beispiel von *E. coli* gezeigt wurde, kann das zum programmierten Zelltod führen, den der *E. coli*-Phage λ durch Expression eines sogenannten "Antideath" Proteins verhindern kann (Engelberg-Kulka und Glaser, 1999). Da die Funktionsweise der Phagenresistenzgene des Typs "Abortive Infection" meist noch unbekannt ist, könnte es sich dabei auch um Phagenschock-Proteine handeln. Diese Art der Phagenresistenz scheint in *L. l.* ssp. *lactis* sehr viel weiter verbreitet zu sein als in *L. l.* ssp. *cremoris*, da nur 2 der 18 Abi-Gene in *L. l.* ssp. *cremoris* identifiziert wurden (vgl. 1.3.2 und Forde und Fitzgerald, 1999b).

Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt, die wie *B. cereus* und *B. sphaericus, Clostridium spec., Campylobacter spec., Enterococcus spec.* oder *Listeria monocytogenes* nicht zur Gattung *Lactococcus* gehören, aber mit der LGC354-Sonde erkannt werden (Meier et al., 1997), spielen zu Beginn der Säuerung keine Rolle. Der Anteil dieser Organismengruppe, an der auch die in der Starterkultur enthaltene Gattung *Leuconostoc*

beteiligt ist, nimmt erst im Verlauf der Fermentation einen Bakterienanteil von etwa 20% ein (Abb. 7). Der pH-Wert der Fermentation sinkt während dieser Zeit von 6,0 auf 5,3. Betrachtet man die in Tab. 27 dargestellten pH- und Temperaturoptima der Bakterien, die mit der LowGC-Sonde erkannt werden und nicht zur Gattung *Lactococcus* gehören, stellt man fest, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Vertreter der Gattung *Leuconostoc* handeln dürfte (Holzapfel und Schillinger, 1993; Krämer, 1997). Das pH-Optimum liegt im angegebenen Bereich und das Temperaturoptimum entspricht den Fermentationsbedingungen von 22-24°C. Die anderen Bakterienarten bevorzugen höhere Temperaturen und zumeist auch neutralere pH-Werte. Kommen im Speisequark LowGC Gram-positive Mikroorganismen vor, die nicht zu den in der Starterkultur enthaltenen Gattungen *Lactococcus* oder *Leuconostoc* gehören, so handelt es sich dabei meist um thermoresistente Sporenbildner wie *B. cereus*, *B. sphaericus* oder Clostridien, die über die hitzebehandelte, aber nicht sterilisierte Milch in die Fermentation gelangen (Zickrick, 1996). Ihr pH-Optimum liegt ebenfalls im leicht sauren Bereich.

	Leuc. mesente-roides	***Bacillus spec.***	***Clostridium spec.***	***Campylo-bacter spec***	***Listeria monocyto-genes***	***Staphylo-coccus aureus***
pH-Optimum	6,5-4,8	5,3-4,7	6,0-5,5	7,5-6,5	9,0-4,5	7,0-6,0
Temperatur-optimum [°C]	22-28	28-35	30-40	42-45	30-37	35-37
Literatur	(Holzapfel und Schillinger, 1993)	(Krämer, 1997)	(Krämer, 1997)	(Krämer, 1997)	(Krämer, 1997)	(Krämer, 1997)

Tab. 27. pH- und Temperaturoptima von LowGC Gram-positiven Mikroorganismen.

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ganzer Zellen bietet den großen Vorteil, dass für die Analyse der Bakterienzusammensetzung keine Kultivierung nötig ist. Die Ergebnisse von kultivierungsabhängigen Methoden wie der Kolonie-Hybridisierung hängen stark vom Medium ab, auf dem die Bakterien angezogen werden (Salama et al., 1993). Die gleichzeitige Anzucht aller in der Fermentation enthaltener Bakteriengattungen wie *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* und *Streptococcus* auf einem Kulturmedium ist aufgrund unterschiedlicher Wachstumsanforderungen nicht möglich (Tsakalidou et al., 1994). Descheemaeker et al. konnten am Beispiel von *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* und *Vagococcus* zeigen, dass eine Identifizierung der Bakteriengattung mit einer SDS-PAGE des gesamten

Zellproteins möglich ist (Descheemaeker et al., 1994). Dafür dienen allerdings durch Kultivierung hergestellte Einzelisolate als Ausgangspunkt. Diese Voraussetzung muß auch bei anderen Klassifizierungsmethoden gegeben sein. Hierzu zählen Methoden wie die Differenzierung der *Lactococcus*-Subspezies mit Histidin-PCR (Beimfohr et al., 1997) oder anhand der Lactat-Dehydrogenase-Phylogenie (Urbach et al., 1997). Basaran et al. entwickelten eine PCR-basierte Methode, die Deletionen im *L. l.* ssp. *cremoris*-Genom für die Identifizierung der Subspezies nutzt (Basaran et al., 2001).
In Zukunft ist es möglich die kultivierungsunabhängige Analyse der Bakterienpopulation in Starterkultur- oder Fermentationsproben durch FISH mit der Durchflußcytometrie zu kombinieren und damit eine Automatisierung zu erreichen (Fuchs et al., 1998). Bidnenko et al. benutzten die FISH um den Einfluß von Phagen auf die Permeabilität der Gram-positiven Zellwand zu untersuchen (Bidnenko et al., 1998). Statt einer direkten Fluoreszenzmarkierung benutzten sie mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Sonden, die nur in die Zelle eindringen können, wenn die Zellwand durch Autolyse oder durch Phagen-codierte Enzyme permeabilisiert worden war. Die FISH bietet also über den gewählten Ansatz hinaus auch zukünftig interessante Anwendungsbeispiele.

4.2. Einfluss der Starterkultureigenschaften auf die Fermentation

Nachdem die Herstellung von fermentierten Milchprodukten über Jahrtausende im eigenen Heim erfolgt ist, hat sie sich in den letzten hundert Jahren zur Großindustrie entwickelt. Allein in der Europäischen Union wurden im Jahr 2001 114,5 Mio. Tonnen Milch zu Milchprodukten verarbeitet. Seitdem steigen die Anforderungen, die an die neuen Starterkulturen gestellt werden. Sie müssen Eigenschaften wie gute Geschmacks- und Geruchscharakteristika, schnelle Säuerung und Phagenresistenz aufweisen (Davidson und Hillier, 1995).

4.2.1. Phagenresistenzgene

Die Anzahl der verschiedenen Phagenabwehrmechanismen variiert in den getesteten Starterkulturen Probat 8/0, Probat M4, Probat M7, G3-Mix 6 und Probat 505 zwischen 9 und 17 (Tab. 19). In den untersuchten Speisequarks konnten zwischen 14 und 22 Phagenresistenzgene identifiziert werden (Tab. 20). Die tatsächliche Anzahl der in den Starterkulturen und Fermentationen vorhandenen Phagenresistenzgene könnte sogar noch

höher sein. Da für die Primer, die zur Identifizierung der Gene *lla*KR II, *abiD*, *abiF* und *abiI* keine Positivkontrollen vorlagen, konnte ihre Funktionsfähigkeit nicht nachgewiesen werden.
Derzeitige Bestrebungen, undefinierte "Mixed-Strain"-Starterkulturen wie Probat 8/0 durch Kulturen mit definierter Zusammensetzung aus einigen wenigen Stämmen zu ersetzen, führte dazu, dass keine Untersuchungen über die Verbreitung von Phagenresistenzgenen in diesen lang etablierten Kulturen vorliegen. Lediglich die auf dem Plasmid pNP40 identifizierten Resistenzgene *abiE* und *abiF* wurden in 6 von 19 natürlich zusammengesetzten Starterkulturen nachgewiesen (Coffey et al., 1998). Obwohl mittlerweile zahlreiche Phagenresistenzgene identifiziert wurden, sind in der Literatur nur sehr wenige Studien bekannt, in denen der Zusammenhang zwischen der Art und der Anzahl der vorhandenen Resistenzgene und der Verlauf der Fermentation untersucht wird. Der synergistische Effekt bei der Abwehr von sk1 und c2 konnte beim gleichzeitigen Vorkommen der Resistenzplasmide pNP40 mit den Resistenzgenen *abiE* und *abiF* und pBF61, das das Gen für AbiD trägt, gezeigt werden (McLandsborough et al., 1998).
Das 60 kb große Plasmid pMRC01 trägt 3 Regionen: 1) 16 Tra-Operons für konjugativen Transfer, 2) das Gen für das Bacteriocin Lacticin 3147, das auch gegen *Listeria monocytogenes* wirkt und 3) ein Gen für einen noch unbekannten "Abortive Infection of Phages"-Mechanismus sowie die Gene für die Plasmid-Replikation (Dougherty et al., 1998). Die Sequenz des Plasmids pAH90 enthält die Gene für die Inhibition der Phagenadsorption, ein Restriktions-/Modifikations-Enzym, die Plasmid-Replikation, die Cadmium-Resistenz, den Cobalt-Transport und die konjugative Mobilisierung (O`Sullivan et al., 2001). Es vermittelt Resistenz gegenüber 4 verschiedenen Phagen der c2-Spezies und reduziert die Plaquezahl bei Befall durch sk1 und 712. Stämme, die pMRC01 tragen, sind resistent gegen sk1, 712 (beide 936-Spezies), eb1 und stl1 (beide c2-Spezies), nicht aber gegen die beiden zur c2-Spezies gehörenden Phagen c2 und ml3. Durch Übertragung von pAH90 und pMRC01 auf den plasmidfreien Stamm MG1614 entsteht der Stamm DPC5001, der je ein Gen für die Blockade der Phagenadsorption, ein Restriktionsenzym und einen Abi-Mechanismus trägt und gegen die 6 getesteten Phagen der 936- und der c2-Spezies resistent ist (O`Sullivan et al., 1998).
Die Kombination mehrerer Phagenresistenzmechanismen in einer *L. lactis*-Zelle erhöht also deren Chance sich gegen Phagen zu verteidigen erheblich. Wie Abb. 14 zeigt, enthält in einer Fermentation mit normaler Säuerung jedes Isolat durchschnittlich 3,5 bis 3,8 Phagenresistenzgene. In einer Fermentation mit gestörter Säuerung hingegen treten 2,9 Resistenzgene pro Zelle auf. Schwer abschätzbar ist der Einfluss der Kultivierung auf dieses

Ergebnis. Da gezeigt werden konnte, dass *L. lactis*-Stämme, die durch Konjugation die 4 Plasmide pNP40 (*abiE* und *abiF*, Nisin Resistenz und Inhibition der Injektion der Phagen-DNA), pMU1311 (*abiG* und Dricin), pDI60 (unbekannte Phagenresistenz und Lacticin 481) und pKP100 (unbekannte Phagenresistenz) erhalten hatten, ein verlangsamtes Zellwachstum und dadurch eine geringere Säuerungsaktivität aufwiesen (Pillidge et al., 2000), wurde bei der Kultivierung möglicherweise unbewusst eine Selektion auf Stämme mit dem Phänotyp eines langsamen Wachstums vorgenommen. Nach dem Wegfall des durch die Phagen hervorgerufenen Selektionsdrucks könnten auf dem Nährboden bevorzugt Stämme mit einem geringeren Anteil an extrachromosomaler DNA, also mit weniger Phagenresistenzgenen wachsen. Die Anzahl der pro Isolat vorhandenen Phagenresistenzgene dürfte in der normal säuernden Fermentation also in Wirklichkeit noch höher sein, als es die oben angeführten Zahlen vermuten lassen.

Ob eine Fermentation trotz der Anwesenheit von Phagen zum gewünschten Produkt führt, hängt nicht nur von der absoluten Anzahl der Phagenresistenzgene ab, sondern wird auch von deren Effektivität gegenüber den einzelnen Phagenspezies und den unterschiedlichen Angriffspunkten des Resistenzmechanismuses während der Entwicklung des Phagen bestimmt. Während die Resistenzgene im oben dargestellten Beispiel zu verschiedenen Zeitpunkten der Phageninfektion ansetzen, vermittelt die Kombination der "Abortive Infection of Phages"-Gene *abiG* auf dem Plasmid pMU1311 bzw. *abiE* und *abiF* auf pNP40 ebenfalls ein breiteres Resistenzspektrum gegen Phagen der c2- und der 936-Spezies als die beiden Plasmide alleine (Pillidge et al., 2000).

Im Gegensatz zu den Starterkulturen Probat 8/0, Probat M4, Probat M7, G3-Mix 6 und Probat 505 weisen die Kulturen Probat 8/20 und 8/21 nur das Resistenzgen *abiN* auf. Damit enthält diese Kultur weniger Resistenzgene als die von der Starterkulturfirma zur Verfügung gestellten Einzelstämme W1, W2 und W3, die zwischen 5 und 8 Resistenzgene aufweisen (Tab. 19). Da gerade diese Kulturen nach der Phagen-bedingten Lyse der Kultur Probat 8/0 zum Einsatz kommen sollen, müssten sie, um eine kontinuierliche Säuerung zu gewährleisten, andere, bisher nicht genetisch identifizierbare Phagenresistenzgene enthalten. Bei gestörter Säuerung sollen die Ersatzkulturen nach Herstellerangaben in hohen Dosen zugesetzt werden. Möglicherweise reicht diese Anzahl an Bakterien aus, um die Fermentation zu beenden bevor die zugesetzte Kultur von Phagen lysiert werden kann. Insgesamt erscheint es fraglich, ob es sich bei Probat 8/20 und 8/21 wie bei der standardmäßig eingesetzten Starterkultur Probat 8/0 um eine Mischkultur handelt oder ob ein schnell säuernder Einzelstamm vorliegt. Am Beispiel der Ein-Stamm-Kultur DPC5000, die mit Plasmiden für Phagenresistenz, Lactose-

Verwertung und Casein-Abbau angereichert worden war, konnte gezeigt werden, dass sich die Fermentation weder im Säuerungsverhalten noch in den produktspezifischen Eigenschaften von einer "Mixed-Strain"-Kultur unterscheidet (O`Sullivan et al., 1998).

Inwieweit aus der Literatur bekannte im Labor erzeugte Phagenresistenzen (vgl. Review McGrath et al., 2002a) bereits in den kommerziell erhältlichen Starterkulturen Anwendung finden, lässt sich nur schwer überprüfen, da keine Fremd-DNA zum Einsatz kommt. Durch Einschleusung zahlreicher Kopien eines Phagen-"Origin of Replication" in Starterkulturstämme wie *L. lactis* und *Str. thermophilus* konnte die Vervielfältigung der Phagen-DNA in der Wirtszelle und damit die Freisetzung neuer Phagen dramatisch gesenkt werden (Foley et al., 1998; Hill et al., 1990; O`Sullivan et al., 1993). Eine weitere Erhöhung der Phagenresistenz gegen P335-Phagen konnte durch Kombination dieses Systems mit einem weiteren künstlichen Phagenresistenzprinzip, bei dem die Anti-Sense RNA eines Phagen-DNA-Replikationsgens exprimiert wird, erreicht werden (McGrath et al., 2001). In Anlehnung an die durch Prophagen induzierte Immunität vor Superinfektion konnte eine künstliche Resistenz gegen P335-Phagen hervorgerufen werden (McGrath et al., 2002b). Durch Klonierung des Gens für das Restriktions-/Modifikationsenzym *Lla*I hinter den Phagenpromotor von ϕ31 wurde ein durch die Phageninfektion induziertes Abwehrsystem erzeugt, bei dem das Restriktionsenzym nach Befall durch den Phagen exprimiert wird und anschließend die Phagen-DNA zerstört (Djordjevic et al., 1997). Auch hier konnte der synergistische Effekt mehrerer Phagenabwehrmechanismen durch Kombination dieses Resistenzprinzips mit *abiA* gezeigt werden (Djordjevic und Klaenhammer, 1997).

Liegt in der Starterkultur ein breites Spektrum von Phagenresistenzgenen vor, können als Reaktion auf das Auftreten bestimmter Phagenspezies die jeweils effektivsten Gene zur Abwehr aktiviert werden. In den untersuchten Fermentationen der Starterkultur Probat 8/0, in der ein starker Phagenbefall der 936-Spezies detektierbar war, kommen von den 17 in der Starterkultur (Abb. 8) zur Verfügung stehenden Genen 7 in signifikanten Prozentzahlen über 10% vor. Hierbei handelt es sich um das Gen für die Verhinderung der Phagenadsorption, 5 verschiedene Restriktionsenzyme und um das "Abortive Infection of Phages"-Gen *abiB* (Abb. 10). Die primäre Verteidigungsstrategie basiert auf einer Maskierung der Zelloberfläche mit Exopolysacchariden, die die Adsorption der Phagen an ihren Rezeptor verhindern. Dieses Resistenzprinzip ist gegen die 3 häufigsten Phagen-Spezies wirksam (Forde und Fitzgerald, 1999a). Auch die 5 Restriktionsmechanismen dienen nicht der gezielten Abwehr einer Phagenspezies, sondern basieren auf der Unterscheidung von Eigen- und Fremd-DNA. Neben den beiden TypI Restriktionsenzymen *Lld*I (Deng et al., 1999) und *Lla*1403 (Schouler et al.,

1998a), bei denen der Schnitt der DNA nicht an einer bestimmten Sequenz erfolgt, kommen noch drei Restriktionsendonukleasen des Typs II mit unterschiedlicher Schnittstellenerkennung vor: *Lla*II (5'-↓GATC-3') (Moineau et al., 1995a), *Lla*B I (5'-C↓TRYAG-3') (Nyengaard et al., 1996) und *Lla*D II (5'-GC↓NGC-3') (Madsen und Josephsen, 1998b)). Damit überwiegen bei der Abwehr des Phagenangriffs Resistenzmechanismen, die gegen alle Arten von Phagen wirken. AbiB hingegen degradiert durch seine RNase-Aktivität das späte Phagentranskript von bIL170. Die Reifung des sehr ähnlichen Phagen bIL41 wird aber nicht beeinträchtigt (Cluzel et al., 1991).

Bei den untersuchten Fermentationen der Starterkultur Probat 8/0 korreliert das Säuerungsverhalten mit der Zu- bzw. Abnahme der Anzahl der Gene *ads*, *lld*I, *lla*1403, *lla*II, *lla*B I, *lla*D II und *abiB*. Die Fermentationen mit normaler Säuerung weisen einen im Vergleich zur Starterkultur gleichen oder gesteigerten Anteil an Phagenresistenzgenen auf (Abb. 10). Die Gene für die Typ I-Restriktionsenzyme wurden durch Primerpaare, die gegen die Restriktionsuntereinheit gerichtet waren, in 90-100% der Isolate nachgewiesen. Möglicherweise handelt es sich dabei nicht nur um je ein Enzym, sondern um eine Anzahl ähnlicher Enzyme, die durch homologe Rekombination der *hsdS*-Untereinheiten entstanden sind. Durch Chimärenbildung aus verschiedenen *hsdS*-Untereinheiten, die auf zwei Plasmiden in der gleichen *L. lactis*-Zelle enthalten waren, konnte am Beispiel von pAH33 und pAH82 die Entstehung neuer Typ I-Restriktionsenzyme mit unterschiedlicher Spezifität gezeigt werden (O`Sullivan et al., 2000).

Die Gene für die Blockierung der Phagenadsorption und AbiB sind in einer normal säuernden Fermentation in 70-80% der Isolate nachweisbar, in einer Fermentation mit gestörter Säuerung nur in 58 bzw. 37%. Während die Adsorption des Phagen λ an die Oberfläche der *E. coli*-Zelle gut untersucht ist (Gehring et al., 1987; Wang et al., 2000), liegen im Bereich der Milchsäurebakterien nur wenige Studien vor, die die Wechselwirkung zwischen Phage und Wirt beschreiben. Der Rezeptor des Phagen sk1 besteht aus Rhamnose und Glucose-Resten (Valyasevi et al., 1994). Auch bei den *Streptococcus thermophilus*-Phagen CYM und 0BJ sind Kohlenhydrate wie Glucosamin und Rhamnose bzw. Ribose am Oberflächenrezeptor beteiligt (Quiberoni et al., 2000). Wie bei *L. lactis* und *Lactobacillus helveticus* beobachtet wurde, besteht ein enger Zusammenhang zwischen spontan auftretenden Mutanten mit veränderter Oberflächenbeschaffenheit und einem phagenresistenten Phänotyp (Crow et al., 1995b; Reinheimer et al., 1995).

Beim Vergleich des Phagenresistenzgenspektrums der Starterkultur Probat 8/0 und den daraus hervorgegangenen Fermentationen, fällt auf, dass in der im Handel erworbenen

Speisequarkprobe Q1 zusätzlich das Gen für die Inhibition der Phagen-DNA-Injektion enthalten waren, das in der Starterkultur nicht nachgewiesen werden konnte. Andererseits konnten *abiG1* und *abiG2* nicht mehr identifiziert werden. Das Fehlen dieser Abwehrmechanismen ist möglicherweise auf den Verlust von Plasmid-codierten Eigenschaften zurückzuführen. Das Auftreten neuer Resistenzgene könnte auf Schwankungen des Resistenzgenspektrums in der Starterkultur zurückzuführen sein. Vermutlich handelt es sich aber um ein methodisches Problem in puncto Nachweisgrenze. Da die oben aufgeführten Gene in der Starterkultur in weniger als 3% der Isolate vorhanden sind, müssten für den sicheren Nachweis mehrere Hundert Stämme untersucht werden. Die Analyse der Quarkfermentation, in der das Gen für die Blockade der DNA-Injektion auftritt, wurde unter dem Gesichtspunkt "nachweisbar" oder "nicht nachweisbar" nicht aber unter quantitativen Aspekten durchgeführt. Tritt das Gen, das gegen Phagen der c2-Spezies wirkt, in der untersuchten Fermentation in signifikant höherer Konzentration als in der Starterkultur auf, könnte das darauf hindeuten, dass hier neben den hauptsächlich vorkommenden Phagen der 936-Spezies auch c2-Phagen eine Bedrohung darstellten (Geller et al., 1993).

Die mit den generierten Primerpaaren erhaltenen PCR-Produkte wiesen meist die erwartete Länge auf und zeigen hohe Sequenzidentitäten zu den aus der Literatur bekannten Sequenzen (3.2.3). Das ca. 830 bp lange PCR-Produkt, das neben dem berechneten 625 bp-Fragment bei der *abiP*-PCR auftrat, zeigt am Anfang und am Ende große Ähnlichkeit zur Sequenz in der Datenbank. Dazwischen liegt ein neuer 390 bp langer Bereich. Diese Variante des AbiP-Proteins würde 325 Aminosäuren aufweisen und wäre 33% länger als das ursprüngliche Protein (Abb. 9). Ob der hier gefundene Abkömmling von AbiP Phagenresistenz vermittelt und ob das Phagen-Spektrum, gegen das die Resistenz wirkt, vom Ursprungsprotein abweicht, kann nur in weiteren Experimenten geklärt werden. Da die "Abortive Infection of Phages"-Gene nur sehr geringe Sequenzähnlichkeiten aufweisen, wäre das der erste Hinweis darauf, das es sich bei diesen Resistenzgenen nicht nur um je ein Gen, sondern möglicherweise um Genfamilien handelt.

