

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Partielle Charakterisierung der antilisteriellen Wirkung von
Pichia norvegensis und *Staphylococcus equorum*

Samir Velagić

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. U. M. Kulozik

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
2. Hon.-Prof. Dr. K. J. Heller
(Christian-Albrechts-Universität zu Kiel)

Die Dissertation wurde am 17.02.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 28.04.2011 angenommen.

“Anybody who has been seriously engaged in scientific work of any kind realizes
that over the entrance to the gates of the temple of science
are written the words: '*Ye must have faith.*' “

Max Planck

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer für die Überlassung des Themas, die persönliche Betreuung und für die Unterstützung mit wissenschaftlichen Ideen und Ratschlägen; Dankeschön für die „offene Tür“ auch im größten Stress.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Knut Heller für die Bereitschaft, trotz der weiten Anreise, als Zweitgutachter zu fungieren.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meine Betreuerin Dr. Stefanie Goerges für ihre wertvollen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen, ihre Geduld und Bereitschaft, alle Fragen und Schwierigkeiten zu klären und für das stete Aufbauen in den Tiefphasen. Ich danke vor allem für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Bei meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Knut Heller, Dr. Wilhelm Bockelmann, Dr. Horst Neve, Dr. Margarita Koslowsky bedanke ich mich für die zur Verfügung gestellten Stämme und Arbeitsmaterialien, für die sehr angenehme Zusammenarbeit und die lehrreiche Zeit in Kiel.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie möchte ich mich für das tolle Arbeitsklima und die familiäre Atmosphäre bedanken. Ich danke allen, denen ich die Zeit gestohlen habe und die mir mit Ideen und Arbeitsmaterialien ausgeholfen haben. Danke an die Menschen im „Hintergrund“, ohne die ein geregelter Tagesablauf am Institut nicht möglich gewesen wäre. Ich werde immer mit einem Lächeln an diese Zeit zurück denken.

Ein ganz besonderer Dank geht an die Freunde, die ich in Freising kennen gelernt und lieb gewonnen habe: Bääam-Carsten und Kristina, Genia und Holger, Nicole und Christian, Martina und Martin. Ich danke auch allen Freunden außerhalb des Instituts, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mich stets motiviert haben.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich, dass sie an mich geglaubt haben und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Für ein stets offenes Ohr von Leonie und ihrer Familie danke ich ganz herzlich.

Diese Arbeit wurde zum Teil durch das FEI-Projekt AiF 14786 N „Entwicklung einer antilisteriellen, frühen Oberflächenreifungskultur für geschmierte Käse“ gefördert.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	9
Summary	11
1 Einleitung	13
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
1.2 Lebensmittelkonservierung	16
1.3 Reifungsorganismen und ihr antibakterielles bzw. antilisterielles Potential	18
1.4 Zielsetzung	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Stammhaltung und -lagerung	24
2.2 Untersuchung der antilisteriellen Aktivität ausgewählter Hefenisolate	26
2.2.1 Kultivierung der Organismen	26
2.2.2 Präzipitation des Hefen-Exopolysaccharids (EPS)	26
2.2.3 Soft-Agar-Assays	27
2.2.4 Killertoxin-Assay	27
2.2.5 Cokultivierung der Hefen mit <i>L. monocytogenes</i> WSLC 1364 auf Festmedium	28
2.2.6 Cokultivierung der Hefen-Hauptkultur mit <i>L. monocytogenes</i> unter Einflussnahme unterschiedlicher Zusätze	29
2.2.7 Kultivierung der Organismen in getrennten Kompartimenten	33
2.2.8 Zellaufschluss	34
2.3 Rasterelektronenmikroskopie	34
2.4 Gelelektrophorese	35
2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	35
2.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese	36
2.5 Untersuchung der antilisteriellen Aktivität von <i>St. equorum</i> WS 4524	37
2.5.1 Molekularbiologische Methoden	37
2.5.1.1 PCR und Sequenzierung	37
2.5.1.2 Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)	38
2.5.1.3 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	39
2.5.2 Antilisterielle Aktivität und deren Stabilität	40
2.5.3 Flüssigchromatographie	41
3 Ergebnisse	44
<i>Pichia norvegensis</i> WSYC 592	44
3.1 Bestimmung des Hemmpotentials einiger Hefeisolate mittels Cokultivierung auf Festmedium	44
3.2 Hemmungskinetik auf Festmedium	44
3.3 Bestimmung der Hemmaktivität in Flüssigmedium	46

3.4	Einflussnahme auf die Hemmaktivität und deren Stabilität	46
3.4.1	Abhängigkeit der antilisteriellen Aktivität vom Zugabezeitpunkt der Listerien	47
3.4.2	Einfluss diverser Kohlenstoffquellen auf die antilisterielle Aktivität	48
3.4.2.1	Welche C-Quellen nehmen Einfluss auf die Hemmwirkung?	48
3.4.2.2	Tritt eine Initiierung der Hemmaktivität auf Seite der Listerien auf?	50
3.4.2.3	Die Sonderrolle des Lactat	52
3.4.3	Einfluss von Detergenzien	56
3.4.3.1	Nicht-ionische Detergenzien	56
3.4.3.2	Zwitterionische Detergenzien	59
3.4.3.3	Einfluss von Tween® 20 auf Hefen und Listerien	60
3.5	Untersuchung des Sekretoms von <i>P. norvegensis</i> WSYC 592	61
3.6	Kultivierung von Hefen und Listerien in getrennten Kompartimenten	64
3.7	Untersuchung der Freisetzung einer antilisteriellen Substanz in das Nährmedium	66
3.7.1	Killertoxin-Assay	67
3.7.2	Diffusionsversuche	67
3.7.3	Cokultivierung der Kultur- und Cokulturüberstände mit <i>L. monocytogenes</i> WSLC 1364	69
3.8	Rasterelektronenmikroskop (REM)-Analyse der Cokultivierung auf Festmedium	69
3.9	Überprüfung der Zellyse als mögliche Ursache der Hemmung	72
<i>Staphylococcus equorum</i> WS 4524		74
3.10	Molekularbiologische Untersuchungen	74
3.10.1	Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA)	74
3.10.2	Nachweis eines Peptidsynthetasegens mittels PCR	74
3.10.3	Pulsfeldgelelektrophorese	75
3.11	Antilisterielle Aktivität, Stabilität des unaufgereinigten Hemmstoffes von <i>St. equorum</i> WS 4524 und die Sensitivität der Listerien-Indikatorstämme	76
3.11.1	Bestimmung der antilisteriellen Aktivität	76
3.11.2	Sensitivität der Listerien-Indikatorstämme gegenüber dem Hemmstoff	77
3.11.3	Stabilität und biochemische Eigenschaften	78
3.12	Flüssigchromatographie	81
4	Diskussion	85
<i>Pichia norvegensis</i> WSYC 592		85
4.1	Stärke des Hemmpotentials	85
4.2	Initiation der Hemmung	85
4.3	Stabilität und Einflussnahme auf die Hemmaktivität in Flüssigmedium	86
4.3.1	Einflussnahme von C-Quellen auf die antilisterielle Aktivität	87
4.3.1.1	Zu Glucose strukturähnliche C-Quellen	87
4.3.1.2	Selektiv verwertbare C-Quellen	88
4.3.1.3	Unabhängigkeit der Hemmaktivität von der Mannose-Verwertung durch Listerien	90
4.3.1.4	Die Sonderrolle des Lactat	90
4.3.2	Einfluss von Detergenzien auf die antilisterielle Aktivität	94
4.3.2.1	Nicht-ionische Detergenzien	95
4.3.2.2	Zwitterionische Detergenzien	98
4.4	Das Sekretom von <i>P. norvegensis</i> WSYC 592	100
4.5	Kultivierung von Hefen und Listerien in getrennten Kompartimenten	102

4.6	Inaktivität des Kulturüberstandes	104
4.6.1	Killertoxin-Assay	104
4.6.2	Diffusionsversuche in Soft-Agar	105
4.6.3	<i>Geotrichum candidum</i> produziert zwei diffusible, antilisterielle Substanzen	105
4.6.4	Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> WSLC 1364 in Hefe- und Cokulturüberständen	107
4.7	Untersuchung eines Komplementsystem bei Hefen	107
4.8	Interpretation der REM-Aufnahmen und ihre Bedeutung für das Hemmprinzip der <i>P. norvegensis</i> WSYC 592	110
4.9	Zusammenfassung der Erkenntnisse über <i>P. norvegensis</i> WSYC 592	113
<i>Staphylococcus equorum</i> WS 4524		113
4.10	Molekularbiologische Untersuchungen	113
4.10.1	Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA)	113
4.10.2	Nachweis eines Peptidsynthetasegens	114
4.10.3	Pulsfeldgelelektrophorese	114
4.11	Antilisterielle Aktivität, Stabilität des unaufgereinigten Hemmstoffes von <i>St. equorum</i> WS 4524 und die Sensitivität der Listerien-Indikatorstämme	115
4.12	Flüssigchromatographie	116
4.13	Zusammenfassung der Erkenntnisse über <i>St. equorum</i> WS 4524	117
4.14	Ausblick	118
Literatur		120
Anhang A		136
Anhang B		137