Die meisten Phagenresistenzgene befinden sich auf Plasmiden (Tab. 1 und Tab. 2), deren konjugativer Transfer zwischen den verschiedenen *Lactococcus*-Stämmen ausführlich beschrieben wurde (Neve et al., 1984; Neve et al., 1987). Der Transfer von pMRC01, das das Lacticingen und ein Phagenresistenzgen trägt, tritt in *L. lactis* mit einer Häufigkeit von 10^{-3} auf (Coakley et al., 1997). Ihre Stabilität hängt stark von ihrer Größe ab. Am Beispiel der Lactose-Verwertung konnte gezeigt werden, dass Plasmide, die den Lac^+-Phänotyp vermitteln und kleiner als 5 MDa sind, nicht so schnell verloren gehen wie Plasmide mit einem

Molekulargewicht größer als 10 MDa (Sinha, 1991). Der konjugative Gentransfer findet dabei nicht nur zwischen Starterkulturorganismen der gleichen Spezies sondern auch zwischen nahe verwandten Spezies wie *Lactococcus* und *Streptococcus* (Gasson, 1983; Kleinschmidt et al., 1993) bzw. zwischen Starterkulturorganismen und für die Starterkultur untypischen Organismen wie *B. subtilis* statt (Gasson, 1993; Heller et al., 1995; Lorenz und Wackernagel, 1994; Zenz et al., 1998). Beispielsweise wurde der konjugative Transfer von pSRQ700 mit dem Gen für das in der Starterkultur Probat 8/0 häufig vorkommende Restriktionsenzym *Lla*II von *Lactococcus* auf *Streptococcus thermophilus* beschrieben (Moineau et al., 1995b).

Konjugationsereignisse und der damit verbundene Selektionsvorteil in Bezug auf Phagenresistenz, Säuerungsverhalten und weitere nicht untersuchte Eigenschaften dürften auch die Ursache für das verstärkte Auftreten von RAPD-Mustern mit zahlreichen Banden in den Fermentationen mit kontinuierlicher Säuerung sein (Abb. 13). Bei der Fermentation mit gestörter Säuerung überwiegen RAPD-Typen mit nur einer im Vergleich zum Grundtyp C zusätzlichen Bande. In diesen Isolaten konnten durchschnittlich weniger Phagenresistenzgene identifiziert werden. Außer für die RAPD-Typen H und J korreliert die Anzahl der RAPD-Banden mit einer hohen oder geringen Anzahl von Phagenresistenzgenen.

Wie von Gasson et al. gezeigt werden konnte, inserieren auch in *L. lactis* die Plasmide ins Chromosom und können anschließend wieder mobilisiert werden (Gasson et al., 1995; Gasson et al., 1992). Beispielsweise wurde die Sequenz des 450 bp-Fragments des Plasmids pRS01 (EMBL U50902), für das die RAPD-Primer ursprünglich ausgewählt worden waren (vgl. Irps, 1998), auch im Chromosom von *L. lactis* IL1403 identifiziert (EMBL X89922) (Bolotin et al., 2001). Es ist also nicht verwunderlich, dass sich hinter den RAPD-Typen H und J, die durch diese Bande charakterisiert werden, kein einheitliches Resistenzgenmuster verbirgt, sondern in diesen beiden Fällen die Sensitivität des RAPD-Fingerprintings für eine eindeutige Typisierung der Isolate nicht ausreicht.

Nach wie vor gilt der konjugative Transfer von natürlich vorkommenden Plasmiden als die vom Konsumenten am ehesten akzeptierte Art Starterkulturstämme mit multiplen Phagenresistenzen zu erzeugen (Allison und Klaenhammer, 1998).

4.2.2. Säuerungseigenschaften und Bildung von Aromakomponenten

Zusätzlich zur Resistenz gegenüber Phagen müssen Starterkulturen für fermentierte Milchprodukte Eigenschaften wie gute Geschmacks- und Geruchscharakteristika und eine schnelle Säuerung aufweisen (Davidson und Hillier, 1995). Voraussetzung dafür ist der Lactose- und Citrat-Metabolismus, durch den einerseits mit der Herstellung von Milchsäure

eine Absenkung des pH-Werts einher geht und aus dem andererseits Aromen wie Diacetyl, Acetoin und 2,3-Butandiol bzw. das Gas CO_2 entstehen (Dougherty et al., 1998). Letzteres führt bei unvollständigem Abbau des Citrats vor der Verpackung der Produkte zur Bombage.
Die qualitative Untersuchung von Starterkulturen ermöglicht eine Bestandsaufnahme der vorhandenen Gene, erlaubt aber keine Rückschlüsse auf die Häufigkeit und die Expression dieser Sequenzen (Tab. 22). Die Erfassung dieser Parameter wäre nur durch eine Gen-Expressionsanalyse mit mRNA und einer quantitativen PCR möglich.
Wie schon am Beispiel der Resistenzgene beobachtet, sind die Gene des Citrat- und Lactose-Metabolismus bei den untersuchten Fermentationen der Starterkultur Probat 8/0 in den normal säuernden Fermentationen häufiger nachweisbar als in Kulturen mit gestörter Säuerungsaktivität. Für die α-Acetolactat-Decarboxylase und die Pyruvat-Formiat-Lyase beträgt diese Differenz sogar 31% bzw. 27% (Abb. 15).
Wie im Fall der Phagenresistenzgene sind diese Unterschiede vermutlich auf den Verlust von Plasmiden zurückzuführen. Durch das Plasmid pLP712, das Gene für die Lactose-Fermentation und den primären Casein-Abbau trägt, zeigt der *L. lactis*-Stamm DPC5013 gute Fermentationseigenschaften und eine ebenso schnelle Säuerung wie herkömmliche Starterkulturen, ist aber sensitiv gegenüber den 3 häufigsten Phagenspezies. Erst durch Konjugation mit den Resistenzplasmiden pAH90 und pMRC01 entsteht die "Ein-Stamm-Kultur" DPC5000 mit guten Fermentationseigenschaften bei gleichzeitiger Phagenresistenz (O`Sullivan et al., 1998). Die Säuerungseigenschaften dieser aus Konjugationsereignissen hervorgegangenen "Ein-Stamm-Kultur" wurden im sogenannten "Heap und Lawrence"-Test überprüft (Heap und Lawrence, 1976). Dabei wird der Säuerungsverlaufs über 10 Tage bei An- oder Abwesenheit von verschiedenen Phagenspezies bzw. undefinierten Phagencocktails aus der Industrie überprüft. Der Vergleich des Säuerungsverlaufs einer kommerziell erhältlichen Starterkultur zur Herstellung von Cheddar-Käse und der Einstamm-Kultur DPC5000 zeigt keine Unterschiede. Beide Kulturen haben nach 5 Stunden den Endpunkt der Säuerung bei pH 5,4 erreicht. Die durch diese beiden Kulturen hergestellten Käse unterschieden sich auch nur geringfügig bezüglich ihres Fett-Gehalts und des Salz/Feuchtgewicht-Verhältnisses (O`Sullivan et al., 1998). Es ist also möglich eine "Ein-Stamm-Kultur" mit guten Fermentationseigenschaften und hoher Phagenresistenz zu erzeugen.
Dass das nicht immer gelingt, zeigt das Beispiel einer ebenfalls durch Konjugation hergestellten "Ein-Stamm-Kultur", die folgende 4 Plasmide enthält: pNP40 (*abiE* und *abiF*, Nisin Resistenz und Inhibition der Injektion der Phagen-DNA), pMU1311 (*abiG* und Dricin),

pDI60 (unbekannte Phagenresistenz und Lacticin 481) und pKP100 (unbekannte Phagenresistenz). Die Kultur weist zwar eine hervorragende Resistenz gegenüber Phagen auf, zeigt aber verlangsamtes Zellwachstum und Säuerung (Pillidge et al., 2000).

Bei der Suche nach neuen Starterkulturstämmen darf die Strategie also nicht darin bestehen möglichst viele Plasmide auf einen Wirtsstamm zu übertragen. Vielmehr erscheint eine Isolation von aus der Fermentation hervorgegangenen, gut säuernden Stämmen mit vielen verschiedenen Phagenresistenzgenen zur Herstellung einer neuen Kultur geeignet. Dafür kommen beispielsweise die Isolate C IIv5 und C IIv30, die jeweils die 10 Phagenresistenzgene *ads*, *lld*I, *lla*1403, *lla*II, *lla*B I, *lla*D II, *abiB*, *abiG1*, *abiG2* und *abiN* enthalten, in Frage. Wie Untersuchungen von Peters gezeigt haben, zeichnen sie sich durch eine schnelle Säuerung aus und gehören dem RAPD-Typ J an (Peters, 1999). Auch das schnell säuernde Isolat SWE 40 (RAPD H) trägt 6 Phagenresistenzgene (*ads*, *lld*I, *lla*1403, *lla*II, *lla*D II und *abiB*). Zur Rotation der Starterkulturen bietet sich möglicherweise auch eine Kultur aus schnellsäurnden Stämmen mit wenigen Phagenresistenzgenen wie C Vv43 (RAPD A; *ads* und *lld*I) und mittelschnellsäurnden Isolaten wie C IX l 42 mit 6 Resistenzgenen (RAPD H; *ads*, *lld*I, *lla*1403, *lla*II, *lla*D II und *abiB*) an.

Für die Ausbildung von Geschmackskomponenten ist das Verhältins zwischen den exprimierten Genen entscheidend. Aus diesem Grund sollten diese Eigenschaften zukünftig auf mRNA-Ebene untersucht werden. Eine Inaktivierung des Gens für die Lactat-Dehydrogenase (LDH) verursacht einen gravierenden Einschnitt in den Lactose-Metabolismus mit dem Ergebnis, dass nicht mehr Milchsäure als metabolisches Endprodukt auftritt, sondern Ethanol, Formiat und Acetoin. Die Acetoin-Produktion von LDH-negativen *L. lactis*-Stämmen, die auf Zucker wachsen, ist vergleichbar mit der Acetoin-Produktion von *L. lactis*-Stämmen der Biovariation *diacetylactis*, die auf Zucker und Citrat wachsen. Die Überexpression der α-Acetolactat-Synthase, die vom Gen *ilvBN* kodiert wird, führte in *L. lactis* ebenfalls zu einer erhöhten Acetoin-Produktion. Dahingegen bewirkt die Inaktivierung des *aldB*-Gens für die α-Acetolactat-Decarboxylase eine Erhöhung der α-Acetolactat- und Diacetyl-Produktion auf Kosten der Acetoin-Herstellung (Gasson et al., 1996b).

Der Einfluss von Autolyse (Crow et al., 1995a) oder Phagen-bedingter Lyse (Crow et al., 1995c) der Starterkulturbakterien auf die Käsereifung zeigt den engen Zusammenhang zwischen Phagen bzw. Phagenresistenzgenen und der Ausbildung von Aromakomponenten und der Produktreifung. Durch die Lyse werden intracytoplasmatische Peptidasen freigesetzt, die wiederum den proteolytischen Reifungsprozess beschleunigen und Bitter-Peptide abbauen (McGrath et al., 2002a). Durch Einschleusung der Phagengene Holin und Lysin in *L. lactis*-

Zellen werden einige Starterkulturstämme lysiert. Daraus resultiert die Freisetzung von Aminopeptidase N, die für die Verstoffwechselung von Bitterstoffen verantwortlich ist, und ein Anstieg des L-LDH-Gehalts auf das vierfache. Das wiederum führt zur schnelleren Reifung des Käses (de Ruyter et al., 1997). Auch am Beispiel von *Str. thermophilus* konnte der Einfluß von Autolyse und Lysogenie auf die Herstellung von Milchprodukten gezeigt werden (Husson-Kao et al., 2000; Husson-Kao et al., 1999).

Neben dem untersuchten Lactose- und Citrat-Metabolismus tragen also auch proteolytische Prozesse oder die Lyse der Starterkulturbakterien zur Ausbildung von Geschmacks- oder Geruchskomponenten und zur produkttypischen Textur bei (Daly et al., 1998). Um Aussagen über die sensorische Qualität und die Beschaffenheit eines Produktes machen zu können müßten weitere Enzyme und die Expression aller genetischen Marker in die Untersuchung mit einbezogen werden. Da die Ausbildung von Geruchs- und Geschmackskomponenten teilweise auch durch Autoxidationsprozesse hervorgerufen wird, bei denen Bausteine aus chromosomal kodierten Stoffwechselvorgängen als Substrat dienen, ist eine Analyse dieser Produkte mit molekulargenetischen Methoden nicht möglich. Statt dessen erfolgt ihre Überwachung mit Gaschromatographie oder sogenannten "elektronischen Nasen" (de Vos et al., 1998; Friedrich und Acree, 1998)).

4.3. Phagenspezies in Starterkulturen und Fermentationsproben

Die Phagen der 936-Spezies gelangen nicht durch die Starterkultur sondern durch Kontaminationsquellen im Bereich der Produktionsanlagen in die Fermentation (Abb. 18). Geringe Restmengen innerhalb des Rohrleitungsystems oder der Austausch mit der Raumluft an den nach oben offenen Labtanks reicht aus um nach bereits 4 Stunden Fermentationszeit einen Phagentiter von 10^8-10^9 Pfu/ml zu erreichen.

Während einer einjährigen Feldstudie über die Phagenbelastung in Fermentern, die zur Produktion von Buttermilch verwendet wurden, konnten in 23 Bundesstaaten der USA 27 verschiedene Phagen auf der Basis von DNA-Ähnlichkeit, Elektronenmikroskopie, Genomgröße, Restriktionsmuster und Wirtsspezifität charakterisiert werden (Moineau et al., 1996). 80% der isolierten Phagen gehörten zur 936-Spezies und je 10% der Isolate zur den Spezies c2 und P335. Die 936-Phagenspezies ist also sehr weit verbreitet und führt zu enormen finanziellen Verlusten.

Neben der PCR-Bande für die Phagen der 936-Spezies zeigt auch das Amplifikat mit für die P335-Spezies spezifischen Primern ein Signal (Abb. 19). Es tritt nicht nur bei Fermentationsproben sondern auch bei der Analyse verschiedener Starterkulturchargen und

Säureweckeraliquots auf. Durch eine Verdünnungsreihe konnte der Phagentiter in den Starterkulturen 8/0 und 8/21 mit PCR auf 10^9 Phagen pro ml bestimmt werden. Während 936-Phagen offenbar durch die Milch oder die Produktionsanlagen in den Quark gelangen, wird DNA der P335-Phagen durch die Starterkultur in die Fermentation eingebracht.

Im Plaque-Test weisen diese Proben allerdings einen geringeren Phagentiter als 10 Pfu/ml auf. Diese Diskrepanz kann darauf zurückzuführen sein, dass im Gegensatz zum Plaque-Test beim PCR-Nachweis nicht nur lebende infektiöse Phagen erfaßt werden, sondern auch temperente Phagen, die erst unter „Streßbedingungen“ eine Bedrohung für die Fermentation darstellen. Bei der Sequenzanalyse von *Lactococcus lactis* IL1403 wurden sechs verschiedene Prophagen im Bakteriengenom identifiziert (Bolotin et al., 2001), von denen drei hohe Sequenzähnlichkeiten zu Phagen der P335-Spezies aufweisen (Chopin et al., 2001).

Ob die Anwesenheit von Phagen der P335-Spezies produktionstechnisch relevant ist, bleibt abzuwarten. Möglicherweise ist eine partielle Lyse der *Lactococcus*-Stämme für das Produkt nicht nur ungefährlich sondern sogar nötig ist, um Proteasen, Geschmacks- und Geruchsstoffe freizusetzen und die produkttypische Textur zu gewährleisten (vgl. 4.2.2 und Gasson, 1996a; O`Sullivan et al., 2000).

Von *E. coli* ist bekannt, dass lambdoide Phagen gegenseitige Superinfektionsimmunität bewirken. Immunität gegen die Infektion weiterer Phagen wurde auch für ORF 203 des *Streptococcus thermophilus*-Phagen ϕSfi21 beschrieben, der eine hohe Homologie zu ORF 258 des *Lactococcus*-Phagen BK5-T aufweist (Bruttin et al., 1997). Möglicherweise schützen die in der Starterkultur vorhandenen Prophagen die Kulturstämme vor nahe verwandten virulenten Vertretern der P335-Spezies und vermeiden so den Säuerungsausfall während der Fermentation.

Ungeachtet der Verhältnisse in der Starterkultur Probat 8/0 und deren Fermentationen haben Phagenstudien der letzten Jahre gezeigt, dass auch Phagen der P335-Spezies eine wachsende Bedrohung für die Milchwirtschaft darstellen (Moineau et al., 1993b; Moineau et al., 1994). Die Phagenspezies c2 konnte bisher in keiner der von uns untersuchten Proben nachgewiesen werden. Wie eine kanadische Feldstudie zeigt, stellten sie 1992 eine Bedrohung für Käsereien dar, in denen auch *Lactococcus*-Starterkulturen zur Herstellung von Frischkäse und Quark zum Einsatz kamen. Hier konnten 57% der untersuchten Phagen der c2-Spezies zugeordnet werden, 37% gehörten zur 936-Spezies und 7% zur P335-Spezies (Moineau et al., 1992).

4.4. Vergleichende Genomanalyse am Beispiel des Phagen P482

4.4.1. Methodische Aspekte bei der Ermittlung der Nukleotidsequenz, cos-Site und Transkripte

Die Nukleotidsequenz des Phagen P482

Die komplette Sequenz des Phagen P482 umfasst 30945 bp doppelsträngige DNA, die durch eine Kombination aus "Shotgun"-Klonierung und "Chromosome Walking" ermittelt wurde. Aus Abb. 25 geht hervor, dass die für die Shotgun-Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme die Phagen-DNA nur sehr unregelmäßig schneiden. Beispielsweise liegt im 9000 bp umfassenden Sequenzabschnitt zwischen 13 und 22 kb keine einzige Schnittstelle für Sau3A. Möglicherweise ist das auf den Selektionsdruck, den die von *lla*II, *lla*A I und *lla*KR2I codierten Phagenabwehrmechanismen ausüben, zurückzuführen (Moineau et al., 1995a; Nyengaard et al., 1993; Twomey et al., 1998). Diese Restriktionsenzyme von *L. lactis* erkennen die gleiche Zielsequenz wie Sau3A. Phagen in denen nur wenige dieser Schnittstellen vorkommen entgehen der Restriktion. Die verbleibenden GATC-Schnittstellen könnten von der in ORF 32 identifizierten *dam*-ähnlichen Methylase modifiziert und damit ebenfalls schwer zugänglich sein. Methylierungen dieser Art verursachen häufig methodische Schwierigkeiten beim Einsatz von Restriktionsendonukleasen (Minko et al., 2001).

Für jeden DNA-Abschnitt liegen durchschnittlich 3,8 unabhängige Sequenzierreaktionen vor. Im Fall des zur c2-Spezies gehörenden Phagen bIL67 betrug die durchschnittliche Redundanz des Sequenziervorgangs 6,2 (Schouler et al., 1994). Da in weiten Bereichen des Phagengenoms Sequenzidentitäten zu anderen Phagen der 936-Spezies zwischen 80 und 100% vorliegen (Chandry et al., 1997; Crutz-Le Coq et al., 2002), kann die P482-Sequenz als gesichert betrachtet werden.

In zwei unabhängig sequenzierten Klonen (Plasmidlück600 und P12-45.11nest2) lagen Sequenzabschnitte, die aus den konservierten Bereichen vor bzw. nach ORF 11 stammen, hintereinander. Durch PCR-Amplifikation konnte gezeigt werden, dass das Lysat zwei Varianten des Phagen P482 enthält (Abb. 20). Im Gegensatz zur vollständigen Sequenz des Phagen P482, die 30945 bp umfaßt, besitzt P482ΔORF11 eine 28910 bp lange Nukleotidsequenz in der der Genabschnitt des ORFs 11 deletiert ist. Damit wäre die Insert-freie Variante von P482 den Phagen sk1 und F4-1 ähnlicher (Chandry et al., 1997; Chung et al., 1991), während die Sequenz, die ORF 11 enthält, größere Ähnlichkeit mit bIL170 und bIL41 aufweist (Crutz-Le Coq et al., 2002; Parreira et al., 1996b). In den IGR vor und nach ORF 11 wurden direkte Sequenzwiederholungen lokalisiert, die auf einen möglichen

Signalstrukturcharakter dieser Abschnitte hindeuten (vgl. 3.5.2.4 und Abb. 24). Weitere Strukturmerkmale wie Inverted Repeats, die Rückschlüsse auf Rekombinations- oder Transpositionsereignisse im ORF 11 zulassen, wurden nicht identifiziert.

Die Anwesenheit von Phagenresistenzgenen führt durch Selektionsdruck zu Rekombinationsderivaten von Phagen der P335-Spezies. Am Beispiel von ϕ31 konnte gezeigt werden, dass nach dem Befall von Stämmen, die ein Plasmid mit dem Resistenzmechanismus *per31* tragen, neue Varianten von ϕ31 auftreten (Dinsmore und Klaenhammer, 1994; O`Sullivan et al., 1993). Die genetische Charakterisierung von vier ϕ31-Abkömmlingen zeigte, dass neben dem Austausch der "Origin of Replication"-Region auch neue Gene auftreten, die Ähnlichkeiten zur *E. coli* "Holliday Junction"-Resolvase Rus oder zum Rekombinationsprotein BET des Phagen λ aufweisen (Durmaz und Klaenhammer, 2000). Der Ursprung dieser neu erworbenen DNA-Fragmente dürfte das Chromosom des Wirtsstammes NCK203 sein. Temperente Phagen der P335-Spezies oder deren Reste auf dem Bakterienchromosom könnten als Ziel für Genaustausche durch homologe Rekombination dienen (Quiberoni et al., 2001).

Ein Rekombinationsprozess zwischen dem P335-Phagen ul36 und dem Chromosom des Wirts wurde auch unter dem Selektionsdruck von AbiC beobachtet (Moineau et al., 1994). Der neu entstandene Phage ul37 hat eine längere DNA-Sequenz und unterscheidet sich bezüglich der Basisplatte und der Schwanzmorphologie (Bouchard und Moineau, 2000). Wie in P482 fanden die Genomveränderungen also im Bereich der späten Phagengene statt. Im Gegensatz zur P335-Spezies, von der sowohl lytische wie auch temperente Vertreter bekannt sind, wurden bisher lediglich lytische Phagen der 936-Spezies identifiziert. Im Fall von P482 können durch homologe Rekombination mit dem Bakterienchromosom nur Gene von Phagen anderer Spezies in das P482-Genom inseriert werden. Neben ORF 11 trifft diese Annahme auch auf die P482-spezifischen ORFs 13, 31, 37, 47 und 50 zu. Die ORFs 16, 24, 38, 40, 41, 43 und 46 weisen neben Ähnlichkeiten zu sk1 und bIL170 auch Verwandtschaft mit Genen der P335- bzw. der c2-Spezies oder mit Genen von Phagen anderer Bakterien wie z. B. *Streptococcus thermophilus* auf. Dieser Befund unterstützt die Modular-Theorie eines gemeinsamen Genpools für Phagen der gleichen Kreuzungsgruppe (vgl. 4.4.3)

Transkription der Phagengene

Aufgrund der großen Ähnlichkeit zu DNA-Sequenzen von Phagen der 936-Spezies wurde die DNA des Phagen P482 analog in drei zeitlich getrennte Transkriptionseinheiten unterteilt. Wie am Beispiel des Phagen sk1 demonstriert, treten frühe, mittlere und späte Phagentranskripte auf (Beresford et al., 1993; Chandry et al., 1994a). Die Transkription der frühen Phagengene, die für Replikation, Rekombination und Transkription verantwortlich sind, wird in sk1 durch sieben Promotoren initiiert (Chandry et al., 1997). Auch in *Lactococcus*-Phagen die nicht zur 936-Spezies gehören wird die Transkription der frühen Phagengene durch mehrere Promotoren und Terminatoren reguliert. So wurden in c2 sechs Promotoren identifiziert (Lubbers et al., 1995). Auf der DNA-Sequenz des Phagen P482 konnten im Bereich der frühen Phagengene 6 potentielle Promotoren identifiziert werden (Tab. 24). Die hohe Konserviertheit der Bereiche in denen die Promotoren P_{E28}, P_{E37}, P_{E43}, P_{E51} liegen, läßt vermuten, dass diese nicht nur in sk1 sondern auch in P482 funktionsfähig sind. P_{E35} und P_{E47} weisen zwar die für *L. lactis* charakteristischen Sequenzen in der RBS, der -10- und der -35-Region auf, ob diese potentiellen Promotoren aber tatsächlich Startpunkte für die Transkription der frühen Phagengene darstellen, kann nur experimentell z.B. durch Northern-Blotting geklärt werden.

Unter der Voraussetzung, dass die durch Computeranalyse ermittelten Terminatoren "in vivo" die Aktivität der RNA-Polymerase stoppen, bleibt ungeklärt wie der Transkriptionsstart nach dem Terminator T_3 vor ORF 49 erfolgt. Im *Lactococcus*-Phagen bIL67 wurden bei den frühen und späten Transkripten Promotoren identifiziert, die eine "extended -10-Box" aufweisen (TATGCTATAAT und TTTTTGATATATT), bei denen die -35-Sequenz aber fehlt (Lubbers et al., 1995). Promotoren dieser Art (A/TntnTGa/tTATAAT, -35-Box fehlt) sind auch aus *E. coli* bekannt und erlauben eine durch σ^{70} initiierte Transkription (TGTTTAAAT) (TGNTAAT) (Keilty und Rosenberg, 1987). Die durch den "extended -10"-Promotor initiierte Transkription ist genauso effizient wie die normale Initiation durch σ^{70}, bietet aber den Vorteil einer gezielten Regulation durch Aktivator-Proteine (Kumar et al., 1993). Bidnenko et al. (1995) konnten am Beispiel des Phagen bIL66 zeigen, dass dieser Mechanismus auch in *Lactococcus* funktioniert (Bidnenko et al., 1995) (vgl. auch Anba et al., 1995).

Durch Terminator 2 stoppt die an den Promotoren P_{E47} und P_{E43} initiierte Transkription nach ORF 38 (23276 - 23309 bp). Die -35-Region des darauffolgenden Promotors P_{E37} liegt im Loop des Terminators. Da die Sequenz dieses Terminators mit der Promotor-Sequenz von P_{E37} überlappt, könnte eine ähnlich wie im Phagen λ funktionierende Anti-Termination notwendig sein, um die Sekundärstruktur des Terminators aufzulösen und die -35 und -10-

Region des Promotors zugänglich zu machen. Möglicherweise stellt ein Genprodukt der ORFs 51 bis 38 ein Analogon zum λ-Proteins N dar, das den Stop der RNA-Polymerase am Terminator T_2 verhindert. Die Gene des Phagen P482 würden dann ebenfalls in frühe (ORFs 51 bis 38) und verspätet frühe Gene (ORFs 37 bis 23) unterteilt werden können.
Die Transkription der mittleren Phagengene erfolgt von P_{M52} aus und endet am Terminator T_4 vor der potentiellen *cos*-Site (Abb. 25). Bei allen Phagen, die Sequenzähnlichkeit zu P482 aufweisen, handelt es sich um Phagen bei denen der Verpackungsmechanismus der Phagen-DNA von der *cos*-Site abhängt. Die *cos*-Site von Milchsäurebakterien-Phagen besteht aus einem 9 bis 15 Nukleotide langen, 3‘-überhängenden, einzelsträngigen DNA-Abschnitt mit komplementärer Basensequenz (Brüssow, 2001a). Im Phagen λ entstehen die cohesiven Enden durch die Terminase, die bei der Verpackung der Phagen-DNA in die leeren Köpfe mitwirkt. Am Beispiel von sk1 konnte gezeigt werden, dass die *cos*-Site aus einem 11 bp langen 3'-Überhang besteht (Chandry et al., 1994b). In den Datenbanken stehen 7 weitere Sequenzen zur Verfügung, die in diesem Bereich die identische Nukleotidsequenz zu P482 aufweisen, und alle zur 936-Spezies der *L. lactis*-Phagen gehören (bIL170, P008, bIL41, F4-1, phivi, bIL66 und 712). In der die *cos*-Site flankierenden IGR zwischen den mittleren und späten Phagengenen wurden zahlreiche direkte und indirekte Sequenzwiederholungen lokalisiert (Abb. 22). Für sk1 und 712 wurde gezeigt, dass diese Elemente Teil einer Signalstruktur sind, die Resistenz oder Sensitivität gegenüber dem Phagenresistenzgen *abiF* vermittelt (Rince et al., 2000). Wie Abb. 22 zeigt, fehlen beim Phagen P482 einige Sequenzabschnitte, die für die durch *abiF* vermittelte Resistenz nötigen wären. Somit spielt es keine Rolle, dass dieses Resistenzgen nicht in der Starterkultur enthalten ist.

4.4.2. Funktionszuordnung zu den hypothetischen Proteinen des Phagen P482

Die Strukturgene des Phagen P482 - ORFs 1 bis 20

Durch Sequenzvergleich mit den Datenbanken konnte diversen ORFs eine Funktion zugeordnet werden. Speziell im Bereich des späten Transkripts der Phagen-DNA liegen die Ähnlichkeiten zwischen 80 und 100%. So dürfte es sich bei ORF 1 und 2 um Untereinheiten der Terminase handeln. In *Siphoviridae*-Phagen ist das Protein für die Verpackung der Phagen-DNA in den leeren Phagenkopf und die Entstehung der 3'-überhängenden *cos*-Site verantwortlich (Brüssow, 2001a). Die kleine Terminase-Untereinheit des Phagen λ besitzt die DNA-bindende Domäne, gefolgt von einer ATP-Bindungsstelle (Becker und Gold, 1988). Die

große Untereinheit trägt ebenfalls eine ATP-Bindungsstelle und die Endonuklease-Funktion (Davidson und Gold, 1992). Ein Vergleich der Proteinsequenzen der großen Untereinheit der Terminase zeigt die Ähnlichkeit dieses Proteins mit Terminasen anderer *Lactococcus*-Phagen, aber auch mit Sequenzen von *Streptococcus*-, *Lactobacillus*- und *Staphylococcus*-Phagen (Desiere et al., 2001).

Bei allen *Lactococcus*-Phagen mit isometrischen Köpfen folgen auf die Terminase-Gene ORFs, die an der Struktur des Phagenkopfes und des Kragens beteiligt sind (Lucchini et al., 1998). So dürfte es sich bei ORF 4 um das Verbindungsprotein zwischen Phagenkopf und Schwanz, bei ORF 5 um das Gerüstprotein und bei ORF 6 um das Hauptprotein des Phagenkopfes von P482 handeln. Wie der Vergleich mit *Streptococcus*-Phagen zeigt, treten dabei auch Sequenzähnlichkeiten zu Phagen anderer Milchsäurebakterien auf (Brüssow und Desiere, 2001b).

Im darauffolgenden Bereich befinden sich Strukturgene, die für den Aufbau des Phagenschafts, der Basisplatte und die Schwanzfibern von Bedeutung sind. ORF 12 kodiert für das Hauptprotein des Phagenschwanzes und ORF 16 für "tape meassure" - ein Maßband für die Länge des Phagenschafts. Am Beispiel des Phagen TP901-1 konnte der Einfluß der Länge dieses ORFs auf die Länge des Schaftes demonstriert werden (Pedersen et al., 2000). So verkürzte bzw. verlängerte sich der Phagenschaft durch die Einführung von "in frame"-Deletionen bzw. -Insertionen. Das Protein des ORFs 16 könnte also eine zum Protein H des Phagen λ homologe Funktion in P482 erfüllen (Katsura, 1987).

Da die Genomstruktur bei Phagen aufgrund ihres modularen Charakters oft konservierter ist als die Protein- oder Nukleotidsequenz, spielt sie für die Funktionszuordnung der einzelnen ORFs eine wichtige Rolle (Casjens et al., 1992). Ein Vergleich der Abfolge der Gene, der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte der *Lactococcus*-Phagen P482 und sk1 mit dem *E. coli*-Phagen λ unterstreicht die durch Sequenzvergleich bestimmten Proteinfunktionen (Chandry et al., 1997). Abb. 31 zeigt beispielhaft die große Ähnlichkeit der isoelektrischen Punkte einiger wichtiger Proteine der späten Region mit gleicher hypothetischer Funktion. Nur bei den ORFs 7, 8, 10, 17 und 22 unterscheiden sich die isoelektrischen Punkte der *Lactococcus*-Phagen von den für λ ermittelten Werten.

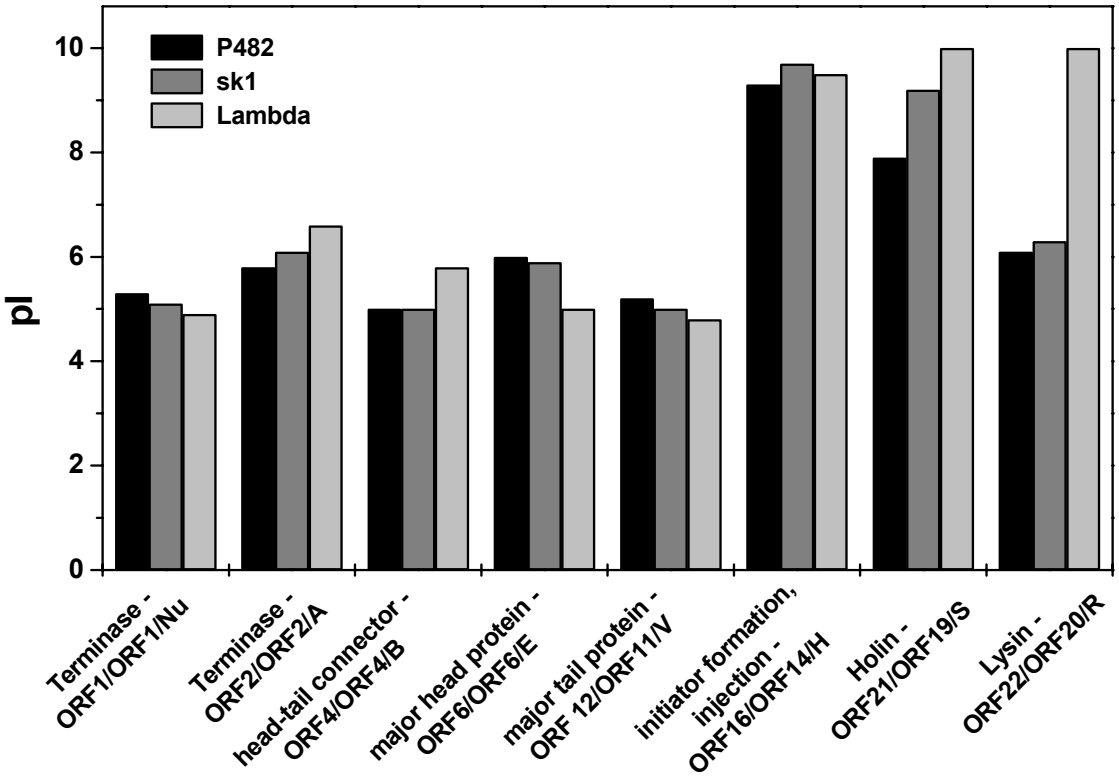


Abb. 31. Vergleich der isoelektrischen Punkte einiger wichtiger Proteine der späten Region von 3 taillierten dsDNA-Phagen.

P482 spezifische ORFs 11 und 13

Im Bereich der späten Phagengene fanden im Phagen P482 zwei Insertionen statt. Vergleichende Genomanalysen anderer taillierter dsDNA-Phagen haben gezeigt, dass die P482-spezifischen ORFs 11 und 13 im Morphogenese-Modul für den Schwanz und die Schwanzfiebern liegen (Brüssow und Desiere, 2001b; Lucchini et al., 1999a). Die Schwanzfibern spielen eine wichtige Rolle beim "Attachment" der Phagen an die Wirtszelle und besitzen zum Teil enzymatische Aktivität gegen Oberflächenproteine (Sandmeier, 1994; Scholl et al., 2001). Die Adsorption des *E. coli*-Phagen λ findet durch Anheftung des carboxyterminalen Endes des Schwanzfiberproteins J an LamB, ein Maltose-bindendes Oberflächenprotein, statt (Wang et al., 2000). Schwanzfibern sind zwischen 25 und 160 nm lang und bestehen aus 1 bis 3 Molekülen von 1-4 verschiedenen Polypeptiden. Der aminoterminale Bereich eines Schwanzfiberproteins bindet dabei an die Basisplatte oder den Schaft des Phagen, der carboxyterminale an einen spezifischen Rezeptor (Casjens und

Hendrix, 1988). Durch Konstruktion einer Hybridfiber konnte gezeigt werden, dass das Wirtsspektrum von λ und T4 durch das C-terminale Ende ihrer Schwanzfibergene bestimmt wird (Montag et al., 1989). In P1 und Mu wird die Wirtsspezifität durch DNA-Inversion verändert. Die entstehenden Schwanzfibern besitzen den gleichen aminoterminalen Bereich, unterscheiden sich aber im carboxyterminalen Ende (Glasgow, 1989).

In P482 besteht die IGR zwischen dem Stop-Codon von ORF 11 und dem Start von ORF 12 bis auf wenige Ausnahmen aus der Base Adenin (5'-TAAAAATATAAAAA GGAAAATAAAAA**ATG**A-3'-). Am Beispiel eines Schwanzproteins des Phagen λ konnte gezeigt werden, dass die Basenfolge 5'-A A/G AAA**ATG**A-3' eine Art "Slippery-Sequence" darstellt und durch Verschiebung des Leserasters zu einem Fusionsprotein führt (Levin und Hendrix, 1993). Dieses Element ist auch in der oben genannten Sequenz enthalten. Allerdings tritt zwischen dem Stop- und dem Startcodon keine Überlappung auf.

Wie Tab. 25 zeigt, weist der P482-spezifische ORF 11 nicht nur Ähnlichkeiten zu den Phagen bIL170 und bIL41 der 936-Spezies auf, sondern besitzt auch Sequenzähnlichkeiten zu ORFs aus den P335-Phagen Tuc2009, TP901-1, r1t und zum zur c2-Spezies gehörenden Phagen c2. Die letzten 200 Aminosäuren des carboxyterminalen Endes enthalten zu etwa 40% identische Aminosäuren wie die aus *Str. thermophilus*-Phagen bekannten Sequenzabschnitte. Duplessis et al. konnten am Beispiel der *Streptococcus*-Phagen zeigen, dass dieser Sequenzbereich für die Wirtsspezifität der Phagen verantwortlich ist. Die ähnlichen Sequenzen deuten auf die nahe Verwandtschaft der Wirtsbakterien *Lactococcus* und *Streptococcus* hin. Durch die Sequenzunterschiede im aminoterminalen Bereich erfolgt die Anheftung an die für jeden Phagen charakteristischen Proteine des Schafts und der Basisplatte. Die Module können durch Rekombination ausgetauscht werden (Duplessis und Moineau, 2001).

Inwieweit die in Abb. 24 dargestellten IR und DR als Signalstrukturen für Rekombinations- oder Insertionsereignisse dienen, könnte nur durch Mutationsexperimente überprüft werden. Ein Vergleich der *cos*-Region der Phagen sk1 und bIL66 zeigt eine 93% Sequenzidentität zwischen ORF50 des Phagen sk1 und dem entsprechenden Bereich von bIL66. Die in bIL66 vorliegende Deletion der ORFs 48 und 49 wird nicht von "Direct Repeats" flankiert (Chandry et al., 1997). Ein anderer Deletions-/Insertionsmechanismus führt bei bIL67 und c2, zwei *Lactococcus*-Phagen mit prolaten Köpfen, auf beiden Seiten der deletierten DNA zu einem 23 bp-langen "Direct Repeat" (Lubbers et al., 1995).

ORFs 21 und 22

In der Lysis-Cassette des Phagen P482 folgt wie bei anderen Phagen mit isometrischen Köpfen auf das Holin (ORF 21) ein Lysin (ORF 22). Aus Phagen von Milchsäurebakterien sind zwei verschiedene Klassen von Lysin-Genen bekannt. Im Fall von P482 liegt eine N-Acetylmuramoyl L-Alanin Amidase vor. Dieser Typ wurde ebenfalls in den anderen Phagen der 936-Spezies identifiziert, und liegt auch in den *Lactococcus*-Phagen BK5-T und US3 vor (Gasson, 1996a). Im Gegensatz dazu besitzen die *Lactococcus*-Phagen LC-3 und Tuc2009 ein Lysin des Muraminidase-Typs, das auch in den *Lactobacillus*-Phagen mv1, LL-H, adh und phi-g1e vorkommt. Beide Klassen untergliedern sich in zwei Domänen: Die aminoterminale Hälfte trägt die enzymatische Aktivität, der carboxyterminale Abschnitt enthält die Substrat-bindende Domäne (Brüssow, 2001a). Durch genetische Modifikationen des Lysin-Gens des Phagen Tuc2009 konnten Chimären der beiden Domänen mit neuen Eigenschaften erzeugt werden (Sheehan et al., 1996).

Funktionell entspricht das Holin dem Protein S des Phagen λ. Es durchlöchert die Zellmembran damit das Lysin, das eine homologe Funktion zum Protein R aus λ aufweist, freien Zugang zur Zellwand erhält. Das Holin verschiedener Phagen besitzt ein „Dual start motif“ mit zwei Methionin-Codons, die durch ein oder zwei Aminosäuren getrennt sind. Mindestens eine dieser Aminosäuren ist ein Lysin oder Arginin. Im Fall von sk1 sind die beiden Methionin-Codons durch drei Aminosäuren voneinander getrennt, von denen eine ein Arginin ist (Chandry et al., 1997). Es wird vermutet, dass das kürzere Protein für die Zerstörung der Zellmembran verantwortlich ist, während das längere Translationsprodukt einen Inhibitor darstellt (Young und Bläsi, 1995).

P482-spezifische ORFs 31 und 32

Der P482-spezifische ORF 32 besitzt Muster die auf eine Zugehörigkeit des Proteins zur D12-Klasse der DNA-(Adenin-N^6)-Methyltransferasen hindeuten. Die Sequenzen der konservierten Motive CM I und CM II lauten F-G-G-G-G (Aminosäuren 38-42) und L-Y-L-D-P-P-Y (Aminosäuren 222-228) (Timinskas et al., 1995). In wie weit identifizierte Aminosäuremotive Rückschlüsse auf die Proteinfunktion zulassen, lässt sich wie folgt abschätzen. In den Datenbanken liegen derzeit 163 Sequenzen aus 160 Spezies vor, die das konservierte Motiv CM II tragen (Stand April 2002). 58% dieser Proteine weisen tatsächlich Methylierungsaktivität auf. Bei 32 Proteinen wurde die Funktion noch nicht überprüft und bei 37 Sequenzen war das Ergebnis falsch positiv. Das Verhältnis von richtig identifizierten Sequenzen zur Gesamtzahl der überprüften Sequenzen beträgt also 71,76%. Darüber hinaus

sind 7 Proteine bekannt die die Funktion der DNA-(Adenin-N^6)-Methyltransferasen erfüllen, das Motiv aber nicht tragen. Da in ORF 32 noch ein weiteres Motiv identifiziert wurde, dass dem Protein die Funktion einer DNA-(Adenin-N^6)-Methyltransferase zuweist, steigt die Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit dieser Annahme nochmals.

Mit *Lla*I und *Lla*II sind aus *L. lactis* 2 weitere Enzyme dieses Typs bekannt. Bei beiden handelt es sich um die Methylase-Untereinheit eines Restriktions- und Modifikationssystems zur Phagenabwehr. Die konservierten Motive von *LlaI* lauten F-A-G-T-G (aa 32-36) bzw. A-Y-I-D-P-P-Y (aa 190-196) und sind Teil des Plasmids pTR2030 (Hill et al., 1991). *LlaII* ist ebenfalls Plasmid-codiert auf pSQR700 und trägt die Sequenzen F-I-G-G-G (aa 43-47) und V-Y-F-D-P-P-Y (aa 191-197) (Moineau et al., 1995a).

Die Hauptfunktion der DNA-(Adenin-N^6)-Methyltransferasen besteht darin, die DNA des Wirtes vor Degradation durch Restriktionsenzyme zu schützen. Das Enzym *EcoRV* aus *E. coli* erkennt beispielsweise die Sequenz GATATC (Beck et al., 2001). In Abhängigkeit vom Methylierungszustand des ersten Adenins der Palindromsequenz werden zwei unterschiedliche Reaktionen katalysiert. Liegt nach der Replikation der Wirts-DNA Hemimethylierung vor, wird die Methylase-Untereinheit aktiv und methyliert den neu synthetisierten Strang. Trifft *Eco*RV auf Fremd-DNA in der die beiden Stränge der Erkennungssequenz unmethyliert vorliegen, wird diese sequenzabhängig geschnitten und verliert ihre Virulenz. Zahlreiche Phagenresistenzmechanismen basieren auf Restriktions- und Modifikationssystemen (vgl. Abb. 1 und Tab. 1).