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Strukturformeln der verwendeten Detergenzien.....	32
Abbildung 2.	Seitenansicht eines Transwell®-Einsatzes der Firma Corning.....	33
Abbildung 3.	Hemmungskinetik auf Festmedium	45
Abbildung 4.	Hemmungskinetik in Flüssigmedium.....	46
Abbildung 5.	Schematische Darstellung der Cokultivierungen mit erneuter Listerienzugabe	47
Abbildung 6.	Strukturvergleich einiger Zucker.....	49
Abbildung 7.	Cokultivierung mit Listerien, durch Glucose im Wachstum gefördert.....	51
Abbildung 8.	Cokultivierung mit variierenden Glucose-, Lactatkonzentrationen	54
Abbildung 9.	Einfluss der nicht-ionischer Detergenzien Tween®20 und Brij®35 auf die Hemmwirkung.....	57
Abbildung 10.	Einfluss des nicht-ionischen Detergens Triton® X-100 auf die Hemmwirkung	58
Abbildung 11.	Einfluss des nicht-ionischen Detergens Nonidet P-40 auf die Hemmwirkung	59
Abbildung 12.	Einfluss zwitterionischer Detergenzien auf die Hemmwirkung	60
Abbildung 13.	SDS-PAGE des Sekretoms der <i>P. norvegensis</i> WSYC 592	62
Abbildung 14.	2D-Gelelektrophorese des Sekretoms der <i>P. norvegensis</i> WSYC 592	63
Abbildung 15.	Hefezellzahlen während Kultivierung in Transwells® (Corning) bzw. Zellkultureinsätzen (Nunc)	66
Abbildung 16.	Killertoxin-Assay.....	67
Abbildung 17.	Agar-Well-Diffusion-Assay und Agar-Spot-Assay	68
Abbildung 18.	Agar-Membran-Assay	69
Abbildung 19.	REM-Aufnahmen von Cokultivierungen auf Festmedium.....	70
Abbildung 20.	REM-Aufnahmen von Zellüberresten	71
Abbildung 21.	REM-Aufnahmen ungewöhnlicher Zellstrukturen	72
Abbildung 22.	Gesamt- und Lebendkeimzahlen von <i>L. monocytogenes</i> WSLC 1364 während Cokultivierung in Flüssigmedium.....	73
Abbildung 23.	ARDRA.....	74
Abbildung 24.	Amplifikation eines Peptidsynthetasegenfragments.....	75
Abbildung 25.	PFGE	76
Abbildung 26.	Aktivitätsbestimmung des unaufgereinigten Hemmstoffes von <i>St. equorum</i> WS 4524	77
Abbildung 27.	Sensitivität der Listerien-Indikatorstämme gegenüber dem unaufgereinigten Hemmstoff von <i>St. equorum</i> WS 4524	77
Abbildung 28.	Aktivität des unaufgereinigten Hemmstoffes nach Lagerung	78
Abbildung 29.	Auswirkung unterschiedlicher Temperaturen auf die Hemm- aktivität.....	79
Abbildung 30.	Einfluss von proteolytischen Enzymen auf die Hemmaktivität.....	80
Abbildung 31.	Einfluss von DMSO auf die Hemmaktivität.....	80
Abbildung 32.	Elutionsprofil des unaufgereinigten Hemmstoffes bei Verwen- dung einer HiTrap Desalting Säule	82
Abbildung 33.	Elutionsprofil des unaufgereinigten Hemmstoffes bei Verwen- dung einer Superose 6 10/300 GL Säule	82

Abbildung 34. Elutionsprofil des unaufgereinigten Hemmstoffes bei Verwendung von HIC-Säulen	84
Abbildung 35. Rekonstruktion des unvollständigen Citrat-Zyklus in <i>L. monocytogenes</i> EGD	88
Abbildung 36. Killertoxin-Assay	104
Abbildung 37. <i>L. monocytogenes</i> nach Inkubation mit D-3-Phenyllactat.....	111
Abbildung 38. Sensitivität der Listerien-Indikatorstämme gegenüber dem unaufgereinigten Hemmstoff von <i>St. equorum</i> WS 2733	115
Abbildung 39. Elutionsprofil des unaufgereinigten Hemmstoffes von <i>St. equorum</i> WS 2733 bei Verwendung einer HiTrap Desalting Säule.....	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Einteilung der Bakteriozine	18
Tabelle 2. Verwendete Organismen	25
Tabelle 3. Verwendete Kohlenstoffquellen	31
Tabelle 4. Verwendete Detergenzien	31
Tabelle 5. Cokultivierung mit erneuter Listerienzugabe.....	48
Tabelle 6. Cokultivierung der Stämme <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und EGD-e Δpts^{Man} , $\Delta lmo0027$ mit den Hefen WSYC 592 und WSYC 623	52
Tabelle 7. Verwertbarkeit der C-Quellen	55
Tabelle 8. Wachstum der Hefen- und Listerien in Gegenwart von Detergenzien	56
Tabelle 9. Einfluss von Tween [®] 20 auf die Hefen- und Listerienzellen.....	61
Tabelle 10. Wachstumsversuche in Transwells [®] (Corning) mit 0,4 μ m Porendurchmesser	64
Tabelle 11. Wachstumsversuche in Zellkultureinsätzen (Nunc) mit 0,2 μ m Porendurchmesser	65

Abkürzungsverzeichnis

Gattungsnamen

A.	<i>Arthrobacter</i>
B.	<i>Brevibacterium</i>
C.	<i>Candida</i>
D.	<i>Debaryomyces</i>
G.	<i>Geotrichum</i>
I.	<i>Issatchenkia</i>
K.	<i>Kluyveromyces</i>
L.	<i>Listeria</i>
P.	<i>Pichia</i>
S.	<i>Saccharomyces</i>
St.	<i>Staphylococcus</i>

Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
kVh	Kilovoltstunde
L	Liter
M	Mol
mAU	Milli Absorbance units
mbar	Millibar
min	Minute
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
s	Sekunde
SV	Säulenvolumen
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

Andere Abkürzungen

2D	zweidimensional
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDRA	<i>amplified ribosomal DNA restriction analysis</i>
AU	<i>arbitrary units</i>
B.	Bouillon

BHI	<i>brain heart infusion</i>
bp	<i>base pairs</i>
CBS	Centralbureau voor Schimmelcultures, Niederlande
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CMC	<i>critical micelle concentration</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EPS	Exopolysaccharid
EU	Europäische Union
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GRAS	<i>generally recognized as safe</i>
HIC	<i>hydrophobic interaction chromatography</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
KbE	Koloniebildende Einheiten
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MilliQ	mittels Millipore-Anlage gereinigtes Wasser
mPC	<i>modified Plate Count</i>
MTP	Mikrotiterplatte
Na	Natrium
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
Pos.	Position
PTS	Phosphotransferase-System
REM	Rasterelektronenmikroskop
rDNS	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>scanning electron microscope</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
sp.	Spezies
TCA	<i>tri-chloric acid</i>
TE	Tris-HCl und EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSG	<i>trypticase soy glucose</i>
WS	Weihenstephaner Stammsammlung
WSLC	Weihenstephan <i>Listeria</i> Collection
WSYC	Weihenstephan Yeast Collection
U	<i>units</i>
ÜNK	Übernachtskultur
YG	<i>yeast extract glucose</i>
YG ⁺	<i>yeast extract glucose containing 1% tryptone</i>
YGCB	<i>yeast extract glucose chloramphenicol bromphenolblue</i>
YL ⁺	<i>yeast extract sodium lactate containing 1% tryptone</i>

Zusammenfassung

In Deutschland und Europa ist seit Jahren ein stetiger Anstieg von Listeriose-Erkrankungen zu verzeichnen. Die Mortalitätsrate liegt zwischen 20 % und 50 %. Die häufigste Ursache dafür ist der Verzehr kontaminierter Lebensmittel. Das Problem besteht in der Lebensmittelkonservierung. Die Lebensmittelsicherheit muss gewährleistet sein, ohne den Geschmack, die Konsistenz oder den Nährwert des Produktes zu beeinflussen. Da speziell oberflächengereifte Käse eine hohe Kontaminationshäufigkeit mit *Listeria monocytogenes* aufweisen, ist im Rahmen der biologischen Konservierung neben der Etablierung von definierten Oberflächenkulturen der Einsatz von Schutzkulturen ein vielversprechender Ansatz.

Es würde sich anbieten antilisterielle Hefen und Staphylokokken zum Einsatz zu bringen, da sie bereits in der frühen Phase der Käsereifung vorzufinden sind. Dadurch könnten Listerienkontaminationen von Beginn des Reifungsprozesses an verhindert werden. Jedoch muss vor einem kommerziellen Einsatz sichergestellt werden, dass die Organismen keine verbrauchergefährdenden Substanzen produzieren. Schwerpunkt dieser Arbeit war die nähere Untersuchung antilisteriell wirkender Hefen- und Staphylokokkenisolate auf ihre Eigenschaften.

Pichia norvegensis

Mit Hilfe unterschiedlicher Cokultivierungsassays konnte beim *Pichia norvegensis*-Stamm WSYC 592 ein außerordentliches Hemmpotential festgestellt werden. Die Hefe war in der Lage einen Titer von 10^5 bis 10^6 Listerienzellen pro cm^2 oder pro mL bis unter die Nachweisgrenze zu reduzieren bzw. vollständig abzutöten. Die inhibitorische Wirkung der Hefe war in ihrer stationären Wachstumsphase am stärksten ausgeprägt. Die listerizide Wirkung der *P. norvegensis* konnte bei Cokultivierung mit *L. monocytogenes* WSLC 1364 sowohl auf Fest-, als auch in Flüssigmedium beobachtet werden. Eine Hemmung blieb aus, wenn die Nährmediumkomponente Glucose durch Lactat ersetzt wurde. Auch wenn *L. monocytogenes* WSLC 1364 zu einer Cokultur nach 24 Stunden erneut zugegeben bzw. zu einer Hefekultur nach 72 Stunden zugegeben wurde, blieb eine Hemmung aus. Da die gleichzeitige Zugabe von Glucose, Fructose oder Mannose die Hemmung der Listerien wiederherstellte, deutet dies auf einen erforderlichen aktiven Metabolismus der Hefe zur Ausübung der Inhibierung hin. Minimale Konzentrationen drei

nicht-ionischer und eines zwitterionischen Detergens hoben die antilisterielle Hemmwirkung vollständig auf. Während bei diversen Experimenten mit dem zell-freien Kulturüberstand der *P. norvegensis* WSYC 592 eine inhibitorische Aktivität ausblieb, wurde bei Kultivierung der Hefe WSYC 592 und *L. monocytogenes* WSLC 1364 in getrennten Kompartimenten eine Hemmung beobachtet. Dies spricht gegen einen Zell-Zell-Kontakt induzierten Wirkmechanismus, was durch REM-Aufnahmen der cokultivierten Organismen gestützt wird. Den Ergebnissen der vorliegenden Studie zufolge könnte *P. norvegensis* WSYC 592 eine oder mehrere diffusible und instabile antilisterielle Substanzen produzieren, die zur Inhibierung der Listerien fortwährend synthetisiert werden müssen.

Staphylococcus equorum

Die Identifizierung des antilisteriell wirksamen *Staphylococcus equorum*-Stammes WS 4524 konnte mit Hilfe der *amplified rDNA restriction analysis* (ARDRA) und der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) bestätigt werden. Der Stamm produziert eine gegenüber Hitze und proteolytischen Enzymen stabile Substanz, auf die verschiedene Listerien-Indikatorstämme unterschiedlich sensitiv reagieren. Weiterhin deuten der Nachweis eines Peptidsynthetasegens, sowie der hydrophobe Charakter der Substanz stark auf das bereits bekannte Peptidantibiotikum Micrococcin P₁ hin.