Bei P482 wird die Methylase aber nicht von der DNA des Wirtsbakteriums kodiert sondern vom Phagen. In keinem der auf dem Genom von P482 identifizierten ORFs wurde eine Restriktionsuntereinheit lokalisiert. Die Methylase muss also alleine wirksam sein. ORF 32 liegt in der Nähe des Replikationsmoduls und wird zusammen mit den frühen Phagengenen exprimiert. Möglicherweise wird die Phagen-DNA sofort nach ihrer Synthese methyliert und ist so für die wirtseigene Phagenabwehr nicht mehr zu erkennen. Auch in den T-even-Phagen von *E. coli* wurden Methylasen identifizieren (Hattman, 1970). Die Methylase von T4 besitzt Sequenzähnlichkeiten zur *dam*-Methylase des Wirtsbakteriums (Kossykh et al., 1995). Die Funktion dieser Phagen-codierten Methylase bleibt allerdings unklar. Ein Vergleich der Enzyme aus T2 und T4, deren Sequenz sich in 3 Aminosäuren unterscheidet, zeigt eine höhere Methylierungseffizienz in T2. Möglicherweise ist das der Grund für die geringere Degradation von T2-DNA (Kossykh et al., 1997).

Abgesehen von den *dam*-Methylasen der T-Phagen wurden bisher nur wenige Enzyme dieses Typs in Bakteriophagen identifiziert. Das Methylase-Gen (ORF 13) des *Haemophilus*

influenzae Phagen HP1 liegt wie bei P482 im Bereich der frühen Phagengene (Esposito et al., 1996). Der Phage phiCh1 befällt *Natrialba magadii*, einen Vertreter der *Archaea*, und besitzt ebenfalls ein *dam*-ähnliches Protein mit den oben aufgeführten konservierten Bereichen. Der dazugehörige ORF befindet sich im Bereich der späten Gene und führt zur unvollständigen Methylierung von GATC-Sequenzen (Witte et al., 1997). In vitro ist das Protein in der Lage *dam*$^-$-Mutanten von *E. coli* zu komplementieren. Die Funktion in seinem natürlichen Umfeld bleibt aber unklar (Baranyi et al., 2000). Mx8 ist ein temperenter Phage von *Myxococcus xanthus* dessen *mox*-Protein an der Methylierung der Phagen- und der Wirts-DNA beteiligt ist (Magrini et al., 1997). Auch im *Shigella flexneri*-Phagen SfV wurden mehrere Methylasen identifiziert, von denen die von ORF 41 codierte dem Dam-Methylase-Typ entspricht (Allison et al., 2002).

In Prokaryoten spielen DNA-Methylierungen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Replikation, der Mismatch-Reparatur, der Rekombination, der Transposition und der Genexpression (Marinus, 1989; Polaczek et al., 1998; Radman und Wagner, 1986). Neben der *recA*-abhängigen Rekombination (Bi und Liu, 1994) wurde in *E. coli* auch ein *recA*-unabhängiger Rekombinationsmechanismus entdeckt, an dem verschiedene Enzyme der methylierungsabhängigen Mismatch-Reparatur beteiligt sind (Bi und Liu, 1996). Bevor die *dam*-Methylase den in der Replikation neu synthetisierten Strang methylieren kann, wird bei Fehlpaarung von der *mutH*-Endonuklease ein Strangbruch in die GATC-Schnittstelle des unmethylierten Strangs eingefügt. MutS und MutL erkennen den Strangbruch und tauschen den unmethylierten Strang aus. Troester et al. (2000) entdeckten einen neuen, von den beiden oben beschriebenen Rekombinationsmechanismen unabhängigen Deletionsmechanismus (Troester et al., 2000). Die Umordnung der DNA, an der die *dam*-Methylase beteiligt ist, hängt vom Methylierungszustand der GATC-Erkennungssequenz ab.

Die P482-spezifischen ORFs 31 und 32 liegen auf einer 1150 bp langen Insertion auf der die codierenden Bereich nur durch eine 25 bp lange "Intergenic Region" getrennt sind. Die Proteine der ORFs 31 und 32 weisen beide Sequenzähnlichkeiten von 33 bis 36% zu ORFs des phylogenetisch verwandten Bakteriums *Streptococcus pyogenes* auf, deren Funktion noch unbekannt ist (Ferretti et al., 2001; Smoot et al., 2002). Die beiden Gene dürften also durch DNA-Austausch mit einem Vertreter der Familie *Streptococcus*/*Lactococcus* oder einem dazugehörenden Phagen in das P482-Genom gelangt sein. Die von ORF 32 codierte Methylase könnte am Rekombinationsvorgang beteiligt sein oder die Degradation der Phagen-DNA durch Restriktionsenzyme des Wirts verhindern.

DNA-Replikationsmodul ORFs 46-38

Neben Sequenzähnlichkeiten zu ORFs aus den Phagen sk1, bIL170 und TP901-1 weist der ORF 41 des Phagen P482 39% Sequenzidentität zum ORF 14 des Phagen Tuc2009 auf. Dieser Genabschnitt kodiert für die Topoisomerase I, die Teil des DNA-Replikationsmoduls ist. Das DNA-Replikationsmodul des *Lactococcus*-Phagen Tuc2009 enthält weitere wichtige Gene wie das Einzelstrang-Bindungs-Protein, eine Methylase und ein "Replisome organizer"-Protein (Brüssow, 2001a). Weder DNA- noch Aminosäure-Sequenzvergleiche ermöglichen die Zuordnung dieser Funktionen zu ORFs des Phagen P482. Die Sequenzähnlichkeit des ORF 46 zu DNA-Polymerasen aus bIL170, sk1, bIL67 und c2 erlaubt die Vermutung, dass es sich bei ORF 46 ebenfalls um eine DNA-Polymerase-Untereinheit des Phagen P482 handelt. Da die ORFs 41 und 46 in einem Sequenzmodul zwischen den ORFs 38 und 46 liegen, das konservierte Bereiche zu den beiden anderen Phagen der 936-Spezies aufweist, scheint hier ein für die Phagen essentieller Bereich vorzuliegen. Hierbei könnte es sich um das Replikationsmodul dieser Phagenspezies handeln. Auch im Phagen TP901-1 liegen die Gene mehrerer an der Replikation beteiligter Proteine hintereinander. Auf das Topoisomerase I-Gen (ORF 11) folgt das Gen für das Einzelstrang-Bindungsprotein (ORF 12) und ein Replicase-Protein (ORF 13) (Ostergaard et al., 2001).

Ein "Origin of Replication" konnte für P482 nicht identifiziert werden. In sk1 befindet er sich außerhalb des Replikationsmoduls auf einer 440 bp langen "Intergenic Region" zwischen den ORFs 47 und 48 (Chandry et al., 1997). Wie das Alignment der frühen Gene der Phagen P482, sk1 und bIL170 (Abb. 26) zeigt, treten in diesem Bereich keinerlei Ähnlichkeiten zwischen den Phagen der 936-Spezies auf. Die hohe Variabilität der Phagen-Origins spiegelt sich auch im unterschiedlichen Resistenzverhalten des im Origin-Bereich angreifenden Phagenresistenzgens *abiK* bei Phagen der P335- und 936-Spezies wider (Boucher et al., 2000).

Endodesoxyribonuclease-Funktion der ORFs 37, 47, 50

Die P482-spezifischen ORFs 37, 47 und 50 weisen Ähnlichkeiten mit Genen anderer Organismen auf, die Endonuklease-Aktivität besitzen. Wie bei *Streptococcus thermophilus*-Phagen enthalten sie einen auffallend niedrigen G+C-Gehalt (Foley et al., 2000). Aus Abb. 29 geht hervor, dass sich diese Ähnlichkeiten nicht auf *L. lactis*-Phagen wie bIL170 und r1t beschränken, sondern auch Aminosäuremotive aufweisen, die aus *B. subtilis*-Phagen bekannt sind (Goodrich-Blair und Shub, 1994). Wie in P482 liegen auch in bIL170 drei ORFs (ORFs E11, E20 und E37) vor, die diese Funktion besitzen könnten. Das Genom des *E. coli*-Phagen

T4 enthält 7 Proteine mit Endonuklease-Aktivität (Mosig, 1998). Am Beispiel dieser Phagen konnte gezeigt werden, wie eng DNA-Replikation und Rekombination miteinander verbunden sind. Enzyme, die für die DNA-Replikation verantwortlich sind, sind auch an Rekombinationsvorgängen beteiligt, und umgekehrt stellen Zwischenstufen der Rekombination Ausgangsprodukte für die DNA-Replikation dar. Mosig (1998) entwickelte 5 verschiedene Modelle für das Zusammenspiel von Rekombination und Replikation bei denen Endonukleasen eine Rolle spielen (Mosig et al., 2001).

Die Analyse mit den Computerprogrammen PROSITE und PFAM ergab für die ORFs 37 und 50 eine Zugehörigkeit zu der Familie der HNH-Endonukleasen. Auch in ORF 3 wurde mit dem Programm Sequence-BLOCKS das Motiv der HNH-Endonukleasen festgestellt. Diese als "Homing-Endonukleasen" bezeichneten genetischen Elemente werden typischer Weise von Group I-Introns codiert. Sie sorgen für ihre eigene, auch laterale Verbreitung indem sie 14-40 bp lange, intronfreie Sequenzen erkennen, in die die selbst-gesplicte mRNA des Introns inseriert (Edgell und Shub, 2001). Nach ihren konservierten Aminosäuremotiven werden die Endonukleasen in die LAGLIDADG-, die GIY-YIG-, die His-Cys- und die HNH-Protein-Familie unterteilt (Kühlmann et al., 1999).

Seit ihrer ersten Identifizierung im Jahr 1970 in *Saccharomyces cerevisiae* konnten mehr als 250 Vertreter der "Homing-Endonukleasen identifiziert werden (Chevalier und Stoddard, 2001). Group I-Introns sind in den drei Reichen *Eucaryota*, *Archaea* und *Eubacteria* weit verbreitet, und kommen auch in mitochondrialer und Chloroplasten-DNA vor (Foley et al., 2000). Wie das Beispiel des *Lactobacillus delbruekii*-Phagen LL-H (Mikkonen und Alatossava, 1995) und verschiedener *Streptococcus thermophilus*-Phagen zeigt, erstreckt sich die Verbreitung von Group I-Introns mit Endonuklease-Funktion auch auf Phagen von LowGC Gram-positiven Bakterien (Foley et al., 2000).

Trotz ihrer weiten Verbreitung ist die Funktion der "Homing-Endonukleasen" unbekannt. Allgemein wird vermutet, dass sie nichts weiter als opportunistische, parasitierende DNA-Stücke darstellen. Allerdings sind auch Fälle bekannt in denen das Intron den Wirt positiv beeinflusst. In *Aspergillus nidulans* hilft die Intron-codierte Endonuklease beim Splicen von Wirts-Introns (Ho et al., 1997). Ein Beispiel für eine ehemalige, mittlerweile fest ins Wirtsgenom integrierte "Homing-Endonuklease" stellt HO von *Saccharomyces cerevisiae* dar. Es trägt das Aminosäuremotiv der LAGLIDADG-Familie und katalysiert das Mating der Hefen (Kostriken et al., 1983). Im Gegensatz zu zahlreichen in der Literatur beschriebenen Group I-Introns, die in Genen inserieren, deren Funktion erst nach dem Selbst-Splicen der mRNAs wieder hergestellt wird, begrenzen die Introns des Phagen P482 Module mit

unterschiedlich konservierten Sequenzbereichen (vgl. auch 4.4.3). Möglicherweise sind die von Group I-Introns codierten Endonukleasen an der oben dargestellten Kombination aus Replikations- und Rekombinationsereignissen zur Neuordnung der im Genpool vorhandenen Module beteiligt. Ein Art Superinfektionsimmunität vermitteln die Endonukleasen I-*Hmu*I und I-*Hmu*II des *B. subtilis*-Phagen SP82. Während sie sonst nur Einzelstrangbrüche in die DNA einfügen, wird die DNA von anderen, den Wirt befallenden Phagen geschnitten (Goodrich-Blair und Shub, 1996).

4.4.3. Die Modular-Theorie der Phagenevolution

Das Alignment der mittleren und späten Phagengene von P482, sk1 und bIL170 (Abb. 27) zeigt in weiten Bereichen Sequenzähnlichkeiten zwischen 90 und 100%. Unabhängig von ihrer Sequenz weist das Genom aller taillierter dsDNA-Phagen eine sehr ähnliche Topologie auf (Brüssow und Desiere, 2001b). Dabei beschränkt sich die Ähnlichkeit nicht nur auf Phagen von Milchsäurebakterien wie sk1 von *L. lactis* und Sfi 21 oder Sfi 11 von *Streptococcus thermophilus*, sondern läßt sich auch am Beispiel der *E. coli*-Phagen λ und HK97, des *Streptomyces*-Phagen ϕC31 oder der *Mycobacterium*-Phagen L5 und TM4 demonstrieren. Brüssow und Desiere (2001) sprechen deshalb auch von einer "λ-Supergroup" innerhalb der *Siphoviridae*. Basierend auf den Arbeiten von Lucchini et al. (1999) und Brüssow et al. (2001) läßt sich der Bereich der späten Phagengene von P482 in 5 Sequenzabschnitte unterteilen: (1) DNA-Verpackung - ORFs 1und 2; (2) Kopf-Morphogenese - ORFs 3-6; (3) Verbindung zwischen Kopf und Schwanz - ORFs 7-10; (4) Schwanz-Morphogenese - ORFs 11 - 20; (5) Lysis - ORFs 21 und 22. Die Module 1, 2, 3 und 5 weisen Sequenzähnlichkeiten zwischen 80 und 100% zu den anderen *Lactococcus*-Phagen der 936-Spezies auf. Lediglich im Bereich der Schwanz-Morphogenese unterscheiden sich die Phagen. Einerseits ist die Sequenz der einzelnen ORFs nicht mehr so konserviert, andererseits treten Insertionen auf. P482 enthält zusätzlich ORF 11, der auch aus bIL170, bIL41, Tuc2009, TP901-1 und r1t bekannt ist, und ORF 13, zu dem keine Sequenzähnlichkeiten in den Datenbanken vorlagen. Möglicherweise verändert oder erweitert sich durch neue Proteine im Bereich der Schwanz-Morphogenese und des Injektionsmechanismuses das Wirtsspektrum des Phagen P482. Am Beispiel des *E. coli*-Phagen K1-5, der in der Schwanz-Morphogenese-Region ein aus ϕK5 und ein aus ϕK1E bekanntes Gen enthält, konnte gezeigt werden, dass dieser neu isolierte Phage in der Lage ist, sowohl *E. coli* K1 als auch *E. coli* K5 Zellen zu befallen, während das Wirtsspektrum der Phagen, die nur eines der beiden Gene enthalten auf einen Bakterienstamm beschränkt ist (Scholl et al., 2001). Horizontaler Gentransfer wurde

auch beim Austausch von Schwanzfibergenen zwischen verschiedenen *Enterobacteriaceae*-Phagen beobachtet (Haggard-Ljungquist et al., 1992; Sandmeier, 1994).

Nach der Modular-Theorie der Phagenevolution besteht die DNA-Sequenz eines Phagen aus Modulen, deren Gene jeweils eine funktionale Einheit bilden (Botstein, 1980). Die Genome aller taillierten dsDNA-Phagen sind Mosaike, die sich aus Bausteinen eines gemeinsamen genetischen Pools zusammensetzen (Hendrix et al., 1999). Durch Heteroduplex-Mapping konnte gezeigt werden, dass Module mit homologen Funktionen zwischen den Phagen einer Kreuzungsfamilie ausgetauscht werden können (Casjens et al., 1992). Diese DNA-Segmente müssen dabei keinerlei Sequenzähnlichkeit aufweisen. Die Diversität der Phagen entsteht hauptsächlich durch Insertionen, Deletionen oder Austausch von DNA-Abschnitten und nur zu einem geringen Prozentsatz durch Punktmutationen (Lucchini et al., 1999a). Phagengenome unterliegen damit der vertikalen und horizontalen Evolution (Koonin et al., 2000).

Mehr noch als in der späten Region der Phagentranskripte, wo bei P482 zwei Insertionen vorliegen, wird der modulare Charakter des Phagengenoms im Bereich der frühen Phagengene deutlich. Hier lassen sich 4 DNA-Segmente unterscheiden. Während der erste ORF (ORF 51 in P482, ORF 50 in sk1 und ORF E1 in bIL170) des frühen Transkripts noch Sequenzähnlichkeiten zwischen 80 und 100% aufweist, folgt in allen 3 Phagen ein Bereich mit 3 bis 5 für den jeweiligen Phagen charakteristischen ORFs (ORFs 50-47 in P482, ORFs 49-45 in sk1 und ORFs E2-E4 in bIL170). Die ORFs 47, 48 und 50 von P482 weisen keine oder nur sehr geringe Sequenzähnlichkeiten zu anderen Einträgen in der Datenbank auf. Lediglich die Sequenz von ORF 49 aus P482 ist zu 100% identisch mit ORF E2 aus bIL170, die Funktion dieses ORFs ist unbekannt.

In sk1 befindet sich der "Origin of Replication" in diesem ersten Modul auf einer 440 bp langen "Intergenic Region" zwischen den ORFs 47 und 48 (Chandry et al., 1997). Durch Sequenzvergleich mit sk1 konnte auf der Sequenz von P482 kein hypothetischer "Origin of Replication" identifiziert werden. Wie das Alignment der frühen Gene der Phagen P482, sk1 und bIL170 (Abb. 26) zeigt, treten in diesem Bereich keinerlei Ähnlichkeiten zu den anderen Phagen der 936-Spezies auf. Ein Vergleich der "Origin of Replication"-Sequenzen von sk1 mit den entsprechenden Sequenzen der *Lactococcus*-Phagen c2 (c2-Spezies), r1t und ϕ50 (beide P335-Spezies) zeigt ebenfalls keine signifikanten Ähnlichkeiten (Hill et al., 1990; van Sinderen et al., 1996; Waterfield et al., 1996). Alle diese Origins enthalten "Direct Repeats", unterscheiden sich aber in Größe, Anordnung und Häufigkeit der Sequenzwiederholungen bzw. in der Gesamtlänge der Origin-Sequenz.

Das zweite hypothetische Modul (P482: ORFs 46-38, sk1: ORFs 44-32, bIL170: ORFs E5-E15) umfaßt mindestens die 9 aus P482 bekannten ORFs, deren Konserviertheitsgrad zwischen 50 und 100% liegt. In sk1 und bIL170 liegen 2 Insertionen zwischen ORF 41 und 42 bzw. zwischen ORF 43 und 44 vor. Den Genen dieses DNA-Segments konnte bisher noch keine Funktion zugeordnet werden.

Ähnlich wie bei Modul 1 dürfte es sich bei Modul 3 (P482: ORFs 37-31, sk1: ORFs 31-28, bIL170: E16-E22) um einen zwischen den Phagen einer Kreuzungsgruppe austauschbaren DNA-Abschnitt ohne Ähnlichkeiten auf Sequenzebene handeln. Die hypothetischen Proteine unterscheiden sich im Molekulargewicht, in den Eigenschaften ihrer Aminosäuren und bezüglich ihrer isoelektrischen Punkte.

Im letzten Modul (P482: ORFs 30-23, sk1: ORFs 27-21, bIL170: E23-E37) der frühen Phagengene liegt die Sequenzähnlichkeit der in allen Phagen vorhandenen 7 Gene bei 70-100%. Bei P482 treten an einer Stelle, bei bIL170 an 3 Stellen Insertionen auf.

Die für andere taillierte dsDNA-Phagen mehrfach postulierte Modular-Theorie läßt sich also auch anhand der 3 kompletten Sequenzen für *Lactococcus*-Phagen anschaulich darstellen. Während die mittleren und späten Gene hauptsächlich der vertikalen Evolution unterliegen und geringere Sequenzunterschiede aufweisen, werden im Bereich der frühen Gene ganze Sequenzmodule ausgetauscht.

4.5. Aspekte der Markierung genomischer DNA für die Chip-Hybridisierung

Die DNA-Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen ermöglicht im Gegensatz zur Radioisotop-Markierung eine sofortige Auswertung der Hybridisierungsergebnisse unter "real time" Bedingungen. Wie bereits am Beispiel der FISH in 3.1 gezeigt, können auch in der Chip-Hybridisierung durch den gleichzeitigen Einsatz mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliche Fragestellungen in einem Experiment beantwortet werden. Meistens erfolgt der Einbau von Fluoreszenz-Farbstoffen auf enzymatischem Weg in der PCR, der Nick-Translation oder dem "random primed labelling" durch Zugabe von Nukleotiden, an denen das Fluorophor über einen Linker kovalent gebunden ist.

Die Markierung der DNA während der PCR-Reaktion erfordert einen hohen Anteil an gelabelten Nukleotiden. Wie aus 3.6.1 hervor geht, enthält die amplifizierte DNA erst bei einem Mischungsverhältnis von gelabelten zu ungelabelten Nukleotiden von 1:4 an etwa jeder hundertsten Base eine Markierung. Theoretisch müßte bei einem G+C-Verhältnis von 30% in

Lactococcus jede 25. Base das Fluorophor tragen. Daraus läßt sich schließen, dass der Einbau von fluoreszenz-markierten dNTPs durch die in der PCR verwendete DNA-Polymerase stark diskriminiert wird. Eine DNA-Markierung durch die PCR-Reaktion erscheint im Vergleich zur Ausbeute eher uneffizient und vergleichsweise teuer.

Zur Markierung der genomischen DNA von Starterkulturen oder Fermentationsproben scheidet eine auf spezifisch bindende Primer basierende Methode aus. Bei der Nick-Translation oder dem "random primed labelling" werden fluoreszenz-markierte Nukleotide in DNA mit unbekannter Sequenz eingebaut. Wie Abb. 30 zeigt, können mit diesen Methoden Markierungsraten von durchschnittlich 25-30 Farbstoffmolekülen pro 1000 Nukleotiden erreicht werden. Diese Methoden für das interne Labelling von unbekannten DNA-Sequenzen finden mittlerweile breite Anwendung, wie z.B. im medizinischen Bereich beim Nachweis des Herpes-Simplex-Virus (Broketa et al., 2001), bei der Analyse von Punktmutationen (Iwahana et al., 1996) oder bei vergleichenden Genom-Hybridisierungen (Rosenberg et al., 1998).

Eine weitere, ebenfalls enzymatische Labelling-Methode steht durch die Endmarkierung von DNA-Fragmenten mit der terminalen Polynukleotid-Transferase zur Verfügung (Kodym und Horth, 1995; Woynarowska et al., 2000). Der Vorteil dieser Methode basiert auf der direkten Quantifizierbarkeit des Signals, da jeder hybridisierte Fragmentabschnitt ein Fluoreszenzsignal aussendet. Andererseits läßt sich durch dieses Nachweissystem keine Sensitivitätssteigerung erreichen, die gerade bei der Hybridisierung geringer DNA-Mengen, wie für den Nachweis von Pathogenen in Starterkulturen oder Fermentationsproben, von essentieller Bedeutung ist.

Neben den oben dargestellten enzymatischen Markierungsmethoden stehen chemische Labelling-Verfahren, bei denen z.B. Psoralen-Biotin, Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat, Fluoreszein-Isothiocyanat, Tetramethylrhodamin-Succinimidester oder cis-Platin-Derivate verwendet werden, zur Verfügung (Proudnikov und Mirzabekov, 1996; Saffran et al., 1988; Wiegant et al., 1999). Die Vorteile dieser Methoden sind ihre Anwendbarkeit auf DNA und RNA, die gute Kombinierbarkeit mit der für die Hybridisierung auf dem DNA-Chip nötigen Fragmentierung und nicht zuletzt die geringen Kosten. So belaufen sich die Preise für die enzymatische Markierung von 1 µg genomischer DNA durch den Einbau von Nukleotiden in der PCR-Reaktion auf US$ 50.00, durch "random primed labelling" auf US$ 15.00 und durch Endlabelling mit der terminalen Transferase auf US$25.00, während bei der chemischen Markierung mit Psoralen-Biotin lediglich Kosten in Höhe von US$ 0.5 entstehen (Zhang et al., 2001).

Ausblick

Die derzeitigen DNA-analytischen Techniken erlauben selbst bei erheblichem methodischen Aufwand nur eine Momentaufnahme von Starterkultur- oder Fermentationsproben. Die Aufklärung von DNA-Sequenzen anderer fermentationsrelevanter Bakterien und die Weiterentwicklung der DNA-Chip-Technologie bieten erstmals die Möglichkeit alle an der Produktion von Milchprodukten beteiligten Organismen und Gene in einem Experiment zu erfassen und deren Vorkommen in verschiedenen Produktionsstadien miteinander zu vergleichen (Kuipers, 2001).

5. Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist die molekulargenetische Charakterisierung von Milchsäurebakterien und Phagen in Quarkfermentationen mit normalem oder gestörten Säuerungsverlauf.

Durch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ganzer Bakterienzellen mit gegen die rRNA gerichteten Sonden konnte zunächst ausgeschlossen werden, dass die Säuerungsstörung in instabilen Quarkfermentationen auf fermentationsuntypische Bakterien, unter denen sich Krankheitserreger der Gattungen *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Campylobacter* oder *Listeria* befinden können, zurückzuführen ist. Die verminderte Säuerung geht mit einer starken Reduzierung der "stoffwechselaktiven" Zellen einher. Zu Beginn der Fermentation zeigt die Analyse der Populationszusammensetzung einen 98%igen Anteil der *L. lactis* ssp. *cremoris* an der Gesamtzellzahl. In allen Fermentationsstadien schwankt der Anteil der beiden anderen an der Fermentation beteiligten Mikroorganismen *L. lactis* ssp. *lactis* und *Leuconostoc mesenteroides* nur geringfügig, während zum Zeitpunkt des Säuerungsausfalls die Anzahl der Subspezies *L. lactis* ssp. *cremoris* auf etwa 1% sinkt.

Zur Charakterisierung des genetischen Potentials der an der Quarkfermentation beteiligten Organismen wurden 7 Starterkulturen, 282 *L. lactis* ssp. *cremoris*-Isolate, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus Fermentationen der Starterkultur Probat 8/0 mit normaler oder gestörter Säuerung entnommen worden waren, sowie vier im Handel erhältliche Speisequarkproben im Hinblick auf die meist Plasmid-codierten Phagenresistenzgene untersucht. Aufgrund des breiten Resistenzgenspektrums von bis zu 17 verschiedenen Genen, die die Adsorption des Phagen oder die Injektion der DNA inhibieren, diese durch Restriktion unschädlich machen oder den Zusammenbau der Phagenproteine verhindern, scheinen die Starterkulturen ein gutes Abwehrvermögen gegen Phagen der verschiedenen Spezies zu besitzen. Eine kontinuierliche Säuerung tritt trotz des Phagenbefalls auf, wenn die Mikroorganismen vier oder mehr Resistenzgene tragen. Bei der Phagenabwehr werden Resistenzmechanismen bevorzugt, die unabhängig von der Phagen-Spezies DNA degradieren. Sinkt durch Plasmidverlust die Anzahl der Resistenzgene können die Phagen die Starterkulturbakterien lysieren. Durch die Minimierung der Anzahl der an der Fermentation beteiligten Zellen, wird die Säuerungsaktivität reduziert oder kommt vollständig zum Erliegen.

Die Sequenzanalyse der nachgewiesenen Gene weist in der Regel eine 95-98% Sequenzidentität zu den in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen auf. In einem im Handel erhältlichen Speisequark wurde zusätzlich zu der aus der Literatur bekannten Sequenz des

abiP-Gens eine Variante von *abiP* identifiziert, deren codierende Sequenz ein "in frame"-Insert mit 390 Nukleotiden trägt.

Die Analyse weiterer Plasmid-codierter Gene, die für die Bildung von Lactat während der Säuerung oder für die Entstehung von Geschmackskomponenten wie Diacetyl und Acetoin aus dem Citratabbau verantwortlich sind, ergab ein ähnliches Bild wie die Untersuchung der Phagenresistenzgene. Auch hier nimmt die Zahl der pro Bakterienzelle enthaltenen genetischen Marker bei Fermentationen mit gestörtem Säuerungsverhalten ab.

Die Charakterisierung der in den Fermentationen enthaltenen Phagenspezies zeigt den Eintrag der P335-Phagen durch die Starterkultur in vermutlich lysogenem Zustand und die Verunreinigung mit den obligat lytischen Phagen der 936-Spezies über die Milch oder über Reste aus den Produktionsanlagen.

P482, ein mehrfach isolierter Vertreter dieser Phagenspezies, wurde vollständig sequenziert. Das 30945 bp lange Genom gliedert sich in 55 ORFs, die in frühen, mittleren und späten Transkriptionseinheiten organisiert sind. Trotz der hohen Ähnlichkeit zu Sequenzeinträgen in der Datenbank, konnten nur 16 Genen Funktionen zugeordnet werden. Identifiziert wurden die Untereinheiten für die Terminase, mögliche Proteine, die die Struktur des Phagen bilden, Holin und Lysin, Untereinheiten für die DNA-Polymerase und HNH-Endonukleasen. Der P482-spezifische ORF 11 ist vermutlich an der Wirtsspezifität, der ORF 13 am Aufbau des Phagenschwanzes beteiligt. Die charakteristischen Aminosäuremotive des nur in P482 identifizierten ORFs 32 lassen eine Methyltransferase-Aktivität vermuten. Wie das Beispiel der ORFs 11, 31, 37 oder 50 zeigt, entsteht die Vielfalt der *Lactococcus*-Phagen weniger durch Punktmutationen, sondern vermutlich durch den in der Modular-Theorie beschriebenen Austausch ganzer Gene oder Genabschnitte. Das Auftreten der Phagen-Variante P482ΔORF11, bei dem eine Deletion des ORFs 11 vorliegt, ist ebenso ein Hinweis darauf.

Zur gemeinsamen Erfassung aller dieser Parameter in einem Experiment bietet die Chip-Hybridisierung eine interessante Zukunftsperspektive. Die dafür erforderlichen Experimente zur Markierung genomischer Starterkultur-DNA mit dem Ziel der enzymatischen Einführung eines Fluoreszenz-Farbstoffs in der Nick-Translation oder dem "random primed labelling" lieferten eine durchschnittliche Einbaurate von einem Fluorophor pro 30-40 Basen, sind aber für den Routineeinsatz zu teuer. Deshalb soll in Zukunft auf chemische Markierungsmethoden zurückgegriffen werden.

6. Literatur

1. Alatossava, T. und T. R. Klaenhammer (1991) Molecular characterization of three small isometric-headed bacteriophages which vary in their sensitivity to the lactococcal phage resistance plasmid pTR2030. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1346-1353.
2. Allison, G. E. und T. R. Klaenhammer (1998) Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **8**: 207-226.
3. Allison, G. E., D. Angeles, N. Tran-Dinh und N. K. Verma (2002) Complete genomic sequence of SfV, a serotype-converting temperate bacteriophage of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **184**: 1974-1987.
4. Amann, R. I., W. Ludwig und K.-H. Schleifer (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**: 143-169.
5. Amann, R., F. O. Glöckner und A. Neef (1997) Modern methods in subsurface microbiology - *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**: 191-200.
6. Anba, J., E. Bidnenko, A. Hillier, D. Ehrlich und M. C. Chopin (1995) Characterization of the lactococcal *abiD1* gene coding for phage abortive infection. *J. Bacteriol.* **177**: 3818-3823.
7. Andresen, A., A. Geis, U. Krusch und M. Teuber (1984) Plasmid profiles of mesophilic dairy starter cultures. *Milchwissenschaften* **39**: 140-143.
8. Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto und K. Hiramatsu (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired *Staphylococcus aureus* MRSA. *Lancet* **359**: 1819-1827.
9. Baranyi, U., R. Klein, W. Lubitz, D. H. Kruger und A. Witte (2000) The archaeal halophilic virus-encoded *Dam*-like methyltransferase M.phiChi-I methylates adenine residues and complements *dam* mutants in the low salt environment of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **35**: 1168-1179.
10. Basaran, P., N. Basaran und I. Cakir (2001) Molecular differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris* strains by ribotyping and site specific PCR. *Current Microbiol.* **42**: 45-48.
11. Beck, C., S. Cranz, M. Solmaz, M. Roth und A. Jeltsch (2001) How does a DNA interacting enzyme change its specificity during molecular evolution? A site-directed mutagenesis study at the DNA binding site of the DNA-(Adenine-N^6)-methyltransferase *Eco*RV. *Biochemistry* **40**: 10956-10965.
12. Beck, H. (2002) Übersicht über pathogene Mikroorganismen in Lebensmitteln. Vortrag bei der Tagung "Molekularbiologische Nachweismethoden für pathogene Mikroorganismen" des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, 1./2. Juli.
13. Becker, A. und M. Gold (1988) Prediction of an ATP reactive center in the small subunit, gpNu1, of the phage lambda terminase enzyme. *J. Mol. Biol.* **139**: 219-222.
14. Beimfohr, C., A. Krause, R. Amann, W. Ludwig und K. H. Schleifer (1993) In-Situ identification of Lactococci, Enterococci and Streptococci. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 450-456.

15. Beimfohr, C., W. Ludwig und K. H. Schleifer (1997) Rapid genotypic differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies and biovar. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**: 216-221.

16. Bekal-si Ali, S., C. Divies und H. Prevost (1999) Genetic organization of the *citCDEF* locus and identification of *mae* and *clyR* genes from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* **181**: 4411-4416.

17. Benson, K. H., J. J. Godon, P. Renault, H. G. Griffin und M. J. Gasson (1996) Effect of *ilvBN*-encoded α-acetolactate synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 107-111.

18. Beresford, T. P. J., L. J. H. Ward und A. W. Jarvis (1993) Temporally regulated transcriptional expression of the genomes of lactococcal bacteriophages c2 and sk1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3708-3712.

19. Betzl, D., W. Ludwig und K. Schleifer (1990) Identification of lactococci and enterococci by colony hybridization with 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2927-2929.

20. Bi, X. und L. F. Liu (1994) *RecA*- independant and *recA*-dependant intramolecular plasmid recombination. Differential homology requirement and distance effect. *J. Mol. Biol.* **235**: 414-423.

21. Bi, X. und L. F. Liu (1996) *RecA*-independant DNA recombination between repetitive sequences: mechanisms and implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**: 253-292.

22. Bidnenko, E., D. Ehrlich und M. C. Chopin (1995) Phage operon involved in sensitivity to the *Lactococcus lactis* abortive infection mechanism *abiD1*. *J. Bacteriol.* **177**: 3824-3829.

23. Bidnenko, E., C. Mercier, J. Tremblay, P. Tailliez und S. Kulakauskas (1998) Estimation of the state of the bacterial cell wall by fluorescent *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3059-3062.

24. Biswas, I., E. Maguin, S. D. Ehrlich und A. Gruss (1995) A 7-base-pair sequence protects DNA from exonucleolytic degradation in *Lactococcus lactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2244-2248.

25. Bolotin, A., S. Mauger, K. Malarme, S. D. Ehrlich und A. Sorokin (1999) Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *AvL Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **76**: 27-76.

26. Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarme, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich und A. Sorokin (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**: 731-753.

27. Botstein, D. (1980) A theory of modular evolution for bateriophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **354**: 484-491.

28. Bouchard, J. D. und S. Moineau (2000) Homologous recombination between a lactococcal bacteriophage and the chromosome of its host strain. *Virology* **270**: 65-75.

29. Boucher, I., E. Emond, E. Dion, D. Montpetit und S. Moineau (2000) Microbiological and molecular impacts of AbiK on the lytic cycle of *Lactococcus lactis* phages of the 936 and P335 species. *Microbiology UK* **146**: 445-453.

30. Braun, J. V., S. Hertwig, H. Neve, A. Geis und M. Teuber (1989) Taxonomic differentiation of bacteriophages of Lactococcus lactis by electron microscopy, DNA-DNA hybridization and protein profiles. *J. General Microbiol.* **135**: 2551-2560.

31. Brisette, J. L., M. Russel, L. Weiner und P. Model (1990) Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 862-866.

32. Broketa, M., A. Vince, V. Drazenovic, R. Sim und G. Mlinaric-Galinovic (2001) Non-radioactive digoxigenin DNA labeling and immuologic detection of HSV PCR products. *J. Clin. Virology* **23**: 17-23.

33. Brondsted, L., S. Ostergaard, M. Pedersen, K. Hammer und F. K. Vogensen (2001) Analysis of the complete DNA sequence of the temperate bacteriophage TP901-1: evolution, structure, and genome organization of lactococcal bacteriophages. *Virology* **283**: 93-109.

34. Brüssow, H. (2001a) Phages of dairy bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 283-303.

35. Brüssow, H. und F. Desiere (2001b) Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Mol. Microbiol.* **39**: 213-222.

36. Bruttin, A., F. Desiere, S. Lucchini, S. Foley und H. Brussow (1997) Characterization of the lysogeny DNA module from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage ϕSfi21. *Virology* **233**: 136-148.

37. Bubendorf, L., M. Kolmer, J. Kononen, P. Koivisto, S. Mousses, Y. Chen, E. Mahlamaki, S. P., H. Moch und N. Willi (1999) Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**: 1758-1764.

38. Case-Green, S. C., K. U. Mir, C. E. Pritchard und E. M. Southern (1998) Analysing genetic information with DNA arrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 404-410.

39. Casjens, S. und R. Hendrix (1988) The bacteriophages. *Plenum Press*, New York.

40. Casjens, S., G. Hatfull und R. W. Hendrix (1992) Evolution of dsDNA tailed-bacteriophage genomes. *Semin. Virol.* **3**: 383-397.

41. Chandry, P., B. Davidson und A. Hillier (1994a) Temporal transcription map of the *Lactococcus lactis* bacteriophage sk1. *Microbiology* **140**: 2251-2261.

42. Chandry, P., S. Moore, B. E. Davidson und A. Hillier (1994b) Analysis of the cos region of the *Lactococcus lactis* bacteriophage sk1. *Gene* **138**: 123-126.

43. Chandry, P. S., S. C. Moore, J. D. Boyce, B. E. Davidson und A. J. Hillier (1997) Analysis of the DNA sequence, gene expression, origin of replication and molecular structure of the *Lactococcus lactis* lytic bacteriophage sk1. *Mol. Microbiol.* **26**: 49-64.

44. Chee, M., R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockhart, M. S. Morris und S. P. A. Fodor (1996) Accessing genomic information with high-density arrays. *Science* **274**: 610-614.

45. Cheng, S., C. Fockler, W. M. Barnes und R. Higuchi (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5695-5699.

46. Chevalier, B. S. und B. L. Stoddard (2001) Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucl. Acids Res.* **29**: 3757-3774.

47. Chopin, M. C., A. Chopin, A. Rouault und N. Galleron (1989) Insertion and amplification of foreign genes in the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1769-1774.

48. Chopin, A. (1993) Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 21-38.

49. Chopin, A., A. Bolotin, A. Sorokin, S. D. Ehrlich und M.-C. Chopin (2001) Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucl. Acids Res.* **25**: 644-651.

50. Chung, D. K., J. H. Kim und C. A. Batt (1991) Cloning and nucleotide sequence of the major capsid protein from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* bacteriophage F4-1. *Gene* **101**: 121-125.

51. Cluzel, P. J., A. Chopin, S. D. Ehrlich und M. C. Chopin (1991) Phage abortive infection mechanism from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, expression of which is mediated by an Iso-IS*S1* element. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3547-3551.

52. Coakley, M., G. F. Fitzgerald und R. P. Ross (1997) Application and evaluation of the phage resistance- and bacteriocin-encoding plasmid pMRC01 for the improvement of dairy starter cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1434-1440.

53. Cocconcelli, P. S., D. Porro, S. Galandini und L. Senini (1995) Development of a RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**: 376-379.

54. Coffey, A., M. Coakley, A. McGarry, G. F. Fitzgerald und R. P. Ross (1998) Increasing phage resistance of cheese starters - a case study using *Lactococcus lactis* DPC4268. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 51-55.

55. Coffey, A., D. Stokes, G. F. Fitzgerald und R. P. Ross (2001) Traditional and molecular approaches to improving bacteriophage resistance of Cheddar and Mozzarella cheese starters. *Irish J. Agricul. Food Res.* **40**: 239-270.

56. Cogan, T. M., M. Barbosa, E. Beuvier, B. Bianchisalvadori, P. S. Cocconcelli, I. Fernandes, J. Gomez, R. Gomez, G. Kalantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, M. C. Rea und E. Rodriquez (1997) Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* **64**: 409-421.

57. Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **22**: 10881-10890.

58. Corroler, D., N. Desmasures und M. Gueguen (1999) Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 91-99.

59. Crow, V. L., T. Coolbear, P. K. Gopal, F. G. Martley, L. L. McKay und H. Riepe (1995a) The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* **5**: 855-875.

60. Crow, V. L., P. K. Gopal und A. J. Wicken (1995b) Cell surface differences of lactococcal strains. *Int. Dairy J.* **5**: 45-68.

61. Crow, V. L., F. G. Martley, T. Coolbear und S. J. Roundhill (1995c) The influence of phage-assisted lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Ml8 on cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.* **5**: 451-472.

62. Crutz-Le Coq, A.-M., B. Cesselin, J. Commissaire und J. Anba (2002) Sequence analysis of the lactococcal bacteriophage bIL170: insights into structural proteins and HNH endonucleases in dairy phages. *Microbiology* **148**: 985-1001.

63. Daly, C. (1983) The use of mesophilic cultures in the dairy industry. *A. v. Leeuwenhook Int. J. Gen. M.* **49**: 297-312.

64. Daly, C., G. F. Fitzgerald und R. Davis (1996) Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *A. v. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* **70**: 99-110.

65. Daly, C., G. F. Fitzgerald, L. O. O`Connor und R. Davis (1998) Technological and health benefits of dairy starter cultures. *Int Dairy J* **8**: 195-205.

66. Davidson, A. R. und M. Gold (1992) Mutations abolishing the endonuclease activity of bacteriophage lambda terminase lie in two distinct regions of the A gene, one of which may encode a "Leucine Zipper" DNA-binding domain. *Virology* **189**: 21-30.

67. Davidson, B. E. und A. J. Hillier (1995) Developing new starters for fermented milk products. *Aust. J. Dairy Technol.* **50**: 6-9.

68. Davies, F. L., H. M. Underwood und M. J. Gasson (1981) The value of plasmid profiles for strain identification in lactic streptococci and the relationship between *Streptococcus lactis* 712, ML3 and C2. *J. Appl. Bacteriol.* **51**: 325-337.

69. Davis, R., D. Vanderlelie, A. Mercenier, C. Daly und G. F. Fitzgerald (1993) *Scr*FI restriction-modification system of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC503 - cloning and characterization of two *Scr*FI methylase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 777-785.

70. de Man, J. C., M. Rogosa und M. E. Sharpe (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135.

71. de Risi, J. L., V. R. Iyer und P. O. Brown (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression patterns with a complementary DNA microrarray. *Science* **270**: 680-686.

72. de Ruyter, P. G., O. P. Kuipers, W. C. Meijer und W. M. de Vos (1997) Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nat. Biotechnol.* **15**: 976-979.

73. de Saizieu, A., U. Certa, J. Warrington, C. Gray, W. Keck und J. Mous (1998) Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* **16**: 45-48.

74. de Vos, W. M., P. Hols, R. van Kranenburg, E. Luesink, O. P. Kuipers, J. van de Roost, M. Kleerebezem und J. Hugenholtz (1998) Making more of milk sugar by engineering lactic acid acteria. *Int. Dairy J.* **8**: 227-233.

75. Delorme, C., J. J. Godon, S. D. Ehrlich und P. Renault (1994) Mosaic structure of large regions of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* chromosome. *Microbiology UK* **140**: 3053-3060.

76. Deng, W., V. Burland, G. r. Plunkett, A. Boutin, G. F. Mayhew, P. Liss, N. T. Perna, D. J. Rose, B. Mau, S. Zhou, D. C. Schwartz, J. D. Fetherston, L. E. Lindler, R. R. Brubaker, G. V. Plano, S. C. Straley, K. A. McDonough, M. L. Nilles, J. S. Matson, F. R. Blattner und R. D. Perry (2002) Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J. Bacteriol.* **184**: 4601-4611.

77. Deng, Y. M., M. L. Harvey, C. Q. Liu und N. W. Dunn (1997) A novel plasmid-encoded phage abortive infection system from *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**: 149-154.

78. Deng, Y. M., C. Q. Liu und N. W. Dunn (1999) Genetic organization and functional analysis of a novel phage abortive infection system, AbiL, from *Lactococcus lactis*. *J. Biotechnol.* **67**: 135-149.

79. Descheemaeker, P., B. Pot, A. M. Ledeboer, T. Verrips und K. Kersters (1994) Comparison of the *Lactococcus lactis* differential medium (DCL) and SDS-page of whole-cell proteins for the identification of lactococci to subspecies level. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**: 459-466.

80. Desiere, F., C. Mahanivong, A. J. Hillier, P. S. Chandry, B. E. Davidson und H. Brüssow (2001) Comparative genomics of lactococcal phages: insight from the complete genome sequence of *Lactococcus lactis* phage BK5-T. *Virology* **283**: 240-252.

81. Dinsmore, P. K. und T. R. Klaenhammer (1994) Phenotypic consequences of altering the copy number of *abiA*, a gene responsible for aborting bacteriophage infections in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1129-1136.

82. Dinsmore, P. K. und T. R. Klaenhammer (1997) Molecular characterization of a genomic region in a *Lactococcus* bacteriophage that is involved in its sensitivity to the phage defense mechanism *abiA*. *J. Bacteriol.* **179**: 2949-2957.