Summary

The cases of listeriosis in Germany and Europe have been increasing steadily for years. The major cause for listeriosis, which has a mortality rate of 20 - 50 %, is the consumption of contaminated food resulting from food preservation problems. The safety of the food has to be guaranteed without affecting its taste, consistency or nutritional value. Since smear-ripened cheeses, especially, are frequently contaminated with *Listeria monocytogenes*, the establishment of defined ripening cultures and the application of protective cultures are promising approaches for the biological preservation of these cheeses.

The use of antilisterial yeasts and staphylococci would be ideal, since these microorganisms grow in the early stages of the cheese ripening process. Hence, listerial contamination could be prevented from the beginning of the cheese ripening. For a commercial application of these antilisterial yeasts and staphylococci in food, it is of major importance to identify the substance responsible for the antilisterial activity in order to avoid potential harmful effects for the customer. The focus of this work was the detailed investigation of the properties of antilisterial yeasts and staphylococci.

Pichia norvegensis

The exceptional antilisterial activity of the yeast strain *Pichia norvegensis* WSYC 592 was determined by means of different co-cultivation assays. The yeast strain was able to reduce *L. monocytogenes* WSLC 1364 titres of 10^5 to 10^6 cells per cm^2 and per mL, respectively, below the detection limits or to completely kill the indicator strain. The antilisterial activity of the yeast strain was only observed when *L. monocytogenes* WSLC 1364 and *P. norvegensis* WSYC 592 grew in a co-culture, either on a solid agar surface or in liquid media. The yeast exerted a bacteriocidal effect. Inhibition was maximal in the stationary growth phase of the yeast. No inhibition occurred, when *L. monocytogenes* WSLC 1364 was added to a co-culture after 24 h or to a yeast culture after 72 h, respectively, but addition of fructose, glucose or mannose restored the antilisterial activity, which indicates that an active yeast metabolism is needed for the inhibition of *Listeria*. Addition of three different non-ionic and one zwitterionic detergent at minimal concentration effectively abolished the inhibitory activity. While various experiments using the cell-free

yeast culture supernatant did not show any inhibitory activity at all, cultivation of *L. monocytogenes* WSLC 1364 and *P. norvegensis* WSYC 592 separated by a membrane resulted in inhibition of *Listeria* indicating that the inhibitory activity did not depend on cell-cell contact. In addition, this finding was supported by REM images of yeasts and *Listeria* during co-cultivation. According to the findings of this study, it is likely that the *P. norvegensis* strain WSYC 592 produces one or more diffusible and unstable antilisterial substances that have to be synthesized constantly in order to inhibit *Listeria*.

Staphylococcus equorum

The identification of the antilisterial *Staphylococcus equorum* strain WS 4524 could be confirmed by the use of *amplified rDNA restriction analysis* (ARDRA) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The *St. equorum* strain WS 4524 produces an antilisterial substance that is stable against heat and enzymes. Different sensitivities of various *Listeria* strains to this substance were observed. The hydrophobic character of the substance and the presence of a peptide synthetase gene indicate similarity to Micrococcin P₁, a well-known peptide antibiotic produced by *St. equorum* WS 2733.

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des FEI-Projektes AiF 14786 N „Entwicklung einer antilisteriellen, frühen Oberflächenreifungskultur für geschmierte Käse“ angefertigt. Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung einer derzeit nicht verfügbaren definierten Reifungskultur zur Senkung des Risikos einer Kontamination mit *L. monocytogenes* bei der Herstellung geschmierter Käse, insbesondere Rotschmiere- und Harzer Käse. Bei der Entwicklung der Schutz- und Reifungskultur lag die Untersuchung antilisteriell wirkender Hefen und Staphylokokken nahe, da sie die Salzbadmikroflora, als auch die Käsemikroflora der frühen Reifungsstadien dominieren.

1.1 *Listeria monocytogenes*

Die Gattung *Listeria* besteht aus einer Gruppe grampositiver, nicht sporulierender, fakultativ anaerober Stäbchenbakterien (108) und gehört neben den Gattungen *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* dem Phylum der Firmicuten an (86). Von den acht beschriebenen Spezies der Gattung *Listeria* - *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* und die kürzlich beschriebenen Spezies *L. marthii* (85) und *L. rocourtiae* (113) - gelten nur die Spezies *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* als opportunistische Krankheitserreger. Während *L. ivanovii* vorwiegend Infektionen bei Wiederkäuern hervorruft (194) und Infektionen beim Menschen sehr selten sind (50), ist *L. monocytogenes* in der Lage ein breites Wirtsspektrum im Tierreich (197) als auch Menschen zu infizieren (150). Als ubiquitär vorkommendes Bakterium wird *L. monocytogenes* z.B. in Pflanzen, Gewässern und im Erdboden ebenso gefunden, wie in Silage, Abwässern oder Schlachtabfällen. Zudem ist *L. monocytogenes* aus Fäzes von Mensch und Tier isoliert worden (69).

Intrazellulärer Infektionszyklus

L. monocytogenes als invasives Pathogen kann über die Haut, die Augen und vor allem über den Gastrointestinaltrakt in den Wirt eindringen (92, 108). Neben professionellen Phagozyten wie Makrophagen, kann *L. monocytogenes* in praktisch jede zellkernenthaltene Zelle eindringen, wie z.B. Epithelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten, Endothelzellen und verschiedene Nervenzelltypen (92, 194). Anders als bei *Salmonella*, wo es beim Eindringen in eine Wirtszelle zum sog. *membrane ruffling* kommt (102), induziert *L. monocytogenes* bei nicht-

ruffling kommt (102), induziert *L. monocytogenes* bei nicht-phagozytierenden Zelllinien durch die Oberflächenproteine Internalin A und B dessen Phagozytose (114). Im Zytoplasma der Wirtszellen liegen die Listerienzellen zunächst in einer primären Vakuole vor, aus der sie sich durch die Sekretion von Hämolyisin (Listeriolysin O) und Phospholipasen befreien. Zur intrazellulären Fortbewegung werden an einem der apikalen Enden der Listerienzelle sogenannte Aktinschweife ausgebildet, durch dessen Abstoßeffekt sich die Listerien aktiv fortbewegen und so zur Plasmamembran der Wirtszelle gelangen. An dieser angekommen bilden sie Fortsätze (*protrusions*) aus, sodass sie in die nicht-infizierte Nachbarzelle eindringen bzw. von ihr phagozytiert werden. Auch hier können sich die Listerien aus der entstandenen sekundären Vakuole mit Hilfe von Hämolyisin und Phospholipasen befreien. Geschützt vor der Immunantwort des Wirtsorganismus vermehren und bewegen sich die Listerienzellen auf diese Weise von Zelle zu Zelle fort (48, 194).

Humane Listeriose

Listeriose wird durch alle 13 Serovare (1/2 (a, b, c), 3 (a, b, c), 4 (a, ab, b, c, d, e) und 7) der Spezies *L. monocytogenes* verursacht, wobei nur drei Serovare (1/2 a, 1/2 b und 4b) für mehr als 90 % der Listeriosefälle verantwortlich sind (69, 194). Über die infektiöse Dosis kann keine genaue Aussage getroffen werden, da aufgrund der Inkubationszeit von bis zu 70 Tagen die Erregermenge im Lebensmittel zum Zeitpunkt der Infektion nicht mehr ermittelt werden kann. Die erforderliche Infektionsdosis hängt insbesondere vom Gesundheitszustand der jeweiligen Person ab. Bei gesunden Erwachsenen wurde von infektiösen Dosen mit 10^5 – 10^9 KbE pro Milliliter (mL) bzw. Gramm (g) Lebensmittel berichtet. Bei Risikopersonen wurden Werte von weniger als 10 und 10^4 KbE/mL bzw. g Lebensmittel dokumentiert. Auch bei tierexperimentellen Untersuchungen wurden keine hilfreichen Ergebnisse erzielt, da z.B. Mäuse im Darm nicht über die entscheidenden Rezeptoren verfügen (2, 10, 150).

Die Listeriose des Menschen äußert sich vielfältig, jedoch tritt sie beim gesunden Menschen meist nur als nicht-invasive gastrointestinale Listeriose auf (10). Die hervorgerufene Gastroenteritis kann viele Gründe (infektiöser und nicht-infektiöser Art) haben und wird oft nicht als solche erkannt (3). Die invasive Listeriose dagegen tritt häufig bei älteren oder immunsupprimierten Menschen auf und kann sich als Sepsis, Meningitis oder Enzephalitis manifestieren (10). Diese Form der Liste-

riose kann auch von der infizierten Mutter über die Plazenta auf den Fötus übertragen werden (59) und zu einer Schädigung des Embryos führen bzw. eine Fehlgeburt hervorrufen (10).

Obwohl Listeriose selten auftritt (0,3 Fälle pro Jahr und 100.000 Einwohner der EU), ist sie durch eine hohe Todesfallrate gekennzeichnet (54). Im Vergleich zur Listeriose zeigt eine Salmonellose eine Letalität von nur 0,04% (2). Trotz frühzeitigem Antibiotikaeinsatz führt die Listeriose bei einer fortgeschrittenen Infektion in 20-30 % der Fälle zum Tod des Patienten (194). Nachdem die Listeriose-Erkrankungen im Jahr 2005 sprunghaft auf eine jährliche Erkrankungszahl von über 500 Fällen stiegen und sich auch im Jahr 2006 auf diesem Niveau hielten, ging die Anzahl der gemeldeten Erkrankungsfälle 2007 und 2008 deutlich zurück (4). Im Jahr 2008 wurden 306 Listeriosen übermittelt (entspricht einer Inzidenz von 0,4 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner). Die humane Listeriose ist fast ausnahmslos auf kontaminierte Lebensmittel zurückzuführen (69, 150).

L. monocytogenes in Lebensmitteln

L. monocytogenes wird hauptsächlich durch Rohmilchprodukte, Rohwürste, geräucherten Fisch und vakuumverpackte verzehrfertige Produkte übertragen (1, 136). Im Gegensatz zu vielen anderen pathogenen Bakterien kann sich *L. monocytogenes* auch unter Bedingungen vermehren, die für die Lagerung und Konservierung von Nahrungs- und Futtermitteln verwendet werden. Sie machen sich hohe Salzkonzentrationen, niedrige Temperaturen, extreme pH-Bereiche, ein reduziertes Sauerstoffangebot zu Nutze, und stellen somit ein großes Problem für die Nahrungsmittelindustrie dar (18, 86, 194).

Kurz gereifte Rohwürste, wie Tee- oder Mettwurst, sind bis zu 20 % mit Listerien kontaminiert. Am Institut für Hygiene und Toxikologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Karlsruhe wurden 287 Kochwürste (Schinkenwurst, Mortadella, Lyoner, Gelbwurst, Bierwurst, Weißwurst) untersucht und 10,5 % der Proben positiv auf *L. monocytogenes* getestet (2). Bei 45 aus insgesamt 924 Proben verzehrfertiger Produkte (*ready-to-eat food*) aus Supermärkten in Wien wiesen Wagner *et al.* (196) *L. monocytogenes* nach. Den größten Anteil der mit *L. monocytogenes* kontaminierten Produkte waren mit 19,4 % in der Sparte Fisch und Meeresfrüchte zu finden, gefolgt von 6,3 % bei Rohwurstprodukten,

5,5 % bei Weichkäseprodukten und 4,5 % bei gegarten Fleischerzeugnissen/Pasteten (196).

Doch für fast die Hälfte aller bisher aufgetretenen Listeriose-Ausbrüche in Europa waren Milchprodukte verantwortlich (2). Bei Milchprodukten bietet vor allem Käse, insbesondere Weichkäse oder halbfeste Schnittkäse, durch ihren hohen Wassergehalt gute Wachstumsbedingungen für Listerien (108). Im Vergleich zu anderen Käsesorten ist vor allem auf Rotschmierekäse ein erhöhtes Listerienvorkommen nachzuweisen (184). Im November 2006 warnte das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein vor einer Charge des „Harzinger Olmützer Quargel“, der mit *L. monocytogenes* kontaminiert war (195). Bei einem Ende 2009 / Anfang 2010 aufgetretenen Listerioseausbruch in Deutschland und Österreich erkrankten durch den Verzehr von kontaminierten Harzer Käse 29 Personen, von denen acht Patienten starben (1).

Neben dem Personal, den Arbeitsgeräten und Utensilien in den Produktionsstätten, dienen unzureichend gereinigte schwer zugängliche Stellen und auch Bodenabläufe als Reservoir für *L. monocytogenes* (92, 185, 201). Darüber hinaus bietet besonders das sogenannte „Alt-Jung-Schmier“, ein traditionelles Herstellungsverfahren, bei dem die Schmiere älterer Käse abgewaschen und zur Inokulation junger Käse verwendet wird, eine Plattform für *L. monocytogenes* Kontaminationen (120).

1.2 Lebensmittelkonservierung

Ursachen für die unterschiedliche Anzahl von Listeriosefällen in den letzten Jahren lassen sich nicht eindeutig erkennen; es gibt weder Hinweise auf eine demographische Veränderung, noch eine Verhaltensänderung der Verbraucher (10). Anzuerkennen ist das Bewusstsein der Politik dem entgegenzuwirken. Doch leider scheitert es an den weitreichenden Auswirkungen z.B. auf die Verarbeitung, den Vertrieb oder die Herstellung der Lebensmittel, die die Änderungen in der Regierungspolitik nach sich ziehen (34), wie das folgende Beispiel zeigt. Die französische Behörde für Lebensmittelsicherheit (AFSSA, *Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments*) schlug aufgrund einer hohen Anzahl mit Bluthochdruck verbundener Erkrankungen im Jahr 2002 eine Senkung des durchschnittlichen Salzverbrauchs um 20 % vor, verteilt über einen Zeitraum von fünf Jahren (84). Dies wurde von der Lebensmittelindustrie bei einigen Produkten umgesetzt, doch

speziell in der Sparte des *ready-to-eat food*, insbesondere bei den Fleisch- und Fischprodukten, ist ein wesentlicher Anteil mit *L. monocytogenes* kontaminiert (83). Es wird deutlich, dass der Nutzen und die Notwendigkeit Natriumsalze zur Konservierung zu verwenden, differieren. Einerseits sollen durch geringe Salzmengen die Bluthochdruckerkrankungen sinken, andererseits ist eine bestimmte Salzmenge notwendig, um das Wachstum von z.B. *Clostridium botulinum* in verarbeitetem Fleisch und Käse oder das Wachstum von *L. monocytogenes* und Milchsäurebakterien in verzehrfertigen Fleischprodukten zu verhindern (182).

Die zunehmend wachsenden Ansprüche der Verbraucher auf minimal prozessierte, verzehrfertige, nährstoff-, vitaminreiche und „natürliche“ Lebensmittel stellen die Lebensmittelindustrie vor eine große Herausforderung (45, 72). Die biologische Lebensmittelkonservierung könnte eine Alternative bieten, um diesen Ansprüchen gerecht zu werden. Bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel werden seit Jahrhunderten Milchsäurebakterien verwendet. Doch auch bei nicht-fermentierten Lebensmitteln, wie z.B. vakuumverpackten Fleischprodukten, sind sie durch ihre positiven Eigenschaften von Nutzen (175). Milchsäurebakterien tragen maßgeblich zum Geschmack, zur Konsistenz und oftmals zum Nährwert der Lebensmittel bei (134). Daneben produziert eine Vielzahl von Milchsäurebakterien verschiedenste antimikrobielle Substanzen, wie organische Säuren, Diacetyl, Acetoin, Wasserstoffperoxid, sowie ein breites Spektrum an Bakteriozinen (45, 72). Dies sind antimikrobielle Peptide oder Proteine bakteriellen Ursprungs, die in drei bis fünf Kategorien unterteilt werden. Klaenhammer (107) unterteilte die Bakteriozine 1993 in fünf Kategorien, doch über zehn Jahre später reduzierten Drider *et al.* (61) bzw. Cotter *et al.* (49) die Bakteriozine auf letztlich drei Kategorien (Tab. 1).

Der Einsatz von Bakteriozinen könnte bei der Lebensmittelkonservierung helfen den chemischen Anteil und die Hitze einwirkung zu minimieren, um ein Lebensmittel herzustellen, welches reicher an Nährstoffen und sensorischen Eigenschaften ist (72). Eine Möglichkeit ist das Zufügen von *ex situ* produzierten Bakteriozinpräparaten (72). Diese können in Form eines unbearbeiteten Konzentrats, das z.B. an ein Trägermaterial gebunden ist, appliziert werden, so wie im Falle des von *L. curvatus* 32Y produzierten Bakteriozins. Dieses wird an Polyethylenfolie gebunden und reduziert während der Lagerung des Produkts in der Verpackung die Lebendkeimzahl von *L. monocytogenes* (132). Die *ex situ* Bakteriozine werden dem Lebensmittel entweder bei der Herstellung zugesetzt oder auf dessen Oberfläche

Tabelle 1. Einteilung der Bakteriozine nach Cotter et al. (49)

Klassifikation	Eigenschaften	Beispiele
Klasse I Lantibiotika	Einzel- und Dipeptid-Lantibiotika; enthalten Lanthionin oder β -Lanthionin	<u>Einzelpeptid:</u> Nisin, Lacticin 481 <u>Dipeptid:</u> Lacticin 3147, Cytolysin
Klasse II Nicht-Lantibiotika	heterogene Klasse von unmodifizierten, hitzestabilen Peptiden (< 10kDa) IIa) Pediocin-ähnliche Peptide IIb) Dipeptide IIc) zyklische Peptide II d) lineare nicht-Pediocin Peptide	Pediocin PA-1, Leucocin Lactacin F Enterocin AS-48, Reuterin 6 Lactococcin A, Divergicin A
Klasse III Bakteriolysine	große, hitzelabile Proteine	Lysostaphin, Enterolysin A

aufgetragen, was aufgrund der geringen Bakteriozinmenge kostengünstiger ist (72). Bisher ist Nisin das einzige Bakteriozin, das als Nahrungskonservierungsmittel (E234) zugelassen ist (175). Die unbearbeiteten Konzentrate bzw. *ex situ* Bakteriozine, wie z.B. das von *Pediococcus acidilactici* produzierte Pediocin PA-1, vertrieben unter dem Namen ALTA™ 2431 (175), werden rechtlich als Zusatzstoffe gesehen, da sie den Proteingehalt erhöhen oder zur Eindickung des Lebensmittel führen und somit Veränderungen hervorrufen können (72). Der Einsatz Bakteriozin-produzierender Bakterienstämme bietet die Möglichkeit die Bakteriozine *in situ* zu produzieren (72). Aufgrund des GRAS (*generally recognized as safe*)-Status der Milchsäurebakterien können diese ohne große Hindernisse als Starter-, Ergänzungs- oder Schutzkulturen verwendet werden (17, 45).

Zahlreiche in der Literatur beschriebene Studien befassen sich weiterhin mit dem Screening nach antibakteriellen bzw. antimikrobiellen Organismen, worauf im folgenden Kapitel eingegangen wird.

1.3 Reifungsorganismen und ihr antibakterielles bzw. antilisterielles Potential

Trotz der immer wieder auftretenden Listeriosefälle, ausgelöst durch kontaminierten Käse und insbesondere Rotschmierekäse, liefert die komplexe Käseflora dennoch regelmäßig antibakteriell bzw. antilisteriell wirkende Organismen und Kon-

sortien (24, 167). Hefen, Coryneforme, Staphylokokken und Mikrokokken bestimmen die Oberflächenflora von Rotschmierkäse (25, 105), die jedoch stark von der spezifischen Hausflora der Produktionsstätte abhängt (25, 138).

Bakterien

Den größten Teil der bakteriellen Oberflächenflora bilden die coryneformen Bakterien *Corynebacterium variabile*, *Corynebacterium casei*, *Brevibacterium linens*, *Arthrobacter nicotianae* und *Microbacterium gubbeenense* (31, 33, 126). Die Oberflächenflora ist maßgeblich für das Aussehen, Aroma und die Textur des Käses verantwortlich (105, 160). Daneben weisen viele Coryneforme inhibitorische Eigenschaften aus, die sinnvoll eingesetzt werden können.