83. Djordjevic, G. M. und T. R. Klaenhammer (1997) Bacteriophage-triggered defense systems - phage adaptation and design improvements. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4370-4376.

84. Djordjevic, G. M., D. J. O`Sullivan, S. A. Walker, M. A. Conkling und T. R. Klaenhammer (1997) A triggered-suicide system designed as a defense against bacteriophages. *J. Bacteriol.* **179**: 6741-6748.

85. Dougherty, B. A., C. Hill, J. F. Weidman, D. R. Richardson, J. C. Venter und R. P. Ross (1998) Sequence and analysis of the 60 Kb conjugative, bacteriocin-producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol. Microbiol.* **29**: 1029-1038.

86. Duggan, D. J., M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer und J. M. Trent (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Suppl. Nat. Genet.* **21**: 10-14.

87. Duplessis, M. und S. Moineau (2001) Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **41**: 325-336.

88. Durmaz, E., D. L. Higgins und T. R. Klaenhammer (1992) Molecular characterization of a 2nd abortive phage resistance gene present in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ME2. *J. Bacteriol.* **174**: 7463-7469.

89. Durmaz, E. und T. R. Klaenhammer (1995) A starter culture rotation strategy incorporating paired restriction/modification and abortive infection bacteriophage defenses in a single *Lactococcus lactis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1266-1273.

90. Durmaz, E. und T. R. Klaenhammer (2000) Genetic analysis of chromosomal regions of *Lactococcus lactis* acquired by recombinant lytic phages. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 895-903.

91. Edgell, D. R. und D. A. Shub (2001) Related homing endonucleases I-*Bmo*I and I-*Tev*I use different strategies to cleave homologous recognition sites. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **98**: 7898-7903.

92. el Karoui, M., D. Ehrlich und A. Gruss (1998) Identification of the lactococcal exonuclease/recombinase and its modulation by the putative chi sequence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**: 626-631.

93. Emond, E., B. Holler, I. Boucher, P. Vandenbergh, E. Vedamuthu, J. Kondo und S. Moineau (1997) Phenotypic and genetic characterization of the bacteriophage abortive infection mechanism *abiK* from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1274-1283.

94. Emond, E., E. Dion, S. A. Walker, E. R. Vedamuthu, J. K. Kondo und S. Moineau (1998) AbiQ, an abortive infection mechanism from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4748-4756.

95. Engelberg-Kulka, H. und G. Glaser (1999) Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 43-70.

96. Engelke, G., Z. Gutowskieckel, M. Hammelmann und K. D. Entian (1992) Biosynthesis of the lantibiotic nisin - genomic organization and membrane localization of the NisB protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3730-3743.

97. Epstein, C. B. und R. A. Butow (2000) Microarray technology - enhanced versatility, persistent challenge. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 36-41.

98. Erlandson, K. und C. A. Batt (1997) Strain-specific differentiation of lactococci in mixed starter culture populations using randomly amplified polymorphic DNA-derived probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2702-2707.

99. Esposito, D., W. P. Fitzmaurice, R. C. Benjamin, S. D. Goodman, A. S. Waldman und J. J. Scocca (1996) The complete nucleotide sequence of bacteriophage HP1 DNA. *Nucl. Acids Res.* **24**: 2360-2368.

100. Farber, J. M. (1996) An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food Protection* **59**: 1091-1101.

101. Ferea, T. L. und P. O. Brown (1999) Observing the living genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 715-722.

102. Ferretti, J. J., W. M. McShan, D. Adjic, D. Savic, G. Savic, K. Lyon, C. Primeaux, S. S. Sezate, A. N. Surorov, S. Kenton, H. Lai, S. Lin, Y. Qian, H. G. Jia, F. Z. Najar, Q. Ren, H. Zhu, L. Song, J. White, X. Yuan, S. W. Clifton, B. A. Roe und R. E. McLaughlin (2001) Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4658-4663.

103. Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty und J. M. Merrick (1995) Whole-genome random sequencing of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.

104. Foley, S., S. Lucchini, M. C. Zwahlen und H. Brussow (1998) A short noncoding viral DNA element showing characteristics of a replication origin confers bacteriophage resistance to *Streptococcus thermophilus*. *Virology* **250**: 377-387.

105. Foley, S., A. Bruttin und H. Brussow (2000) Widespread distribution of a group I intron and its three deletion derivatives in the lysin gene of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *J. Virology* **74**: 611-618.

106. Forde, A. und G. F. Fitzgerald (1999a) Analysis of exopolysaccharide (EPS) production mediated by the bacteriophage adsorption blocking plasmid pCI658 isolated from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HO2. *Int. Dairy J.* **9**: 465-472.

107. Forde, A. und G. F. Fitzgerald (1999b) Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *A. v. Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **76**: 89-113.

108. Friedrich, J. E. und T. E. Acree (1998) Gas chromatography olfactometry (GC/O) of dairy products. *Int. Dairy J.* **8**: 235-241.

109. Fuchs, B. M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwippl, W. Ludwig und R. Amann (1998) Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4973-4982.

110. Garde, S., M. Babin, P. Gaya, M. Nunez und M. Medina (1999) PCR amplification of the gene acmA differentiates *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5151-5153.

111. Garvey, P., G. F. Fitzgerald und C. Hill (1995a) Cloning and DNA sequence analysis of two abortive infection phage resistance determinants from the lactococcal plasmid pNP40. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4321-4328.

112. Garvey, P., D. van Sinderen, D. P. Twomey, C. Hill und G. F. Fitzgerald (1995b) Molecular genetics of bacteriophage and natural phage defense systems in the genus *Lactococcus*. *Int. Dairy J.* **5**: 905-947.

113. Garvey, P., C. Hill und G. F. Fitzgerald (1996) The lactococcal plasmid pNP40 encodes a 3rd bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 676-679.

114. Garvey, P., A. Rince, C. Hill und G. F. Fitzgerald (1997) Identification of a RecA homolog ($RecA_{Lp}$) on the conjugative lactococcal phage resistance plasmid pNP40 - evidence of a role for chromosomally encoded $RecA_L$ in abortive infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1244-1251.

115. Gasson, M. J. (1983) Genetic transfer systems in lactic acid bacteria. *A. v. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* **49**: 275-282.

116. Gasson, M. J., S. Swindell, S. Maeda und H. M. Dodd (1992) Molecular rearrangement of lactose plasmid DNA associated with high-frequency transfer and cell-aggregation in *Lactococcus lactis* 712. *Mol. Microbiol.* **6**: 3213-3223.

117. Gasson, M. J. (1993) Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 3-20.

118. Gasson, M. J., J. J. Godon, C. J. Pillidge, T. J. Eaton, K. Jury und C. A. Shearman (1995) Characterization and exploitation of conjugation in *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* **5**: 757-762.

119. Gasson, M. J. (1996a) Lytic systems in lactic acid bacteria and their bacteriophages. *A. v. Leeuwenhoek Int. J. Gen. Microbiol.* **70**: 147-159.

120. Gasson, M. J., K. Benson, S. Swindell und H. Griffin (1996b) Metabolic engineering of the *Lactococcus lactis* diacetyl pathway. *Lait* **76**: 33-40.

121. Gehring, K., A. Charbit, E. Brissaud und M. Hofnung (1987) Bacteriophage receptor site on the *Escherichia coli* K-12 LamB protein. *J. Bacteriol.* **169**: 2103-2106.

122. Geiss, G. K., R. E. Bumgarner, M. C. An, M. B. Agy, A. B. van`t Wout, E. Hammermark, V. S. Carter, D. Upschurch, J. I. Mullins und M. G. Katze (2000) Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology* **266**: 8-16.

123. Geller, B. L., R. G. Ivey, J. E. Trempy und B. Hettingersmith (1993) Cloning of a chromosomal gene required for phage infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. *J. Bacteriol.* **175**: 5510-5519.

124. Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar,

P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K. Entian, H. Fsihi, F. Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. M. Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J. C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Remmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J. A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland und P. Cossart (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-852.

125. Glasgow, A. C. (1989) Mobile DNA, p. 637-659, in D. E. Berg und M. M. Howe, eds. Mobile DNA. *American Society for Microbiology Press*, Washington, D. C.

126. Glöckner, F. O. (1998) Phylogenie und *in situ*-Identifizierung von Prokaryoten in limnischen und marinen Ökosystemen. *Doktorarbeit*, Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie, München.

127. Glöckner, F. O., B. M. Fuchs und R. Amann (1999) Bacterioplankton compositions in lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3721-3726.

128. Golub, T. R., D. K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeck, J. P. Mesirov, H. Coller, M. L. Loh, J. R. Downing und M. A. Caligiuri (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531-537.

129. Goodrich-Blair, H. und D. A. Shub (1994) The DNA polymerase genes of serveral HMU bacteriophages have similar group I introns with highly divergent open reading frames. *Nucl. Acids Res.* **22**: 3715-3721.

130. Goodrich-Blair, H. und D. A. Shub (1996) Beyond homing: competition between intron endonucleases confers a selective advantage on flanking genetic markers. *Cell* **84**: 211-221.

131. Haggard-Ljungquist, E., C. Halling und R. Calendar (1992) DNA sequence of the tail fiber genes of bacteriophage P2: evidence for horizontal transfer of tail fiber genes among unrelated bacteriophages. *J. Bacteriol.* **174**: 1462-1477.

132. Harrington, C. A., C. Rosenow und J. Retief (2000) Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Curr. Opin. Microbiol* **3**: 285-291.

133. Hattman, S. (1970) DNA methylation of T-even bacteriphages and their non-glucosylated mutants: its role in P1-directed restriction. *Virology* **42**: 359-367.

134. Hayward, R. E., J. L. De Risi, S. Alfadhli, D. C. Kaslow, P. O. Brown und P. K. Rathod (2000) Shotgun DNA microarrays and stage-specific gene expression in *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol. Microbiol.* **35**: 6-14.

135. Heap, H. A. und R. C. Lawrence (1976) The selection of starter strains for cheesemaking. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **2**: 16-20.

136. Heller, K. J., A. Geis und H. Neve (1995) Behaviour of genetically modified microorgansims in yoghurt. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 504-509.

137. Hendrix, R. W., M. C. M. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford und G. F. Hatfull (1999) Evolutionary relationships among diverse bateriophages and prophages: all the world`s a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 2192-2197.

138. Hertwig, S., W. Bockelmann und M. Teuber (1997) Purification and characterization of the lytic activity induced by the prolate-headed bacteriophage P001 in *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 233-239.

139. Hill, C., L. A. Miller und T. R. Klaenhammer (1990) Cloning, expression, and sequence determination of a bacteriophage fragment encoding bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **172**: 6419-6426.

140. Hill, C., L. A. Miller und T. R. Klaenhammer (1991) In vivo genetic exchange of a functional domain for between lactococcal plasmid pTR2030 and a virus. *J. Bacteriol.* **173**: 4363-4370.

141. Hill, C. (1993) Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 87-108.

142. Ho, Y., S. J. Kim und R. B. Waring (1997) A protein encoded by a group I intron in *Aspergillus nidulans* directly assists RNA splicing and is a DNA endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8994-8999.

143. Holzapfel, W. H. und U. Schillinger (1993) The Genus *Leuconostoc*, p. 1508-1534, in A. Ballows, H. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, und K. Schleifer, eds. The Prokaryotes. *Springer Verlag, New York*.

144. Huang, D. C., M. Novel und G. Novel (1991) A transposon-like element on the lactose plasmid of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Z270. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**: 101-106.

145. Hugenholtz, J. (1993) Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 165-178.

146. Hugenholtz, P., B. M. Goebel und N. R. Pace (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**: 4765-4774.

147. Huggins, A. R. (1984) Progress in dairy starter culture technology. *Food Technol.* **38**: 41-50.

148. Hull, R. R. (1977) Methods for monitoring bacteriophage in cheese factories. *Aust. J. Dairy Technol.* **32**: 63-64.

149. Hunger, W. (1986) Bakteriophagen in der milchverarbeitenden Industrie. *Deutsche Molkerei-Zeitung DMZ* **51/52**: 1762-1769.

150. Husson-Kao, C., J. Mengaud, J. C. Gripon, L. Benbadis und M. P. Chapot-Chartier (1999) The autolysis of *Streptococcus thermophilus* DN-001065 is triggered by several food-grade environmental signals. *Int. Dairy J.* **9**: 715-723.

151. Husson-Kao, C., J. Mengaud, B. Cesselin, D. van Sinderen, L. Benbadis und M. P. Chapot-Chartier (2000) The *Streptococcus thermophilus* autolytic phenotype results from a leaky prophage. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 558-565.

152. Irps, U. (1998) Untersuchungen zur molekulargenetischen Konstitution ausgewählter Milchsäurebakterien-Isolate aus Säuerungskulturen für die Herstellung fermentierter Milchprodukte. *Diplomarbeit*, Universität Bremen, Biotechnologie & Molekulare Genetik, Bremen.

153. Iwahana, H., M. Fujimura, Y. Takahashi, T. Iwabuchi, K. Yoshimoto und M. Itakura (1996) Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis using internal fluorescent labeling of PCR products. *Biotechniques* **21**: 510-519.

154. Jarvis, A. W., G. F. Fitzgerald, M. Mata, A. Mercenier, H. Neve, I. B. Powell, C. Ronda, M. Saxelin und M. Teuber (1991) Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology* **32**: 2-9.

155. Jarvis, A. W., M. W. Lubbers, N. R. Waterfield, L. J. Collins und K. M. Polzin (1995) Sequencing and analysis of the genome of lactococcal phage c2. *Int. Dairy J.* **5**: 963-976.

156. Josephsen, J. und E. Waagner Nielsen (1988) Plasmid profiles and bacteriophage sensitivity of bacteria of a cheddar cheese starter used for five years without rotation. *Milchwissenschaften* **43**: 219-223.

157. Jukes, T. H. und S. Osawa (1993) Evolutionary changes in the genetic code. *Comp. Biochem. Physiol.* **106**: 489-494.

158. Kao, C. und L. Snyder (1988) The *lit* gene product which blocks bacteriophage T4 late gene expression is a membrane protein encoded by a cryptic DNA element e14. *J. Bacteriol.* **170**: 2056-2062.

159. Katsura, I. (1987) Determination of bacteriophage Lambda tail length by a protein ruler. *Nature* **327**: 73-75.

160. Keilty, S. und M. Rosenberg (1987) Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J. Biol. Chem.* **262**: 6389-6395.

161. Kempler, G. M. und L. L. MacKay (1979) Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 316-323.

162. Kilpper-Bälz, R., G. Fischer und K. H. Schleifer (1982) Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci. *Curr. Microbiol.* **7**: 245-250.

163. Kim, W. S., J. Ren und N. W. Dunn (1999) Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**: 57-65.

164. Klaenhammer, T. R. und G. F. Fitzgerald (1994) Bacteriophages and bacteriophage resistance, p. 106-108, in M. J. Gasson und W. M. de Vos, eds. Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. *Blackie Academic and Professional*, Glasgow, United Kingdom.

165. Kleinschmidt, J., B. Soeding, M. Teuber und H. Neve (1993) Evaluation of horizontal and vertical gene transfer and stability of heterologous DNA in *Streptococcus thermophilus* isolated from yogurt and yogurt starter cultures. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 287-295.

166. Klijn, N., A. H. Weerkamp und W. M. Devos (1995) Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 788-792.

167. Kobayashi, H., M. Yamamoto und R. Aono (1998) Appearance of a stress-response protein, phage-shock protein A, in *Escherichia coli* exposed to hydrophobic organic solvents. *Microbiology* **144**: 353-359.

168. Kodym, R. und E. Horth (1995) Determination of radiation-induced DNA strand breaks in individual cells by non-radioactive labelling of 3' OH ends. *Int. J. Radiation Biol.* **68**: 133-139.

169. Konings, W. N., J. Kok, O. P. Kuipers und B. Poolman (2000) Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium [Review]. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 276-282.

170. Koonin, E. V., L. Aravind und A. S. Kondrashov (2000) The impact of comparative genomics on our understanding of evolution. *Cell* **101**: 573-576.

171. Kossykh, V. G., S. L. Schlagman und S. Hattman (1995) Phage T4 DNA [N^6-adenine] methyltransferase. *J. Biol. Chemistry* **270**: 14389-14393.

172. Kossykh, V. G., S. L. Schlagmann und S. Hattmann (1997) Comparative studies of the phage T2 and T4 DNA (N^6-adenine) methyltransferases: amino acid changes that affect catalytic activity. *J. Bacteriol.* **179**: 3239-3243.

173. Kostriken, R., J. N. Strathern, A. J. Klar, J. B. Hicks und F. Heffron (1983) A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **35**: 167-174.

174. Krämer, J. (1997) Lebensmittelmikrobiologie. 3rd. *Ulmer*, Stuttgart.

175. Kuhl, S. A. und L. L. McKay (1979) Plasmid profiles of lactose-negative and proeinase-deficient mutants of *Streptococcus lactis* C10, ML3 and M18. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 1193-1195.

176. Kühlmann, U. C., G. R. James und A. M. Hemmings (1999) Structural parsimony in endonuclease active sites: Should the number of homing endonuclease families be refined? *FEBS Letters* **463**: 1-2.

177. Kuipers, O. P., A. de Jong, S. Holsappel, S. Bron, J. Kok und L. W. Hamoen (1999) DNA-microarrays and food-biotechnology. *A. v. Leeuwenhoek* **76**: 353-355.

178. Kuipers, O. P. (2001) Complete DNA sequence of *Lactococcus lactis*adds flavor to genomics. *Genome Res.* **11**: 673-674.

179. Kumar, A., R. A. Malloch, N. Fujita, D. A. Smillie, A. Ishihama und R. S. Hayward (1993) The -35-recognition region of *Escherichia coli* σ^{70} is inessential for initiation of transcription at an "extended -10" promotor. *J. Mol. Biol.* **232**.

180. Labrie, S. und S. Moineau (2000) Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 987-994.

181. Labrie, S. und S. Moineau (2002) Complete genomic sequence of bacteriophage ul36: demonstration of phage heterogeneity within the P335 quasi-species of lactococcal phages. *Virology* **269**: 308-320.

182. Landers, E. (1999) Array of hope. *Suppl. Nat. Genetics* **21**: 3-4.

183. Le Bourgeois, P., M. Lautier, M. Mata und P. Ritzenthaler (1992) Physical and genetic map of the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Il1403. *J. Bacteriol.* **174**: 6752-6762.

184. Lee, P. S. und K. H. Lee (2000) Genomic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 171-175.

185. Lembke, J. und M. Teuber (1981) Inaktivierung von Bakteriophagen durch Desinfektionsmittel. *Deutsche Molkerei-Zeitung* **102**: 2-6.

186. Levin, M. E. und R. W. Hendrix (1993) A programmed frameshift is required for the synthesis of a bacteriophage lambda tail assembly protein. *J. Mol. Biol.* **234**: 124-139.

187. Levitz, R., D. Chapman, M. Amitsur, R. Green und L. Snyder (1990) The optional *E. coli prr* locus encodes a latent form of phage T4-induced anticodon nuclease. *EMBO J.* **9**: 1383-1389.

188. Lillehaug, D., I. F. Nes und N. K. Birkeland (1997) A highly efficient and stable system for site-specific integration of genes and plasmids into the phage ϕLC3 attachment site (*attB*) of the *Lactococcus lactis* chromosome. *Gene* **188**: 129-136.

189. Lister, J. (1873) A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quart. Microbiol. Sci.* **13**: 380-408.

190. Loof, M., J. Lembke und M. Teuber (1983) Characterization of the genome of the *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* bacteriophage P008 widespread in German cheese factories. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**: 413-423.

191. Lorenz, M. G. und W. Wackernagel (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **58**: 563-602.

192. Lubbers, M. W., N. R. Waterfield, T. P. J. Beresford, R. W. F. Lepage und A. W. Jarvis (1995) Sequencing and analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage C2 genome and identification of the structural genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4348-4356.

193. Lucchini, S., F. Desiere und H. Brüssow (1998) The structural gene module in *Streptococcus thermophilus* bacteriophage Sfi11 shows a hierarchy of relatedness to *Siphoviridae* from wide range of bacterial hosts. *Virology* **246**: 63-73.

194. Lucchini, S., F. Desiere und H. Brüssow (1999a) Comparative genomics of *Steptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory. *J. Virology* **73**: 8647-8656.

195. Ludwig, W., E. Seewald, R. Kilpper-Bälz, K. H. Schleifer, L. Magrum, C. R. Woese, G. E. Fox und E. Stackebrandt (1985) The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 543-551.

196. Maaloe, O. und N. O. Kjellgard (1966) Control of macromolecular synthesis. *W. A. Benjamin, Inc., N.Y.*, New York.

197. Madsen, A. und J. Josephsen (1998a) Characterization of *Lla*CI, a new restriction-modification system from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W15. *Biol. Chemistry* **379**: 443-449.

198. Madsen, A. und J. Josephsen (1998b) Cloning and characterization of the lactococcal plasmid-encoded type I1 restriction/modification system *Lla*DII. *Appl. Environ. Microbiology* **64**: 2424-2431.

199. Magni, C., F. L. Defelipe, F. Sesma, P. Lopez und D. Demendoza (1994) Citrate transport in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* - expression of the plasmid-borne citrate permease *citP*. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 75-82.

200. Magrini, V., D. Salmi, D. Thomas, S. K. Herbert, P. L. Hartzell und P. Youderian (1997) Temperate *Myxococcus xanthus* phage Mx8 encodes a DNA adenine methylase, Mox. *J. Bacteriol.* **179**: 4254-4263.

201. Mannu, L., A. Paba, M. Pes und M. F. Scintu (2000) Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 191-197.

202. Marinus, M. G. (1989) Methylation of DNA, p. 782-791, in F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, W. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechtor, und H. E. Umbarger, eds. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *American Society for Microbiology Press*, Washington, D. C.

203. Martin, M., M. A. Corrales, D. de Mendoza, P. Lopez und C. Magni (1999) Cloning and molecular characterization of the citrate utilization *citMCDEFGRP* cluster of *Leuconostoc paramesenteroides*. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**: 231-238.

204. McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston und R. K. Wilson (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar. *typhimurium* LT2. *Nature* **413**: 852-856.

205. McGrath, S., G. F. Fitzgerald und D. van Sinderen (2001) Improvement and optimization of two engineered phage resistance mechanisms in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 608-616.

206. McGrath, S., G. F. Fitzgerald und D. van Sinderen (2002a) Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12**: 3-15.

207. McGrath, S., G. F. Fitzgerald und D. van Sinderen (2002b) Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **43**: 509-520.

208. McKay, L. L. und K. A. Baldwin (1990) Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 3-14.

209. McLandsborough, L. A., K. M. Kolaetis, T. Requena und L. L. McKay (1995) Cloning and characterization of the abortive infection genetic determinant AbiD isolated from pBF61 of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KR5. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2023-2026.