In einer Studie von Valdés-Stauber *et al.* (189) konnte bei 23 Stämmen der Spezies *B. linens*, *A. nicotianae* und *A. nucleogenes* eine antilisterielle Aktivität festgestellt werden. Die beiden Stämme M18 und OC2 der Spezies *B. linens* produzierten zwar beide ein Bakteriozin, doch der Unterschied zwischen den beiden Substanzen war nicht unwesentlich. Während das 31 kDa große Linocin M18 hitzelabil ist (190), blieb das 1,2 kDa große Linenscin OC2 nach einer Erhitzung bei 100°C weiterhin aktiv (124). Dies zeigt erneut die Diversität der produzierten Bakteriozine, die auch innerhalb einer Spezies auftritt. Der Einsatz des *B. linens*-Stammes M18 bei Käsureifungen reduzierte die Listerienzellzahl lediglich um ein bis zwei Zehnerpotenzen, wogegen die Listerien bei Käsureifung mit einem undefinierten Konsortium vollständig inhibiert wurden (66). In einer weiteren Studie gelang es bei Einsatz des Pediocin AcH-Produzenten *Lactobacillus plantarum* WHE 92 das Wachstum von *L. monocytogenes* bis zum Ende der Reifungszeit (21 Tage) in den meisten Fällen zu inhibieren, wogegen auf der Oberfläche der Kontrollkäse ca. 10^4 Listerien pro Gramm detektiert wurden (65). Dieses Ergebnis wurde nur erzielt, wenn *L. plantarum* WHE 92 gleich zu Beginn der Reifung, eine Woche vor der Applikation von *L. monocytogenes*, auf die Käsoberfläche aufgetragen worden ist. Der Pediocin AcH-Produzent hatte demnach ausreichend Zeit anzuwachsen und ausreichende Mengen des Bakteriozins zu produzieren. Auch Carnio *et al.* (36), die das antilisterielle Potential der Konsortien 19 verschiedener französischer Schmierkäse untersuchten, konnten bei Vertretern der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* und *Microbacterium* eine antilisterielle Aktivität feststellen.

Trotz der großen Anzahl an Bakteriozin-produzierenden Bakterienstämmen ist eine Kontamination mit *L. monocytogenes* nicht immer zu vermeiden. Wenn bereits zu Beginn der Käseproduktion bzw. des Reifungsprozesses eine Kontamination mit *L. monocytogenes* vorliegt, bieten die Bakteriozin-produzierenden Bakterien keinen vollständigen Schutz mehr.

Hier könnten Staphylokokken nützlich sein, da sie ebenfalls zur mikrobiellen Oberflächenflora geschmierter Käse gehören (26, 139). Aufgrund ihrer Säure- und Salztoleranz wachsen sie zusammen mit den Hefen in der frühen Reifungsphase und fördern das Wachstum der Reifungsbakterien (27). Die wichtigsten Vertreter in der Käseflora sind die Spezies *St. equorum*, *St. saprophyticus*, *St. caseolyticus* und *St. xylosus*, wobei *St. equorum* die dominanteste Spezies ist (31). Von letzt genannter Spezies isolierte Carnio *et al.* (37) den antibakteriell bzw. antilisteriell wirksamen Stamm *St. equorum* WS 2733 aus französischem Raclettekäse.

St. equorum WS 2733 produziert das makrozyklische Peptidantibiotikum Micrococcin P₁. Die Substanz war gegen alle 95 getesteten *Listeria*-Stämme und gegen weitere 130 der 135 getesteten gram-positiven Bakterien wirksam. Unter den sensitiven Bakterien befanden sich jedoch auch Gattungen der Coryneformen, wie z.B. *Arthrobacter*, *Brevibacterium* und einige andere Reifungsbakterien. Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums durch Inhibierung der Proteinbiosynthese (38, 51) ist vom Einsatz von *St. equorum* WS 2733 als Reifungs- bzw. Schutzkultur abzuraten. Inwieweit der Stamm *St. equorum* WS 4524 eine bereits bekannte Substanz oder ebenfalls das Micrococcin produziert, war Bestandteil dieser Arbeit.

Hefen

Hefen sind neben den Bakterien ein wichtiger Bestandteil der Flora oberflächenge-reifter Käse. Zu den auftretenden Spezies gehören *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* (31) sowie die Spezies *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens*, aber auch *Candida* sp. und *Yarrowia lipolytica* (25, 47, 191), abhängig von der Art und Herkunft des Käses.

Die salzresistente Spezies *D. hansenii* siedelt sich häufig auf der Lake der Salz-bäder an. Stämme die weder Lactose noch Glucose vergären werden bevorzugt eingesetzt (105). *G. candidum* trägt durch seine Aminopeptidase-Aktivität zur Aromabildung bei. Die Spezies spielt eine wesentliche Rolle bei der Interaktion zwischen Pilzen und Käsen. Duale Kulturen unter Einbeziehung von *G. candidum*

hemmen die Bildung von Mykotoxinen, die durch Kontaminationen gebildet werden können (105). Die Gattung *Pichia* ist nicht nur auf geschmierten und nichtgeschmierten Käsen zu finden (47, 112, 158); sie wird auch in Afrika, Lateinamerika und Asien zur Fermentierung traditioneller Produkte verwendet (147). Die Spezies *P. norvegensis* wurde neben Wassermelonenscheiben (53) auch aus fermentierten Milchprodukten (163) oder zusammen mit Milchsäurebakterien aus Sauerteig (77) isoliert.

Hefen dominieren zusammen mit den Staphylokokken die frühen Reifungsstadien. Durch das Metabolisieren des Lactats, das zu einer Entsäuerung der Käseoberfläche (~pH 5 auf >pH 6,5) führt, und durch Produktion wachstumsfördernder Komponenten (28, 31), bilden die Hefen die Voraussetzungen für ein schnelles Anwachsen der Reifungsbakterien. Es wäre daher nahe liegend antilisteriell wirkende Hefen als Reifungsorganismus einzusetzen, um einer Kontamination mit *L. monocytogenes* im Entstehen entgegenzuwirken.

Die antimikrobielle Wirkung von Hefen ist ein bekanntes Phänomen. Bereits 1963 berichteten Bevan und Makower von einer von *Saccharomyces cerevisiae* sekretierten Substanz, die gegen Stämme der gleichen Spezies lethal wirksam ist (20). Hefen können Exotoxine (hauptsächlich Proteine oder Glykoproteine) sezernieren, die als Killertoxine bekannt sind (123). Killertoxin-Produzenten sind in den Spezies *S. cerevisiae*, *K. lactis*, und auch in der Gattung *Pichia*, z.B. *P. mraki* und *P. lynferdii* und weiteren Spezies zu finden (123, 156). Killertoxine wird eine Hefenspezifische Wirkung gegen die gleiche oder nahverwandte Hefenspezies nachgesagt, wogegen die „Killer-Hefen“ gegen ihr eigenes Toxin immun sind (123, 129). Polonelli *et al.* (153) haben zudem eine inhibitorische Wirkung gegen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und sechs weitere Bakterienspezies nachweisen können.

Über antibakteriell und antilisteriell wirkende Hefen im speziellen ist bisher sehr wenig bekannt. Bilinski *et al.* (21) z.B. fanden unter 400 Isolaten lediglich zwei Spezies, *Kluyveromyces thermotolerans* und *Kloeckera apiculata*, die gegen *Lactobacillus plantarum* und *Bacillus megaterium* inhibierend wirkten. Zwei Hefeisolate mit einer schwachen antilisteriellen Aktivität wurden von Zhao *et al.* (201) aus Biofilmen isoliert; sie wurden in Bodenabläufen lebensmittelverarbeitender Betriebe gefunden. Weitaus mehr Erfolg hatten Goerges *et al.* (79), die unter 304

Schmierkäseisolaten insgesamt 14 Stämme mit einer inhibitorischen Wirkung gegen *L. monocytogenes* fanden. Ein *Candida intermedia*-Stamm war in der Lage das Listerienwachstum um vier Zehnerpotenzen zu inhibieren, drei weitere *C. intermedia*-Stämme und ein *K. marxianus*-Stamm um drei Zehnerpotenzen. Sie übertrafen die Hemmleistung der Hefenisolate aus der Studie von Zhao *et al.* um fast das Sechsfache.

Aus Lebensmitteln können durchaus potentielle antilisteriell wirksame Isolate gefunden werden, die als Reifungskultur bei der Käseproduktion eingesetzt werden könnten. Ein Vertreter der am häufigsten vorkommenden Spezies auf Rotschmierkäse wäre ideal. In der Tat wurden in einer weiteren Studien von Goerges *et al.* (80) u.a. 77 *D. hansenii*-Stämme auf ihr antilisterielles Potential getestet, wovon die meisten eine eher schwache inhibitorische Aktivität aufwiesen. Lediglich ein *D. hansenii*-Stamm war in der Lage *L. monocytogenes* um drei Zehnerpotenzen zu inhibieren. Bei einem aus Käse (Pont l'Évêque) isolierten *G. candidum*-Stamm stellten Dieuleveux *et al.* (57) ebenfalls eine antilisterielle Aktivität fest. Die für die inhibitorische Wirkung verantwortlichen Substanzen wurden als D-3-Phenyllactat und D-3-Indollactat identifiziert (58). Auch bei dem vielversprechenden *Pichia norvegensis*-Stamm WSYC 592 in dieser Arbeit wäre es von großer Bedeutung, die antilisteriell wirksame(n) Substanz(en) zu charakterisieren, um den Einsatz in der Lebensmittelproduktion zu ermöglichen.

1.4 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des FEI-Projektes AiF 14786 N „Entwicklung einer antilisteriellen, frühen Oberflächenreifungskultur für geschmierte Käse“ angefertigt. Im Fokus dieser Arbeit stand die Charakterisierung der antilisteriellen Wirkmechanismen von *Pichia norvegensis* WSYC 592 und *Staphylococcus equorum* WS 4524, die unter Laborbedingungen eine stabile und signifikante Hemmwirkung gegen *Listeria monocytogenes* aufwiesen.

Mit Hilfe der Cokultivierungsmethode und diverser Modifizierungen auf Fest- und in Flüssigmedium sollte die Hemmwirkung bzw. das Hemmprinzip von *P. norvegensis* WSYC 592 und die Einflussnahme auf die Hemmwirkung untersucht werden. Die Sekretomanalyse des Hefestammes *P. norvegensis* WSYC 592 mittels 2D-Gelelektrophorese sollte Unterschiede bei der Kultivierung mit verschiedenen Kohlenstoffquellen aufzeigen, um eventuelle Hinweise auf eine Abhängigkeit der

Hemmwirkung von Medienbestandteilen zu bekommen. Durch „Co“kultivierung der Hefen und Listerien in getrennten Kompartimenten und durch Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen konnte der Hypothese eines auf Zell-Zell-Kontakt beruhenden Hemmmechanismus nachgegangen werden.

Molekularbiologische Methoden sollten Gewissheit über die Identifizierung des *St. equorum*-Stammes WS 4524 und einen Nachweis für eine vorhandene Peptid-synthetase geben. Die produzierte Substanz sollte mittels biochemischer und chromatographischer Methoden auf ihre Eigenschaften untersucht werden. Es galt zu klären, ob es sich bei der von *St. equorum* WS 4524 produzierten Substanz um eine bereits bekannte Substanz handeln könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Stammhaltung und -lagerung

Die verwendeten Hefeisolate (Tab. 2) wurden auf *Yeast-Glucose-Chloramphenicol* (YGC)-Agar (Merck) angezüchtet, dem 10 mg/L Bromphenolblau (Roth) zugesetzt worden sind (YGCB-Agar) (174). Durch die unterschiedlich starke Fähigkeit der Hefezellen den Farbstoff aufzunehmen, wird durch unterschiedliche Färbung der Einzelkolonien das Erkennen von Mischkulturen erleichtert. Frisch überimpfte Kulturen auf Festmedium wurden für drei bis vier Tage bei 27°C kultiviert.

Die Listerienstämme aus der Weihenstephan *Listeria* Collection (WSLC), sowie die Staphylokokken aus der Weihenstephan Strain Collection (WS) (Tab. 2) wurden auf *Brain-Heart-Infusion* (BHI)-Agar (BHI-Bouillon (Merck) mit zusätzlich 15 g/L Agar) bzw. *Trypticase-Soy-Glucose* (TSG)-Agar (CASO-Agar (Roth) mit zusätzlich 0,1 % D(+)-Glucose-Monohydrat (Fluka)) für ein bis zwei Tage bei 30°C kultiviert.

Reaktivierung von Stämmen aus der Gefriertrocknung

Zur Reaktivierung der lyophilisierten Hefestämme erfolgte die Resuspension des Pellets in 1 mL *Yeast-Glucose* (YG)-Bouillon (5 g/L Hefeextrakt (Oxoid), 20 g/L D(+)-Glucose (Fluka), pH 6,6), die Reaktivierung der Bakterienstämme in BHI-Bouillon. Aus der Suspension wurde mit einer sterilen Impföse Material entnommen und ein Drei-Quadranten-Ausstrich angefertigt. Mit 0,5 mL der Suspension wurden weitere 4 mL Bouillon angeimpft und der Rest der Suspension auf eine Nähragarplatte gegeben. Die anschließende Kultivierung der Agarplatten erfolgte für zwei Tage bei 27°C (Hefen) bzw. 30°C (Bakterien), die Kultivierung der Reagenzröhrchen auf einem Schüttler (CERTOMAT® S, B. Braun Biotech Int., Sartorius group) bei 180 U/min. Nach Anwachsen der Kulturen erfolgte ausgehend vom Drei-Quadranten-Ausstrich eine weitere Passage auf YGCB- bzw. BHI-Agar zur Förderung der Stoffwechselaktivität.

Reaktivierung von Stämmen aus Glyzerinstocks

Zur Reaktivierung der Organismen aus Glyzerinstocks wurde mit einer Stahlöse Zellmaterial entnommen und auf einer Nähragarplatte ein Drei-Quadranten-Ausstrich angefertigt. Die Agarplatten wurden für zwei bis drei Tage bei entspre-

Tabelle 2. Verwendete Organismen. CBS: Centralbureau voor Schimmelcultures, Niederlande. WS: Weihenstephan Strain Collection; WSLC: Weihenstephan *Listeria* Collection; WSYC: Weihenstephan Yeast Collection, ZIEL, Abteilung Mikrobiologie, Weihenstephan, Freising, Deutschland.

Spezies	Stamm	Isolationsquelle
Hefen		
<i>Issatchenkia orientalis</i>	WSYC 555	?
	WSYC 557	?
	WSYC 558	?
	WSYC 559	Salzbad
	WSYC 776	Harzer Käse
<i>Pichia cactophila</i>	WSYC 364 (CBS 620)	ranzige Butter
<i>Pichia kluyveri</i>	WSYC 775	?
<i>Pichia nakasei</i>	WSYC 731	Harzer Käse
<i>Pichia norvegensis</i>	WSYC 338 (CBS 6564)	klinisches Isolat
	WSYC 592 ^a	Frischkäse
	WSYC 773	?
<i>Pichia</i> sp.	WSYC 623	Tilsiter
<i>Pichia pseudocactophila</i>	WSYC 366	<i>Pachycereus pectin-arboriginum</i> , Mexico
Bakterien		
Listerien		
<i>Listeria monocytogenes</i>	WSLC 1364 (Serovar 4b)	Käse
	EGD-e (Serovar 1/2a)	(76)
	EGD-e Δ pts ^{Man} , Δ lmo0027 ^b	(178)
<i>Listeria innocua</i>	WSLC 2339	Käse
	WSLC 2394	?
<i>Listeria ivanovii</i>	WSLC 3061	?
	WSLC 3899	Schmierwasser
<i>Listeria seeligeri</i>	WSLC 4550	Käse
	WSLC 41132	Lachs
Staphylokokken		
<i>Staphylococcus aureus</i>	WS 2609	Abszess am Bein
	WS 2612	Huhn
<i>Staphylococcus equorum</i>	WS 2733	franz. Raclette-Käse
	WSGMO 2733 mic ⁻	
	WS 4522 ^a	
	WS 4523 ^a	
	WS 4524 ^a	
	WS 4525 ^a	
	WS 4526 ^a	
WS 4554 ^a		

^a Die Stämme wurden vom Max Rubner-Institut, Abteilung für Mikrobiologie und Biotechnologie, Kiel zur Verfügung gestellt

^b Der Stamm wurde vom Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg zur Verfügung gestellt

chender Temperatur (siehe oben) kultiviert. Nach ausreichendem Wachstum erfolgte ein weiteres Passagieren zur Förderung der Stoffwechselaktivität.

Konservierung von Stämmen

Von allen verwendeten Stämmen wurden zur langfristigen Konservierung Glycerinstocks angefertigt. Hierzu wurde ausreichend Zellmaterial von einem frischen Reinigungsausstrich in 5 mL Glycerinlösung (10 g/L Na-Glutamat, 16 g/L Lactose · H₂O, 1 g/L Agar, 0,1 g/L Ascorbinsäure, 120 g/L Glycerin) überführt und suspendiert. Anschließend wurden je zwei Cyro-Röhrchen (2 mL PP-Röhrchen, Greiner) mit ca. 2 mL befüllt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt, bevor sie dauerhaft bei -80°C gelagert wurden. Die Lagerung vor dem Einfrieren ermöglicht es den Organismen Glycerin, protektive Substanzen und Vitamine aufnehmen zu können.

2.2 Untersuchung der antilisteriellen Aktivität ausgewählter Hefenisolate

2.2.1 Kultivierung der Organismen

Hefen

Eine gehäufte Impföse (2 mm Durchmesser) Zellmaterial einer drei bis vier Tage alten Kultur auf YGCB-Agar wurde zum Anlegen einer Vorkultur in 5 mL YG-Bouillon suspendiert und bei 27°C für 24 h auf einem Schüttler (CERTOMAT[®] S, B. Braun Biotech Int., Sartorius group) bei 180 U/min inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 50 µL dieser Vorkultur in 5 mL YG-Bouillon überführt und unter identischen Bedingungen inkubiert.

Listerien

Zum Anlegen einer Übernachtskultur wurden 5 mL BHI-Bouillon mit einer am Vortag auf BHI-Agar überimpften Listerienkultur angeimpft, bei 30°C und 180 U/min für 17 h auf einem Schüttler inkubiert.

2.2.2 Präzipitation des Hefen-Exopolysaccharids (EPS)

Die Hauptkulturen (50 mL) der in YG⁺-B (YG-Bouillon mit 10 g/L Trypton (Oxoid), pH 6,6) gewachsenen Hefenstämmen WSYC 592 und WSYC 623 wurden für 10 min bei 6.500 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde mit drei Volumen 95 % eiskaltem Ethanol versetzt und über Nacht bei 4°C gelagert. Das ausgefallene EPS wurde für 10 min bei 10.000 x g abzentrifugiert, mit 70 % eiskal-

tem Ethanol gewaschen und bei 55°C getrocknet, bevor es in MilliQ-Wasser resuspendiert worden ist (98, 117).

2.2.3 Soft-Agar-Assays

Das Vorhandensein einer diffundierbaren, antilisteriell wirksamen Substanz konnte mit unterschiedlichen Soft-Agar-Diffusions-Assays (Agar-Well-Diffusion(AWD)-Assay, Agar-Membran-Assay und Agar-Spot-Assay) (16, 29, 79, 177, 181) überprüft werden, die bei der Untersuchung einer antibakteriellen Aktivität von Bakteriozinen Verwendung finden.

In den Diffusionsversuchen wurden 10^7 bzw. 10^8 Listerienzellen in 10 mL aufgeschmolzenen, auf ca. 50°C abgekühlten YG⁺-Soft-Agar (YG⁺-Bouillon mit 0,4 % bzw. 0,8 % (w/v) Agar) gemischt und in eine leere Petrischale gegossen. Nach dem Erstarren wurden für den AWD-Assay Löcher mit einem Durchmesser von 5 mm in den Soft-Agar gestanzt. Für den Agar-Membran-Assay wurden auf die erstarrte Soft-Agaroberfläche nicht-autoklavierte Nitrocellulosemembran-Stücke (1,5 x 1,5 cm) (Protran[®], Schleicher & Schuell Biosciences GmbH) aufgelegt und je 5 µL Probe auf die Membran getropft. Beim Agar-Spot-Assay wurden direkt auf die fest gewordene Soft-Agaroberfläche je 20 µL der Probe aufgetropft bzw. beim AWD je 20 µL in die zuvor gestanzten Löcher hinein pipettiert. Nach Kultivierung der Agarplatten bei 27°C bzw. 30°C für 24 h wurden vorhandene Hemmzonen unter Verwendung von Schräglicht visuell sichtbar gemacht. Die Aufkonzentrierung der Hefenüberstände um den Faktor 25 bis 30, geschah mit Hilfe von Zentrifugationsfiltereinheiten (Amicon Ultra-15, Millipore) mit 5 kDa nomineller Molekulargewichtsgrenze. Als Positivkontrolle diente Pediocin AcH, ein von *Lactobacillus plantarum* ALC 01 produziertes Bakteriozin (120).