210. McLandsborough, L. A., L. Sechaud und L. L. McKay (1998) Synergistic effects of AbiE or AbiF from pNP40 when cloned in combination with AbiD from pBF61. *J. Dairy Sci.* **81**: 362-368.

211. Meier, H., C. Koob, W. Ludwig, R. Amann, E. Frahm, S. Hoffmann, U. Obst und K. H. Schleifer (1997) Detection of enterococci with ribosomal RNA-targeted DNA probes and their use for hygienic drinking- water control. *Water Sci. Technol.* **35**: 437-444.

212. Mikkonen, M. und T. Alatossava (1995) A group I intron in the terminase gene of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *lactis* phage LL-H. *Microbiology* **141**: 2183-2190.

213. Minko, I., S. Hattman, R. S. Lloyd und V. Kosskyh (2001) Methylation by a mutant T2 DNA [N*6*-adenine] methyltransferase expands the usage of RecA-assisted endonuclease (RARE) cleavage. *Nucl. Acids Res.* **29**: 1484-1490.

214. Moineau, S., J. Fortier, H. W. Ackermann und S. Pandian (1992) Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. *Can. J. Microbiol.* **38**: 875-882.

215. Moineau, S., E. Durmaz, S. Pandian und T. R. Klaenhammer (1993a) Differentiation of two abortive mechanisms by using monoclonal antibodies directed toward lactococcal bacteriophage capsid proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 208-212.

216. Moineau, S., S. Pandian und T. R. Klaenhammer (1993b) Restriction modification systems and restriction endonucleases are more effective on lactococcal bacteriophages that have emerged recently in the dairy industry. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 197-202.

217. Moineau, S., S. Pandian und T. R. Klaenhammer (1994) Evolution of a lytic bacteriophage via DNA acquisition from the *Lactococcus lactis* chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1832-1841.

218. Moineau, S., S. A. Walker, E. R. Vedamuthu und P. A. Vandenbergh (1995a) Cloning and sequencing of *Lla*II restriction-modification genes from *Lactococcus lactis* and relatedness of this system to the *Streptococcus pneumoniae Dpn*II system. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2193-2202.

219. Moineau, S., S. A. Walker, B. J. Holler, E. R. Vedamuthu und P. A. Vandenbergh (1995b) Expression of a *Lactococcuslactis* phage resistance mechanism by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2461-2466.

220. Moineau, S., M. Borkaev, B. J. Holler, S. A. Walker, J. K. Kondo, E. R. Vedamuthu und P. A. Vandenbergh (1996) Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. *J. Dairy Sci.* **79**: 2104-2111.

221. Montag, D., H. Schwarz und U. Henning (1989) A component of the side tail fiber of *Escherichia coli* bacteriophage lambda can functionally replace the receptor-recognizing part of a long tail fiber protein of the unrelated bacteriophage T4. *J. Bacteriol.* **171**: 4378-4384.

222. Mora, D., M. G. Fortina, C. Parini, D. Daffonchio und P. L. Manachini (2000) Genomic subpopulations within the species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: relationships between pediocin AcH/PA-1 producing and non-producing strains. *Microbiology* **146**: 2027-2038.

223. Mosig, G. (1998) Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 379-413.

224. Mosig, G., J. Gewin, A. Luder, N. Colowick und D. Vo (2001) Two recombination-dependent DNA replication pathways of bacteriophage T4, and their roles in mutagenesis and horizontal gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 8306-8311.

225. Nauta, A., D. Vansinderen, H. Karsens, E. Smit, G. Venema und J. Kok (1996) Inducible gene expression mediated by a repressor-operator system isolated from *Lactococcus lactis* bacteriophage r1t. *Mol. Microbiol.* **19**: 1331-1341.

226. Neve, H., A. Geis und M. Teuber (1984) Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactic acid) streptococci. *J. Bacteriol.* **157**: 833-838.

227. Neve, H., A. Geis und M. Teuber (1987) Conjugation, a common plasmid transfer mechanism in lactic acid streptococci of dairy starter cultures. *Syst. Appl. Microbiol.* **9**: 151-157.

228. Nicholas, K. B. und H. B. Nicholas (1997) GeneDoc : a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *distributed by the author* .

229. Nyengaard, N., F. K. Vogensen und J. Josephsen (1993) *Lla*AI and *Lla*BI, 2 type II restriction endonucleases from *Lactacoccus lactis* subsp. *cremoris* W9 and W56 recognizing, respectively, 5'-/GATC-3' and 5'-C/TryAG-3'. *Gene* **136**: 371-372.

230. Nyengaard, N., F. K. Vogensen und J. Josephsen (1995) Restriction-modification systems in *Lactococcus lactis*. *Gene* **157**: 13-18.

231. Nyengaard, N. R., J. Falkenbergklok und J. Josephsen (1996) Cloning and analysis of the restriction-modification system *Lla*BI, a bacteriophage resistance system from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W56. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3494-3498.

232. O`Connor, L., A. Coffey, C. Daly und G. F. Fitzgerald (1996) AbiG, a genotypically novel abortive infection mechanism encoded by plasmid pCI750 of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC653. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3075-3082.

233. O`Connor, L., M. Tangney und G. F. Fitzgerald (1999) Expression, regulation, and mode of action of the AbiG abortive infection system of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC653. *Appl. & Environ. Microbiol.* **65**: 330-335.

234. O`Sullivan, D. J., C. Hill und T. R. Klaenhammer (1993) Effect of increasing the copy number of bacteriophage origins of replication, in *trans*, on incoming-phage proliferation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2449-2456.

235. O`Sullivan, D. J., K. Zagula und T. R. Klaenhammer (1995) In vivo restriction by *Lla*I is encoded by 3 genes, arranged in an operon with *llaIM*, on the conjugative *Lactococcus* plasmid pTR2030. *J. Bacteriol.* **177**: 134-143.

236. O`Sullivan, D., A. Coffey, G. F. Fitzgerald, C. Hill und R. P. Ross (1998) Design of a phage-insensitive lactococcal dairy starter via sequential transfer of naturally occurring conjugative plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4618-4622.

237. O`Sullivan, D., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald und A. Coffey (2000) Investigation of the relationship between lysogeny and lysis of *Lactococcus lactis* in cheese using prophage-targeted PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2192-2198.

238. O`Sullivan, D., D. P. Twomey, A. Coffey, C. Hill, G. F. Fitzgerald und R. P. Ross (2000) Novel type I restriction specificities through domain shuffling of HsdS subunits in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **36**: 866-875.

239. O`Sullivan, D., R. P. Ross, D. P. Twomey, G. F. Fitzgerald, C. Hill und A. Coffey (2001) Naturally occuring lactococcal plasmid pAH90 links bacteriophage resistance and mobility functions to a food-grade selectable marker. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 929-937.

240. Orla-Jensen, S. (1919) The lactic acid bacteria. *Host & Son*, Kopenhagen.

241. Osawa, S., T. H. Jukes, K. Watanabe und A. Muto (1992) Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol. Rev.* **56**: 229-264.

242. Ostergaard, S., L. Brondsted und F. K. Vogensen (2001) Identification of a replication protein and repeats essential for DNA replication of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 774-781.

243. Parma, D. H., M. H. Snyder, S. Sobolevski, M. Nawroz, E. Brody und L. Gold (1992) The Rex system of bacteriophage lambda: tolerance and altruistic cell death. *Genes and Dev.* **6**.

244. Parreira, R., S. D. Ehrlich und M. C. Chopin (1996a) Dramatic decay of phage transcripts in lactococcal cells carrying the abortive infection determinant AbiB. *Mol. Microbiol.* **19**: 221-230.

245. Parreira, R., R. Valyasevi, A. Lerayer, S. Ehrlic und M. Chopin (1996b) Gene organization and transcription of a late-expressed region of a *Lactococcus lactis* phage. *J. Bacteriol.* **178**: 6158-6165.

246. Pechmann, H. und M. Teuber (1980) Plasmid pattern of group N (lactic) streptococci. *Int. J. Microbiol. Hyg.* **1**: 133-136.

247. Pedersen, M., S. Ostergaard, J. Bresciani und F. K. Vogensen (2000) Mutational analysis of two structural genes of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1 involved in tail length determination and baseplate assembly. *Virology* **276**: 315-329.

248. Perou, C. M., S. S. Jeffrey, M. van de Rijn, C. A. Rees, M. B. Eisen, D. T. Ross, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S. X. Zhu und J. C. Lee (1999) Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 9212-9217.

249. Peters, S. (1999) Molekulargenetische Untersuchungen von Fermentationsisolaten aus mesophilen Säuerungskulturen zur Herstellung fermentierter Milchprodukte durch RAPD

sowie Untersuchungen der Isolate auf Phagen-Resistenzen. *Diplomarbeit*, Universität Bremen, Biotechnologie & Molekulare Genetik, Bremen.

250. Pillidge, C. J., L. J. Collins, L. J. H. Ward, B. M. Cantilllon, B. D. Shaw, M. J. Timmins, H. A. Heap und K. M. Polzin (2000) Efficacy of four conjugal lactococcal phage resistance plasmids against phage in commercial *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* cheese starter strains. *Int. Dairy J.* **10**: 617-625.

251. Platteeuw, C. und W. M. de Vos (1992) Location, characterization and expression of lytic enzyme-encoding gene *lytA* of *Lactococcus lactis* bacteriophage ϕUs3. *Gene* **118**: 115-120.

252. Polaczek, P., K. Kwan und J. L. Campbell (1998) GATC motifs may alter the conformation of DNA depending on sequence context and N^6-adenine methylation status: possible implications for DNA-protein recognition. *Mol. Gen. Genetic* **258**: 488-493.

253. Polzin, K. M., D. Romero, M. Shimizukadota, T. R. Klaenhammer und L. L. McKay (1993) Copy number and location of insertion sequences ISS1 and IS981 in lactococci and several other lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **76**: 1243-1252.

254. Potter, N. N. und F. E. Nelson (1952) Effects of calcium on proliferation of lactic *Streptococcus* bacteriophages. *J. Bacteriol.* **64**: 105-111.

255. Powell, I. B. und B. E. Davidson (1985) Characterization of streptococcal bacteriophage c6A. *J. Gen. Virol.* **66**: 2737-2741.

256. Prevots, F., M. Daloyau, O. Bonin, X. Dumont und S. Tolou (1996) Cloning and sequencing of the novel abortive infection gene AbiH of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S94. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**: 295-299.

257. Prevots, F. und P. Ritzenthaler (1998a) Complete sequence of the new lactococcal abortive phage resistance gene AbiO. *J. Dairy Science* **81**: 1483-1485.

258. Prevots, F., S. Tolou, B. Delpech, M. Kaghad und M. Daloyau (1998b) Nucleotide sequence and analysis of the new chromosomal abortive infection gene AbiN of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* S114. *FEMS Microbiol. Lett.* **159**: 331-336.

259. Pringle, C. R. (1996) Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch. Virol.* **141**: 2251-2256.

260. Proudnikov, D. und A. Mirzabekov (1996) Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling. *Nucl. Acids Res.* **24**: 4535-4542.

261. Quiberoni, A., J. I. Stiefel und J. A. Reinheimer (2000) Characterization of phage receptors in *Streptococcus thermophilus* using purified cell walls obtained by a simple protocol. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 1059-1065.

262. Quiberoni, A., L. Rezaiki, M. El Karoui, I. Biswas, P. Tailliez und A. Gruss (2001) Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res. Microbiol.* **152**: 131-139.

263. Radman, W. R. und R. Wagner (1986) Mismatch repair in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **20**: 523-538.

264. Ramos, M. S. und S. K. Harlander (1990) DNA fingerprinting of Lactococci and Streptococci used in dairy fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 368-374.

265. Ramos, A., K. N. Jordan, T. M. Cogan und H. Santos (1994) ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of citrate and glucose cometabolism by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1739-1748.

266. Reinheimer, J. A., L. Morelli, V. Bottazzi und V. Suarez (1995) Phenotypic variability among cells of *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. *Int. Dairy J.* **5**: 97-103.

267. Richmond, C. S., J. D. Glasner, R. Mau, H. Jin und F. R. Blattner (1999) Genome-wide expression in *Escherichia coli* K12. *Nucl. Acids Res.* **27**: 3821-3835.

268. Riemelt, I., B. Bartel und M. Malczan (1996) Phageninfektionen in der Milchwirtschaft, p. 172-174, in I. Riemelt, ed. Milchwirtschaftliche Mikrobiologie, Hamburg.

269. Rince, A., M. Tangney und G. F. Fitzgerald (2000) Identification of a DNA region from lactococcal phage sk1 protecting phage 712 from the abortive infection mechanism AbiF. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**: 185-191.

270. Rodrigues, U. M., M. Aguirre, R. R. Facklam und M. D. Collins (1991) Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding ribosomal RNA. *J. Appl. Bacteriol.* **71**: 509-516.

271. Rodriguez, E., B. Gonzalez, P. Gaya, M. Nunez und M. Medina (2000) Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* **10**: 7-15.

272. Ropkins, K. und A. J. Beck (2000) HACCP in the home: a framework for improving awareness of hygenie and safe food handling with respect to chemical risk. *T. Food Sci. Technol.* **11**: 105-114.

273. Rosenberg, C., R. P. M. van Gijlswijk, C. B. J. Vos, J. Wiegant, C. J. Cornelisse, H. J. Tanke und A. K. Raap (1998) Comparative genomic hybridization with lissamine- and fluorescein-labeled nucleotides. *Cytometry* **32**: 337-341.

274. Saffran, W. A., J. T. Welsh, R. M. Knobler, F. P. Gasparro, C. R. Cantor und R. L. Edelson (1988) Preparation and characterization of biotinylated psoralen. *Nucl. Acids Res.* **16**: 7221-7231.

275. Salama, M. S., W. E. Sandine und S. J. Giovannoni (1993) Isolation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* from nature by colony hybridization with ribosomal RNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3941-3945.

276. Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Plainview, NY.

277. Sanders, M. E., P. J. Leonhard, W. D. Sing und T. R. Klaenhammer (1986) Conjugal strategy for construction of fast acid producing, bacteriophage resistant lactic streptococci for use in dairy fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 1001-1007.

278. Sanders, M. E. (1987) Bacteriophages of industrial importance, p. 211-244, in S. M. Goyal, C. P. Gerba, und G. Bitton, eds. Phage ecology. *Wiley International Science*, New York.

279. Sandine, W. E. (1977) New techniques in handling lactic cultures to enhance their performance. *J. Dairy Sci.* **60**: 822-828.

280. Sandmeier, H. (1994) Acquisition and rearrangement of sequence motifs in the evolution of bacteriophage tail fibres. *Mol. Microbiol.* **12**: 343-50.

281. Schleifer, K. H., M. Ehrmann, C. Beimfohr, E. Brockmann, W. Ludwig und R. Amann (1995) Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **5**: 1081-1094.

282. Scholl, D., S. Rogers, S. Adhya und C. R. Merril (2001) Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it two infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. *J. Virol.* **75**: 2509-2515.

283. Schouler, C., S. D. Ehrlich und M. C. Chopin (1994) Sequence and organization of the lactococcal prolate-headed bIL67 phage genome. *Microbiology UK* **140**: 3061-3069.

284. Schouler, C., F. Clier, A. L. Lerayer, S. D. Ehrlich und M. C. Chopin (1998a) A type IC restriction-modification system in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **180**: 407-411.

285. Schouler, C., M. Gautier, S. D. Ehrlich und M. C. Chopin (1998b) Combinational variation of restriction modification specificities in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **28**: 169-178.

286. Shearman, C. A., K. L. Jury und M. J. Gasson (1994) Controlled expression and structural organization of a *Lactococcus lactis* bacteriophage lysin encoded by two overlapping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3063-3073.

287. Sheehan, M. M., J. L. Garcia, R. Lopez und P. Garcia (1996) Analysis of the catalytic domain of the lysin of the lactococcal bacteriophage Tuc2009 by chimeric gene assembling. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**: 23-28.

288. Sinha, R. P. (1991) Stability of plasmids in lactococci during extended incubation in growth media. *Can. J. Microbiol.* **37**: 488-490.

289. Smoot, J. C., K. D. Barbian, J. J. Van Gompel, L. M. Smoot, M. S. Chaussee, G. L. Sylva, D. E. Sturdevant, S. M. Ricklefs, S. F. Porcella, L. D. Parkins, S. B. Beres, D. S. Campbell, T. M. Smith, Q. Zhang, V. Kapur, J. A. Daly, L. G. Veasy und J. M. Musser (2002) Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* : in press.

290. Snaidr, J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig und K.-H. Schleifer (1997) Phylogenetic analysis and *in situ* hybridization of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2884-2896.

291. Snyder, L. (1995) Phage-exclusion enzymes:bonanza of biochemical and cell biology reagents? *Mol. Microbiol.* **15**: 415-420.

292. Stahl, D. A., B. Flesher, H. R. Mansfield und L. Montgomery (1988) Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1079-1084.

293. Stahl, D. A. und R. Amann (1991) Development and application of nucleic acid probes, p. 205-248, in E. Stackebrandt und M. Goodfellow, eds. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. *John Wiley & Sons Ltd.*, Chichester, UK.

294. Su, P., M. Harvey, H. J. Im und N. W. Dunn (1997) Isolation, cloning and characterisation of the AbiI gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M138 encoding abortive phage infection. *J. Biotechnol.* **54**: 95-104.

295. Su, P., H. Im, H. L. Hsieh, S. Kang'a und N. W. Dunn (1999) LlaFI, a type III restriction and modification system in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 686-693.

296. Swindell, S. R., K. H. Benson, H. G. Griffin, P. Renault, S. D. Ehrlich und M. J. Gasson (1996) Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2641-2643.

297. Tanskanen, E., D. Tulloch, A. Hillier und B. Davidson (1990) Pulsed-field gel electrophoresis of smaII digests of lactococcal genomic DNA, a novel method of strain identification. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3105-3111.

298. Tao, H., C. Bausch, C. Richmond, F. R. Blattner und T. Conway (1999) Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J. Bacteriol.* **181**: 6425-6440.

299. Taylor, W. R. (1986) The classification of amino acid conservation. *J. Theor. Biol.* **119**: 205-218.

300. Terzaghi, B. E. und W. E. Sandine (1975) Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **29**: 807-813.

301. Teuber, M., A. Geis und H. Neve (1993) The Genus *Lactococcus*, p. 1508-1534, in A. Ballows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. H. Harder, und K. H. Schleifer, eds. The Prokaryotes. *Springer Verlag, New York*.

302. Timinskas, A., V. Butkus und A. Janulaitis (1995) Sequence motifs characteristic for DNA [cytosine-N4] and DNA [adenine-N6] methyltransferases. Classification of all DNA methyltransferases. *Gene* **157**: 3-11.

303. Troester, H., S. Bub, A. Hunziker und M. F. Trendelenburg (2000) Stability of DNA repeats in *Escherichia coli dam* mutant strains indicates a Dam methylation dependent DNA deletion process. *Gene* **258**: 95-108.

304. Tsakalidou, E., E. Manolopoulou, E. Kabaraki, E. Zoidou, B. Pot, K. Kersters und G. Kalantzopoulos (1994) The combined use of whole-cell protein extracts for the identification (SDS-page) and enzyme-activity screening of lactic- acid bacteria isolated from traditional greek dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**: 444-458.

305. Twomey, D. P., L. L. McKay und D. J. Osullivan (1998) Molecular characterization of the *Lactococcus lactis Lla*KR2I restriction-modification system and effect of an IS982 element positioned between the restriction and modification genes. *J. Bacteriol.* **180**: 5844-5854.

306. Twomey, D. P., P. J. De Urraza, L. L. McKay und O. S. DJ (2000) Characterization of AbiR, a novel multicomponent abortive infection mechanism encoded by plasmid pKR223 of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KR2. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2647-2651.

307. Urbach, E., B. Daniels, M. S. Salama, W. E. Sandine und S. J. Giovannoni (1997) The *ldh* phylogeny for environmental isolates of *Lactococcus lactis* is consistent with rRNA genotypes but not with phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 694-702.

308. Valyasevi, R., W. Sandine und B. Geller (1994) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 bacteriophage sk1 receptor involving rhamnose and glucose moieties in the cell wall. *J. Dairy Sci.* **77**: 1-6.

309. van de Guchte, M., J. Kok und G. Venema (1992) Gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **88**: 73-92.

310. van de Peer, Y., S. Nicolai, P. de Rijk und R. de Wachter (1996) Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucl. Acid Res.* **24**: 86-91.

311. van Sinderen, D., H. Karsens, J. Kok, P. Terpstra, M. H. J. Ruiters, G. Venema und A. Nauta (1996) Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t. *Mol. Microbiol.* **19**: 1343-1355.

312. Villani, F., G. Moschetti, G. Blaiotta und S. Coppola (1997) Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 578-588.

313. Walker, S. A., C. S. Dombroski und T. R. Klaenhammer (1998) Common elements regulating gene expression in temperate and lytic bacteriophages of *Lactococcus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1147-1152.

314. Wallner, G., R. Amann und W. Beisker (1993) Optimizing fluorescent *in situ*-hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**: 136-143.

315. Wang, J., M. Hofnung und A. Charbit (2000) The C-terminal portion of the tail fiber protein of bacteriophage lambda is responsible for binding to LamB, its receptor at the surface of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **182**: 508-512.

316. Ward, L. J. H., J. C. S. Brown und G. P. Davey (1998) Two methods for the genetic differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris* based on differences in the 16S rRNA gene sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**: 15-20.

317. Waterfield, N. R., M. W. Lubbers, K. M. Polzin, R. W. F. Lepage und A. W. Jarvis (1996) An origin of DNA replication from *Lactococcus lactis* bacteriophage C2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1452-1453.

318. Weber, H. (1996) Starterkulturen in der milchverarbeitenden Industrie, p. 105-149, in H. Weber, ed. Mikrobiologie der Lebensmittel. *B. Behr`s Verlag GmbH & Co.*, Hamburg.

319. Weiner, L., J. L. Brisette und P. Model (1991) Stress-induced expression of the *Escherichia col*i phage shock protein operon is dependent on sigma 54 and modulated by positive and negative feedback mechanisms. *Genes & Develop.* **5**: 1912-1923.

320. Whitehead, H. R. und G. A. Cox (1935) The occurrence of bacteriophage in cultures of lactic streptococci. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **16**: 316-320.

321. Whitney, L. W., K. G. Becker, N. J. Tresser, C. I. Caballero-Ramos, P. J. Munson, V. V. Prabhu, J. M. Trent, H. F. McFarland und W. E. Biddison (1999) Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann. Neurol.* **46**: 425-428.

322. Wiegant, J. C. A. G., R. P. M. van Gijlswijk, R. J. Heetebrij, V. Bezrookove, A. K. Raap und H. J. Tanke (1999) ULS: a versatile method of labeling nucleic acids for FISH based on a monofunctional reaction of cisplatin derivatives with guanine moieties. *Cytogen. & Cell Gen.* **87**: 47-52.