2.2.4 Killertoxin-Assay

Der Assay wurde gemäß Provost *et al.* (156) mit wenigen Modifikationen durchgeführt. YG⁺-Soft-Agar (0,4 % bzw. 0,8 % (w/v)) wurde wie oben mit einem Aliquot einer Listerien-ÜNK inokuliert. Eine Impföse voll Zellmaterial einer zwei Tage alten, auf YGCB-Agar kultivierten Hefekultur wurde auf die erstarrte Oberfläche in Form einer Linie aufgetragen. Nach Inkubation der Agarplatte bei 27°C für zwei Tage konnten vorhandene Hemmzonen im Schräglicht visuell sichtbar gemacht werden.

Zu den sieben Listerienstämmen (WSLC 1364, 2339, 2394, 3061, 3899, 4550, 41132) wurden zusätzlich sieben Hefestämme (WSYC 338, 364, 366, 623, 731, 773, 775) auf ihre Sensitivität gegenüber dem Stamm *P. norvegensis* WSYC 592 getestet. Zellmaterial des Hefe-Teststammes wurde mit einer Impföse in Form einer Linie auf eine YGCBA-Platte aufgetragen, auf deren Oberfläche bereits Zellmaterial des Hefe-Indikatorstammes mit einem sterilen Tupfer gleichmäßig verteilt worden ist. Das Zellmaterial stammte von zwei Tage alten, auf YGCBA bebrüteten Kulturen. Die angefertigten Testplatten wurden über einen Zeitraum von bis zu sieben Tagen bei 27°C kultiviert und täglich mit Hilfe von Schräglicht visuell ausgewertet.

2.2.5 Cokultivierung der Hefen mit *L. monocytogenes* WSLC 1364 auf Festmedium

Die eingesetzten Zellzahlen im Cokultivierungs-Assay lagen bei 10^5 - 10^6 Hefezellen/cm² und ca. 6 Listerienzellen/cm², was einer realistischen Kontaminationsrate auf einer Käseoberfläche entspricht (168, 169). Im weiteren Verlauf wurde der Titer von *L. monocytogenes* WSLC 1364 auf 10^5 KbE/cm² gesteigert, der ungefähr den maximalen, von *P. norvegensis* WSYC 592 hemmbaren Listerientiter darstellt. Die Zelldichte der Listerien-Übernachtskultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Ein OD-Wert von ~ 0,4 entsprach einer Zellzahl von $\sim 4 \times 10^8$ KbE/mL. Die Listerienkultur wurde mittels einer fortlaufenden Verdünnungsreihe auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

Ein Aliquot von 300 µL der Hefen-Hauptkultur wurde pelletiert (2.500 x g, 5 min, RT), in 100 µL ¼ starker Ringerlösung (Merck) resuspendiert und 100 µL der gewünschten Listerienverdünnung hinzugegeben. Das Hefen-Listerien-Gemisch wurde vollständig auf eine YG⁺-Agarplatte (YG⁺-Bouillon mit 15 g/L Agar) aufgetragen. Parallel zu den Cokultivierungsansätzen erfolgte die Anfertigung eines Kontrollansatzes zur Beurteilung des Listerienwachstums in Abwesenheit der Hefen. Hierzu wurden 100 µL der verwendeten Listerienverdünnung mit der gleichen Menge an ¼-Ringerlösung vermischt und auf YG⁺A ausplattiert. Die Kultivierung der Cokultivierungs- und Kontrollansätze fand für 24 h bei 27°C statt.

Die eingesetzten Hefen- und Listerienkeimzahlen wurden zur Beurteilung der genauen Höhe der Listerienhemmung und des Hefenwachstums mitbestimmt. Hierzu wurde die bereits bestehende Verdünnungsreihe der Listerien verwendet und zu-

sätzlich eine fortlaufende Verdünnungsreihe der aufkonzentrierten Hefen angefertigt. Entsprechende Verdünnungsstufen wurden auf YG⁺A ausplattiert und für zwei Tage bei 27°C kultiviert.

Nach Bebrüten der Cokultivierungsplatten und der Kontrollansätze konnten mit Hilfe von 15 mL Zentrifugenröhrchen (Greiner) jeweils zwei Agarplättchen mit einer Gesamtfläche von 3,53 cm² ausgestochen werden. Diese wurden mit dem Zellrasen nach unten in ein 100 mL Erlenmeyerkolben mit 2 mL vorgelegter ¼-Ringerlösung überführt und für 30 min bei 130 U/min und RT auf einem Schüttler (CERTOMAT[®] S, B. Braun Biotech Int., Sartorius group) geschwenkt. Die abgewaschenen Zellen wurden in ein steriles Reagenzröhrchen überführt und Suspensionsrückstände mit einem weiteren Milliliter ¼-Ringerlösung nachgespült. Nach Erstellen der fortlaufenden Verdünnungsreihen wurden die gewünschten Verdünnungsstufen auf YGCB-Agar bzw. Oxford-Agar mit Cycloheximid (Sifin) ausplattiert und für zwei Tage bei 27°C kultiviert. In einigen Fällen wurde parallel zur Zellzahlbestimmung der pH-Wert der Cokultivierungsansätze mit einer Oberflächen-pH-Elektrode (Mettler Toledo) gemessen.

2.2.6 Cokultivierung der Hefen-Hauptkultur mit *L. monocytogenes* unter Einflusnahme unterschiedlicher Zusätze

Cokultivierung mit einer Hefe-Flüssigkultur

Der Indikatorstamm *L. monocytogenes* WSLC 1364 (~10⁵ KbE/mL) wurde direkt zu 5 mL einer Hefe-Hauptkultur (10⁸-10⁹ KbE/mL) je einer der beiden Stämme WSYC 592 und WSYC 623 zugegeben, weiterhin bei 27°C und 180 U/min kultiviert und nach 0 h, 2 h, 6 h und 24 h die Zellzahlen bestimmt.

Gewinnung des Hefenüberstandes

Zur Gewinnung des Hefenüberstandes wurde eine Hefekultur (5 mL) in ihrer stationären Wachstumsphase zwei Mal abzentrifugiert (2.500 x g, 10 min, 4°C), wobei der Überstand stets in ein neues Gefäß umgefüllt worden ist. Auf diese Weise konnte der Überstand weitestgehend von den Hefezellen abgetrennt werden. Beim Sterilfiltrieren der Kultur bestand die Möglichkeit, dass die gesuchte Substanz im Filtermaterial hängen bleibt. Der zweifach abzentrifugierte Kulturüberstand wurde mit Listerien (~10³ bzw. 10⁴ KbE/mL) versetzt und für 24 h bei 27°C und 180 U/min kultiviert, bevor die Listerienzellzahl bestimmt worden ist. Um jegli-

chen Einfluss der Hefezellen auszuschließen, wurden die Hefekulturen (5 mL) in einem Parallelversuch abzentrifugiert, sterilfiltriert (0,22 µm, Millex®-GP), mit einem gleich hohen Listerientiter versetzt und kultiviert.

Neben den Überständen der Hefekulturen, wurde auch der Überstand einer Cokultur auf deren antilisterielle Aktivität untersucht. Nach der Cokultivierung einer Hefekultur (5 mL) mit 10^3 KbE/mL des Indikatorstammes WSLC 1364 über 24 h wurde diese wie oben abzentrifugiert, der Überstand sterilfiltriert und unmittelbar für eine Kultivierung über 24 h mit einem gleich hohen Listerientiter verwendet.

Auswirkung von Kohlenstoffquellen und Detergenzien auf die Hemmung

Die Untersuchung der Einflussnahme diverser Kohlenstoffquellen (Tab. 3) (nachfolgend als C-Quellen bezeichnet) auf den antilisteriellen Wirkmechanismus, fand mittels verschiedener Versuchsvariationen statt, die auf der Cokultivierung des *L. monocytogenes*-Indikatorstammes WSLC 1364 mit den Hefe-Flüssigkulturen der Hefen WSYC 592 und WSYC 623 basieren (siehe oben).

Überprüft wurde die Möglichkeit der Hemmung einer zweiten Listeriendosis (10^3 KbE/mL) durch Zugabe einer C-Quelle zu derselben Hefe- bzw. Cokultur. Zusammen mit den Listerien wurde eine sterilfiltrierte Zuckerlösung (2 % (v/v)) zu der 24 h alten Cokultur (kultiviert in YG⁺-Bouillon) hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte weiterhin bei 27°C und 180 U/min für weitere 24 h, nach denen die Zellzahlbestimmung stattfand.

Als Basismedium für die Überprüfung der Verwertbarkeit und der Einflussnahme einiger C-Quellen diente Y⁺-Bouillon (5 g/L Hefeextrakt (Oxoid), 10 g/L Trypton (Oxoid), pH 6,6), zu der sterilfiltrierte Lösungen der C-Quellen (2 % (v/v)) hinzugegeben wurden. In diesem Nährmedium erfolgten die Kultivierung des Listerien-Indikatorstammes und die Kultivierung der Hefen-Vorkultur und -Hauptkultur, mit denen anschließend die Cokultivierung durchgeführt worden ist.

Zur Überprüfung des Einflusses von Na-Lactat auf die Hemmwirkung in Gegenwart von Glucose, wurden die Hefen in YG⁺-Bouillon mit einem festen Glucoseanteil von 1,5 % bzw. 2 % (w/v) angezüchtet, zu dem die gewünschte Menge an Na-Lactat (Konzentrationen zwischen 0,75 % und 4,5 % (v/v)) hinzugefügt worden ist. Nach Zugabe eines Listerientiters von ca. 10^3 KbE/mL, wurde die Cokultur für 24 h bei 27°C und 180 U/min kultiviert. Zellzahlbestimmungen und die Ermittlung der

pH-Werte mit pH-Fix-Stäbchen (Macherey-Nagel) erfolgte in Abständen von wenigen Stunden.

Bei Untersuchung der Detergenzien, wurden die Hefe-Hauptkulturen in YG⁺- statt in YG-Bouillon angezüchtet. Die Zugabe der Listerien und des Detergens (verwendete Endkonzentrationen siehe Tab. 4) zur 24 h alten Hefe-Hauptkultur erfolgten gleichzeitig. Die Angaben zur Kultivierung und den Zeitpunkten der Probenahme sind oben zu entnehmen. Die Strukturformeln der Detergenzien sind in Abbildung 1 dargestellt.