323. Wilson, M., J. De Risi, H. H. Kristensen, P. Imboden, S. Rane, P. O. Brown und G. K. Schoolnik (1999) Exploring drug-induced alternations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 12833-12838.

324. Witte, A., U. Baranyi, R. Klein, M. Sulzner, C. Luo und G. Wanner (1997) Characterization of *Natronobacterium magadii* phage phiCh1, a unique archaeal phage containing DNA and RNA. *Mol. Microbiol.* **23**: 603-616.

325. Woese, C. R. und E. Fox (1977) Phylogenetic structure of the procaryotic domain: The primary kingdom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4576-4579.

326. Woynarowska, B. A., K. Roberts, J. M. Woynarowski, J. R. MacDonald und T. S. Herman (2000) Targeting apoptosis by hydroxymethylacylfulvene in combination with gamma radiation in prostate tumor cells. *Radiation Res.* **154**: 429-438.

327. Young, R. und U. Bläsi (1995) Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 191-205.

328. Yuan, R. (1981) Structure and mechanisms of multifunctional restriction endonucleases. *Annu. Rev. Biochem.* **80**: 285-315.

329. Zenz, K. I., H. Neve, A. Geis und K. J. Heller (1998) *Bacillus subtilis* develops competence for uptake of plasmid DNA when growing in milk products. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 28-32.

330. Zhang, Y., B. D. Price, S. Tetradis, S. Chakrabarti, G. Maulik und G. M. Makrigiorgos (2001) Reproducible and inexpensive probe preparation for oligonucleotide arrays. *Nucl. Acids Res.* **29**: E66, 1-6.

331. Zickrick, K. (1996) Mikrobiologie der Käse, p. 255-352, in H. Weber, ed. Mikrobiologie der Lebensmittel. *B. Behr`s Verlag GmbH & Co.*, Hamburg.

7. Anhang

7.1. Ergebnisse der Fluoreszenz- *in situ*- Hybridisierung

Zeit [h]	*EUB338 [%DAPI]*	*LGC354 [%DAPI]*	*LLA271 [%DAPI]*	*LLC68 [%DAPI]*	*LLL68 [%DAPI]*
0	~ 100 ± 5	98,9 ± 6,1	99,5 ± 5,3	98,0 ± 2	1,5 ± 5,3
1	94,5 ± 4,9	95,7 ± 5,2	92,6 ± 3,8	92,0 ± 7,5	0,6 ± 3,8
3	88,0 ± 7,9	91,7 ± 10,3	76,3 ± 11	75,6 ± 11,9	0,7 ± 11
4,5	87,2 ±10	85,8 ± 8,9	67,2 ± 12,2	65,3 ± 9,5	1,9 ± 12,2
6	69,1 ± 8,7	65,8 ± 9,5	44,6 ±13,4	38,4 ± 7,2	6,2 ± 13,4
7,5	19,8 ± 4,2	17,2 ± 4,5	1,1 ± 0,7	0,9 ± 0,6	0,2 ± 0,7
8,5	39,8 ± 9,9	42,5 ± 6,8	15,9 ± 4,8	15,4 ± 7,3	0,5 ± 4,8
9,5	51,1 ± 10,4	47,3 ± 7,3	34,2 ± 6,9	31,4 ± 7,7	2,8 ± 6,9
10,5	56,2 ± 7,9	53,4 ± 6,3	39,7 ± 5,3	39,5 ± 5,7	0,2 ± 5,3

7.2. Phagenresistenzgene in der Starterkultur und den untersuchten Fermentationen

Gene	*STK*	*SWA*	*SWE*	*C II*	*C V*	*C VI*	*C IX*
ads	42	22	57	65	63	81	75
lld I	97	89	91	94	90	89	95
lla 1403	74	50	96	88	80	77	76
*scr*F	3	5	4	6	3	4	2
lla II	10	22	17	18	17	4	13
lla BI	16	11	17	29	23	12	13
lla BII	3	5	4	6	3	4	2
lla CI	3	5	4	6	3	4	2
lla DII	10	17	26	29	23	8	30
abiB	39	66	78	94	67	65	53
abiC	3	5	4	6	3	4	2
abiG1	5	5	4	6	3	4	2
abiG2	4	5	4	6	3	4	2
abiH	3	5	4	6	3	4	2
abiK	3	5	4	6	3	4	2
abiM	7	11	9	12	3	4	12
abiN	3	5	4	18	3	4	2

Tab. 28. Prozentualer Anteil der Isolate aus einer Starterkultur und einer Fermentation mit kontinuierlicher Säuerung, die die untersuchten Phagenresistenzgene enthalten.

Gene	*B V*	*B IX*
ads	64	58
lld I	66	56
lla 1403	66	33
*scr*F	2	2
lla II	27	2
lla BI	2	2
lla BII	2	2
lla CI	2	2
lla DI	25	18
abiB	66	38
abiC	2	2
abiG1	2	2
abiG2	2	2
abiH	2	2
abiK	2	2
abiM	5	5
abiN	2	5

Tab. 29. Prozentuale Verbreitung der Phagenresistenzgene in den Isolaten einer Fermentation mit gestörter Säuerung.

7.3. Gene für Citratstoffwechsel und Aromabildung

	Probat 8/0	*Säurewecker*	*Ferm. C*	*Ferm. B*
Citrat-Permease	3,2	7,9	13,6	9,1
AL-Synthase	3,1	4,0	4,0	5,1
AL-Decarboxylase	25,8	57,1	61,9	27,3
PF-Lyase	41,9	71,4	66,7	36,4
Lactat-Permease	87,1	95,2	92,9	45,5
L-LDH	74,2	90,5	95,2	63,6

Tab. 30. Prozentualer Anteil der Gene des Lactose- und Citratstoffwechsels in der Starterkultur Probat 8/0 und am Ende einer Säurewecker-Fermentation bzw. von Fermentationen mit normaler oder gestörter Säuerung.

7.4. Ergebnisse der Analyse der Phagenresistenz- und der Stoffwechselgene

Starterkultur 8/0 `97

	RAPD-Typ C						*RAPD-Typ E*						*RAPD-Typ E2*				*RAPD-Typ G*				*RAPD-Typ H*										
Isolat-Nr.	***125***	***126***	***198***	***199***	***243***	***244***	***70***	***71***	***72***	***73***	***74***	***75***	***6***	***164***	***165***	***220***	***16***	***19***	***257***	***21***	***1***	***11***	***22***	***23***	***33***	***44***	***55***	***101***	***111***	***121***	***141***
Ads- *eps*	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
R/M-Gene																															
lld I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lla 1403	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lla II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*B I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*D II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Abi-Gene																															
abiB	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
abiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffwechsel-Gene																															
Citrat-Perm. (Lac)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrat-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Synthase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Decarboxyl.	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
PF-Lyase	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
L-LDH	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
D-LDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose-Perm. (Lac)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Lactose-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fermentation B V (6h)

	RAPD-Typ A					*RAPD-Typ B*								*Typ C*		*RAPD-Typ E*							*Typ F*		*RAPD-Typ G*		
	6	***2***	***63***	***82***	***83***	***68***	***79***	***60***	***80***	***59***	***93***	***202***	***205***	***66***	***53***	***70***	***18***	***64***	***159***	***26***	***31***	***70***	***145***	***217***	***17***	***65***	***67***
Ads-EPS	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
R/M-Gene																											
Ild I	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Ila 1403	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ila II	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
*Ila*B I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*Ila*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
*Ila*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*Ila*D II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abi-Gene																											
abiB	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffwechsel-Gene																											
Citrat-Perm. (Lac)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrat-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Synthase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Decarboxyl.		+	-	-	-					+	-	-	+							-	+	+					
PF-Lyase		+	-	-	-					+	-	+	+							+	+	+					
L-LDH		+	-	+	+					+	+	+	+							+	+	+					
D-LDH		-	-	-	-					-	-	-	-							-	-	-					
Lactose-Perm. (Lac)		-	-	-	+					+	-	+	+							+	+	+					
Lactose-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	RAPD-Typ H			***RAPD-Typ I***							***RAPD-Typ J***						
	74	***160***	***162***	***77***	***85***	***92***	***96***	***95***	***87***	***88***	***30***	***54***	***58***	***73***	***105***	***112***	***113***
Ads-EPS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
R/M-Gene																	
lld I	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
lla 1403	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lla II	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
*lla*B I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
*lla*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*D II	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Abi-Gene																	
abiB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffwechsel-Gene																	
Citrat-Perm. (Lac)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrat-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Synthase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Decarboxyl.	-	-	-								+	+	+	+	+	+	+
PF-Lyase	-	-	-								+	+	-	+	+	+	+
L-LDH	+	+	+								+	+	-	+	+	+	+
D-LDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose-Perm. (Lac)	+	+	+								+	+	-	+	+	+	+
Lactose-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fermentation B IX (10,5h)

	RAPD-Typ A																			*RAPD-Typ B*				*RAPD-Typ C*		*RAPD-Typ E*		*RAPD-Typ F*				
	20	***1***	***2***	***3***	***18***	***29***	***32***	***41***	***42***	***43***	***54***	***56***	***57***	***5***	***44***	***45***	***95***	***95***	***33***	***144***	***130***	***52***	***87***	***89***	***28***	***39***	***148***	***90***	***50***	***82***	***84***
Ads-EPS	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R/M-Gene																															
lld I	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
lla 1403	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lla II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*B I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*D II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Abi-Gene																															
abiB	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffwechsel-Gene																															
Citrat-Perm. (Lac)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrat-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Synthase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Decarboxyl.														-	-	-	-	-	-	+	+	-									
PF-Lyase														-	-	-	-	-	+	+	+	-									
L-LDH														+	-	-	+	+	+	+	+	-									
D-LDH														-	-	-	-	-	-	-	-	-									
Lactose-Perm. (Lac)														-	-	-	-	-	+	+	+	-									
Lactose-Perm. (Leu)														-	-	-	-	-	-	-	-	-									

	RAPD-Typ G				***RAPD-Typ H***						***RAPD-Typ J***				
	26	***14***	***22***	***23***	***17***	***40***	***100***	***48***	***49***	***51***	***52***	***93***	***96***	***98***	***99***
Ads-EPS	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
R/M-Gene															
lld I	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
lla 1403	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lla II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
*lla*B I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
*lla*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*D II	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
Abi-Gene															
abiB	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Stoffwechsel-Gene															
Citrat-Perm. (Lac)														-	-
Citrat-Perm. (Leu)														-	-
α-AL-Synthase														-	-
α-AL-Decarboxyl.														+	-
PF-Lyase														+	-
L-LDH														+	+
D-LDH														-	-
Lactose-Perm. (Lac)														+	+
Lactose-Perm. (Leu)														-	-

Fermentation C - Säurewecker Anfang

	Typ A	***RAPD-Typ B***			***Typ C***		***Typ D***	***Typ E***	***RAPD-Typ G***			***RAPD-Typ H***			***Typ I***		***Typ J***	
	13	***16***	***32***	***66***	***11***	***21***	***12***	***40***	***23***	***24***	***27***	***19***	***20***	***28***	***30***	***31***	***1***	***5***
Ads-EPS	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
R/M-Gene																		
Ild I	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ila 1403	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ila II	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
*Ila*B I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
*Ila*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*Ila*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*Ila*D II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Abi-Gene																		
abiB	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
abiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffwechsel-Gene																		
Citrat-Perm. (Lac)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrat-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Synthase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Decarboxyl.	-	+	+	+		+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
PF-Lyase	-	+	+	+		+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
L-LDH	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
D-LDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose-Perm. (Lac)	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Lactose-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fermentation C - Säurewecker Ende

	RAPD-Typ B				***Typ C***		***Typ D***	***RAPD-Typ E***						***RAPD-Typ E2***		***RAPD-Typ G***			***RAPD-Typ H***			***Typ I***	***Typ J***	
	54	***14***	***35***	***49***	***30***	***15***	***16***	***1***	***2***	***3***	***71***	***74***	***76***	***6***	***7***	***10***	***11***	***12***	***25***	***26***	***40***	***32***	***33***	***36***
Ads-EPS	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
R/M-Gene																								
Ild I	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Ila 1403	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ila II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
*Ila*B I	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
*Ila*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*Ila*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*Ila*D II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Abi-Gene																								
abiB	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffwechsel-Gene																								
Citrat-Perm. (Lac)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrat-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Synthase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Decarboxyl.		-	-	+		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		-	-	-	-	+	-	+	+
PF-Lyase		-	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		+	-	-	-	+	-	+	+
L-LDH		+	+	+		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	-	+	+
D-LDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose-Perm. (Lac)		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	-	+	+
Lactose-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fermentation CII - (2h)

	RAPD-Typ B									*Typ E*	*Typ G*	*RAPD-Typ I*		*RAPD-Typ J*			
	l 20	***l 10***	***l 15***	***l 16***	***l 19***	***v16***	***v17***	***v21***	***v22***	***l 4***	***l 25***	***l 14***	***v15***	***l 7***	***l 8***	***v5***	***v30***
Ads-EPS	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
R/M-Gene																	
lld I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
lla 1403	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lla II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
*lla*B I	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
*lla*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*D II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Abi-Gene																	
abiB	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
abiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Stoffwechsel-Gene																	
Citrat-Perm. (Lac)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrat-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Synthase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Decarboxyl.		+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
PF-Lyase		+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
L-LDH		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
D-LDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose-Perm. (Lac)		+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Lactose-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fermentation C V (5h)

	Typ A	*RAPD-Typ B*						*Typ C*		*RAPD-Typ D*				*RAPD-Typ E*						*RAPD-Typ E2*		*Typ F*	*RAPD-Typ G*		*RAPD-Typ H*		*RAPD-Typ I*		*RAPD-Typ J*	
	v43	*l 18*	*l 30*	*v15*	*v16*	*v29*	*v47*	*v18*	*v39*	*v10*	*v12*	*l 21*	*l 22*	*l 5*	*l 7*	*l 8*	*v6*	*v3*	*v9*	*v30*	*l 29*	*l 55*	*v34*	*l 39*	*l 42*	*v23*	*v40*	*v30*	*v24*	*l 32*
Ads-EPS	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
R/M-Gene																														
lld I	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
lla 1403	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lla II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
*lla*B I	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
*lla*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*D II	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Abi-Gene																														
abiB	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffwechsel-Gene																														
Citrat-Perm. (Lac)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Citrat-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Synthase		-	+	-	-	-	-			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
α-AL-Decarboxyl.		+	+	-	-	-	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
PF-Lyase		+	+	-	+	-	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
L-LDH		+	+	+	+	+	-			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-LDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose-Perm. (Lac)		+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fermentation C VI (6,5h)

	Typ A	RAPD-Typ B				Typ D	RAPD-Typ E							Typ F			Typ G		RAPD-Typ H		Typ I	RAPD-Typ J					
	v40	v45	v51	l 78	l 82	v5	l 2	l 50	l 51	l 52	v19	v22	v37	v32	v44	l 76	l 36	v39	v12	l 60	l 56	l 35	v7	v26	l 33	l 61	v31
Ads-EPS	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
R/M-Gene																											
lld I	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lla 1403	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lla II	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*B I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
*lla*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*D II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Abi-Gene																											
abiB	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffwechsel-Gene																											
Citrat-Perm. (Lac)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Citrat-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Synthase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Decarboxyl.		+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+			-	-		+	+	-		+	+	+	-	+
PF-Lyase		+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		+	+	-		-	-	-	-	-
L-LDH		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+			+	+		+	+	-		+	+	+	+	+
D-LDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose-Perm. (Lac)		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		+	+			+	+	+	+	+
Lactose-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fermentation C IX (10,5h)

	Typ A	***RAPD-Typ B***				***RAPD-Typ C***			***RAPD-Typ D***			***RAPD-Typ E***													***RAPD-Typ E2***	
	v41	***l 48***	***l 49***	***v19***	***v68***	***l 43***	***v22***	***l 1***	***v11***	***v15***	***l 26***	***l 2***	***l 4***	***l 6***	***l 8***	***v3***	***v29***	***v48***	***l 18***	***l 23***	***l 27***	***v5***	***v61***	***v62***	***v4***	***v8***
Ads-EPS	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
R/M-Gene																										
lld I	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
lla 1403	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lla II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
*lla*B I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
*lla*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*D II	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Abi-Gene																										
abiB	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffwechsel-Gene																										
Citrat-Perm. (Lac)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrat-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Synthase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Decarboxyl.				-	-			-											+	+	-	-	-	-		
PF-Lyase				+	-			+											+	+	+	-	+	+		
L-LDH				+	+			+											+	+	+	+	+	+		
D-LDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose-Perm. (Lac)				+	+			+											+	+	+	+	+	+		
Lactose-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	RAPD-Typ F			***RAPD-Typ G***						***RAPD-Typ H***					***RAPD-Typ I***			***RAPD-Typ J***	
	v38	***v50***	***l 34***	***l 35***	***l 41***	***l 54***	***l 58***	***v36***	***v39***	***l 29***	***l 42***	***l 56***	***v26***	***v33***	***v32***	***l 45***	***v37***	***v42***	***l37***
Ads-EPS	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
R/M-Gene																			
lld I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
lla 1403	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
*scr*F I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lla II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
*lla*B I	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
*lla*B II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
*lla*C I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*lla*D II	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Abi-Gene																			
abiB	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
abiC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abiN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffwechsel-Gene																			
Citrat-Perm. (Lac)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrat-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Synthase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-AL-Decarboxyl.		-	-						-	+	+	+	+	+		+	-	+	+
PF-Lyase		+	-						-	+	+	+	+	+		-	-	-	-
L-LDH		+	+						+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
D-LDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose-Perm. (Lac)		+	+						+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Lactose-Perm. (Leu)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ergebnis der Proteinfunktions-Analyseprogramme

PIR keywords:

Coat Protein	ORF 12
Hydrolase	ORF 50, 37, 22
Transmembranprotein	ORF21

PIR superfamilies

F4-1 major coat protein	ORF 12
Endodeoxyribonuclease	ORF 50 und 37

EC Nummern - Enzymfamilien:

N-Acetylmuramoyl L-Alanin Amidase	ORF 22

PROSITE patterns:

atp_gtp_a	ORF 54 und 17
cytochrome C	ORF 3
Leucin Zipper	ORF 41
Lipoyl	ORF 50
n6_mtase	ORF 32

PFAM Domänen:

hnh-Endonuklease	ORF 50 und 37
N-Acetylmuramoyl L-Alanin Amidase	ORF 22

Sequence BLOCKS:

Bacterial chromosomal replication initiator protein DNA A	ORF 2
Calcium-binding EGF-like domain	ORF 22
cbxx/cfqx Protein Signatur	ORF 25
Class III cytochrome C signature	ORF 3
Dihydroorotate dehydrogenase	ORF 21
Flavodoxin	ORF 21
g10d orphan receptor signature	ORF 9
gpr orphan receptor signature	ORF 38
glpt family transporter	ORF 21
glycoprotein c signature	ORF 33
hnh- Endonuklease	ORF 3
histone deacetylase family	ORF 29

lipolytic enzymes	ORF46
N-Acetylmuramoyl L-Alanin Amidase	ORF 22
protein sigma modulation ribo	ORFs 50, 12, 37, 4, 2, 16, 23, 31
peptidase family	ORF 3
prokaryotic zinc-dependent phospholipase c	ORF 17
ribosomal l28 family	ORF 11
ribosomal protein s7e	ORF 46
sh2 domain signature	ORF 4
streptococcal toxin	ORF 2
thermonuclease family	ORF 29
tissue inhibitor metalloprotease	ORF 22
transposase	ORF 31
kw reductase methylenetetra hydrofolate fadh2 ypl023c	ORF 4

Cluster of Orthologous Groups (COGs):

COG0739 membrane proteins related to metalloendopeptidases ORF 22

Ergebnis der Proteinstruktur-Analyseprogramme

Transmembran- Regionen:	ORFs 16, 21, 36, 47
Low complexity Regionen:	ORF 21
Coiled coil Regionen:	ORF 16, 11, 38, 5
Structrual classes: alpha beta	ORF 19, 17, 22, 2, 10, 5, 7, 6, 4, 54, 11, 15, 32, 44, 42, 28, 46, 23, 50, 48, 31, 41, 37
all beta	ORF 8, 9, 20, 13, 12, 18, 40
all alpha	ORF 1, 3, 43, 25, 29, 38

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dietmar Blohm, der mir ausreichend Freiraum bei der Bearbeitung dieses spannenden Themas ließ, mir aber in kritischen Situationen stets diskussionsbereit und helfend zur Seite stand.

Herrn Dr. Horst Neve, der mir durch den Forschungsaufenthalt in seinem Labor und die Bereitstellung von Phagen-DNA und Referenzstämmen den Einstieg in die Welt der Phagen und Phagenresistenzgene ermöglicht hat.

Frau Andrea Schaffrath, die die Sequenzierung des Phagen durchgeführt hat, und Frau Dorothea Kittlaus für die umfassende mikrobiologische Unterstützung bei der Anzucht unzähliger Bakterien. Nicht unerwähnt bleiben sollen auch die vielen "Heinzelmännchen"-Dienste, ohne die ein effizientes Arbeiten im Labor nicht möglich wäre.

Herrn Prof. Rudi Amann, Herrn Dr. Frank Oliver Glöckner, Frau Dr. Claudia Beimfohr und der Arbeitsgruppe Molekulare Ökologie des Max-Planck-Instituts, ohne deren Unterstützung bei der Durchführung der FISH-Experimente meine Blicke ins Mikroskop sicher nicht erfolgreich gewesen wären.

Herrn Dr. Karl-Heinz Hahne und Herrn Dr. Nolte von der Nordmilch e.G., deren stetes Interesse an meiner Arbeit bei mir den für mich wichtigen Eindruck hinterließ, eine angewandte und anwendbare Forschung zu betreiben.

der gesamten Arbeitsgruppe Biotechnologie und Molekulare Genetik. Besonders erwähnen möchte ich Michael Schmidt, Stefan Weiß, Marc Winnefeld und Chris Würdemann, ohne deren wissenschaftliche Diskussion sowie seelisch-moralische Unterstützung diese Arbeit nie fertig geworden wäre. (Ganz zu schweigen davon, dass Ihr nicht ganz unbeteiligt daran seid, dass mich dieses Themengebiet auch weiterhin begeistert.)

Meinen Geschwistern, Eltern, Schwiegereltern und Großeltern, die stets an mich geglaubt haben und mir immer mit aufmunternden Worten und tatkräftiger Hilfe zur Seite standen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Mann Frank Oliver, für die Liebe und die Geduld, die mir während der Entstehung dieser Arbeit Halt und Durchhaltevermögen gegeben haben, und die der Schlüssel zu unserem Glück im weiteren gemeinsamen Leben sind.