Tabelle 3. Verwendete Kohlenstoffquellen.

Art der Kohlenstoffquelle	Name	Bezugsquelle
Monosaccharide		
Pentosen	D-, L-Arabinose	AppliChem / Roth
Hexosen	D(-)-Fructose	Merck
	D(+)-Glucose	Fluka
	D(+)-Galactose	Merck
	D(+)-Mannose	Sigma
	L(+)-Rhamnose	Merck
Disaccharide		
	Maltose-Monohydrat	Merck
	D(+)-Saccharose	Fluka
Carbonsäuren		
	di-Ammoniumhydrogencitrat	Roth
	Natrium-Lactat	Sigma
	Natrium-Pyruvat	Merck

Tabelle 4. Verwendete Detergenzien und ihre eingesetzten Konzentrationen.

Art des Detergens	Name des Detergens	getestete Endkonzentrationen in % (v/v)
nicht-ionisch	Brij [®] 35 (Sigma)	0,01 / 0,02 / 0,05
	Nonidet P-40 (Sigma)	0,2 / 0,5 / 1
	Triton [®] X-100 (Roth)	0,0125 / 0,0375 / 0,075 / 0,125
	Tween [®] 20 (Sigma)	0,001 / 0,02
zwitterionisch	CHAPS (Roth)	0,5 / 2
	Zwittergent [®] 3-08 (Fluka)	0,5 / 2

Einfluss des Tween® 20 auf Hefen und den Listerien-Indikatorstamm

Eine weitere Abwandlung bei den Cokultivierungsversuchen mit Detergenzien war die separate Anzucht der beiden Hefestämme WSYC 592 und WSYC 623, des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364, oder beider Organismen in Gegenwart von 0,05 % (v/v) Tween® 20 bereits vor der Cokultivierung. Bei den Hefen wurde das Tween® 20 beim Animpfen der Hauptkultur zugegeben und die Zellen nach 24 h drei Mal mit ¼-Ringerlösung gewaschen (2.500 x g, 10 min, 15°C). Das gewaschene Zellpellet wurde im Überstand einer Hefekultur resuspendiert, die in Abwesenheit des Detergens angezüchtet worden ist. So wurden die gleichen Reaktionsbedingungen geschaffen wie bei der Cokultivierung mit der 24 h alten Hefekultur in ihrer stationären Wachstumsphase mit weitestgehend verbrauchten Nährstoffen. Bei den Listerien wurde das Detergens beim Ansetzen der Übernachtskultur zugesetzt und die Zellen 17 h später ebenfalls mit ¼-Ringerlösung drei Mal gewaschen (10.000 x g, 10 min, 15°C). Die anschließende Cokultivierung (siehe oben) fand mit $\sim 10^4$ KbE/mL Listerien statt.

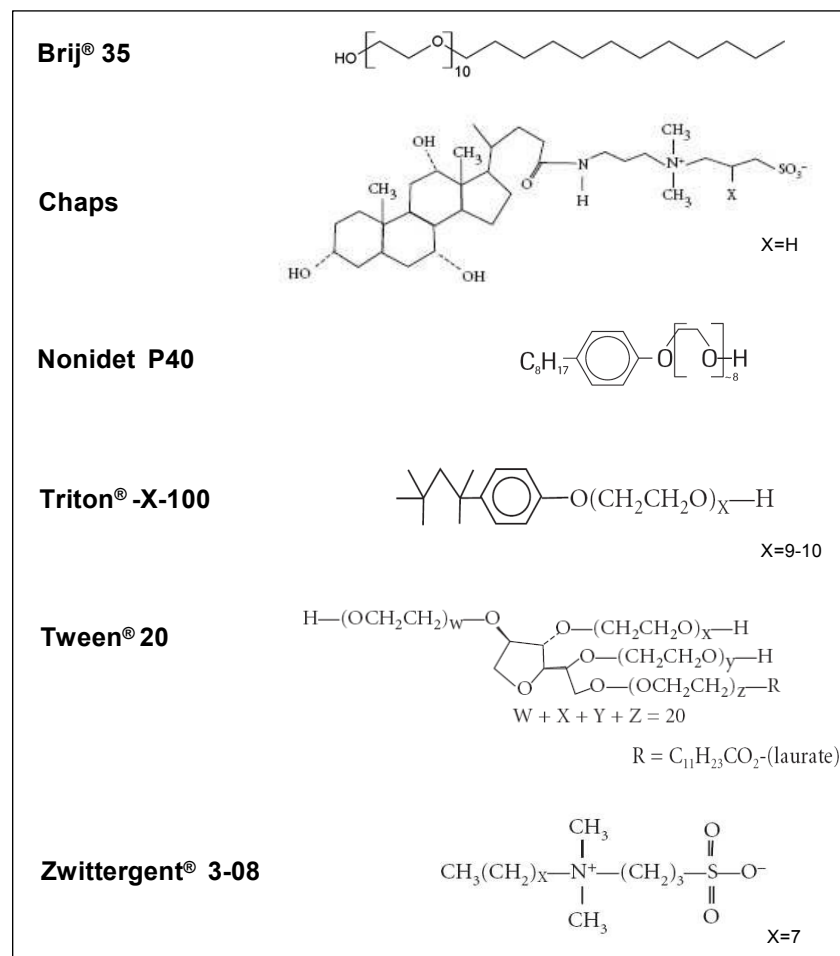


Abbildung 1. Strukturformeln der verwendeten Detergenzien.

2.2.7 Kultivierung der Organismen in getrennten Kompartimenten

Durch die Kultivierung in zwei, durch eine Membran voneinander getrennten Kompartimenten, sollte überprüft werden, ob ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen Hefen und Listerien für eine Ausübung der Hemmung notwendig ist.

Für diese Versuche wurden 6-well Zellkulturplatten mit Einsätzen der Firma Corning (Transwell[®], Corning B.V. Life Sciences, Niederlande) (Abb. 2) bzw. Nunc (Thermo Electron LED GmbH) verwendet. Die beiden Kompartimente sind durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 0,4 µm (Corning) bzw. eine Anopore[™]-Membran mit 0,2 µm Porendurchmesser (Nunc) getrennt. Die Einsätze der Firma Corning haben durch ihre hängende Lagerung in den Kavitäten einen festen Abstand zu den Seitenwänden und zum Boden der Zellkulturplatte (Abb. 2). Im Gegensatz dazu werden die Einsätze der Firma Nunc in die Kavitäten eingelassen und können sich durch den fehlenden Abstandshalter während der Kultivierung auf einem Schüttler in der Kavität bewegen. Die Porengröße der Membran ist so gewählt, dass die Keime die Membran i.d.R. nicht passieren können, jedoch den Stoffaustausch aus dem jeweiligen Flüssigmedium gewährleisten.

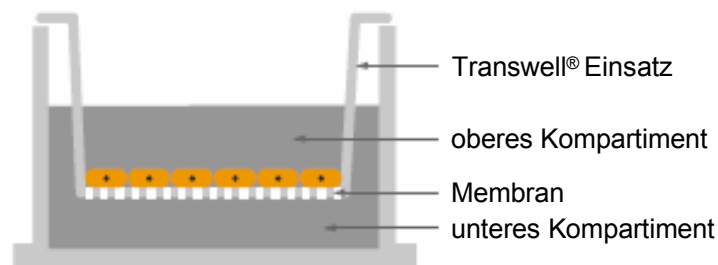


Abbildung 2. Seitenansicht eines Transwell[®]-Einsatzes der Firma Corning. Der obere Ring des Transwell[®]-Einsatzes liegt dem oberen Rand der Kavität auf, wodurch Bodenkontakt vermieden wird. Der Boden des Transwell[®]-Einsatzes besteht aus einer Polycarbonatmembran (0,4 µm Porendurchmesser) und trennt die Organismen in den beiden Kompartimenten voneinander, ermöglicht aber den Stoffaustausch.

L. monocytogenes WSLC 1364 wurde in Zelldichten von 10^2 und 10^4 KbE/mL eingesetzt, die Hefenstämmen WSYC 592 bzw. WSYC 623 mit 10^6 bzw. 10^8 KbE/mL. Einerseits wurden die Hefen in den oberen Kompartimenten und die Listerien in den unteren kultiviert, andererseits in umgekehrter Anordnung. Die Kultivierung der Zellkulturplatten fand für 24 h bei 27°C und ca. 100 U/min (Ika Schüttler MTS 4, Ika Labortechnik Staufen) statt. Zur Keimzahlbestimmung wurden Aliquots aus den einzelnen Kompartimenten verdünnt und auf entsprechende Selektivmedien ausplattiert. Beim Entnehmen der Proben aus den Kompartimenten war es von besonderer Wichtigkeit die sedimentierten Zellen zu

besonderer Wichtigkeit die sedimentierten Zellen zu resuspendieren, um keine verfälschten Keimzahlen zu detektieren.

2.2.8 Zellaufschluss

Die Zellen des aktiven Stammes *P. norvegensis* WSYC 592 wurden zur Überprüfung einer eventuellen Auslösung einer antilisteriellen Aktivität durch Zelltrümmer in einer Zelmühle (Vibrogen Zelmühle, E. Bühler GmbH) aufgeschlossen. Die Hefe-Hauptkultur wurde nach 24 h bei 2.500 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert und das gewonnene Zellpellet in einem Verhältnis von ca. 1 : 2 mit Glasperlen (Ø 0,1 mm, Roth) zu einer Paste vermischt. Der vorgekühlte 15 mL-Stahlbecher wurde 2 bis 3 cm unter den Rand mit der Paste befüllt und die Zellen für ca. 40 min bei 4°C aufgeschlossen. Diese wurden anschließend mit dem gleichen Volumen an ¼-Ringerlösung versetzt, gevortext, durch Umfüllen in ein neues Gefäß von den Glasperlen abgetrennt.

Für die Cokultivierungsversuche mit *L. monocytogenes* WSLC 1364 auf Festmedium wurden die aufgeschlossenen Zellen samt Zelltrümmern verwendet. Außerdem wurde diese Fraktion pelletiert (2.500 x g, 4°C, 10 min) und die Zelltrümmer konzentriert im Cokultivierungsversuch eingesetzt. Der beim Abzentrifugieren erhaltene Überstand wurde sterilfiltriert (Millex®-GP, 0,22 µm) und ebenfalls im Cokultivierungsversuch untersucht.

2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Probenpräparation

Nach einer Cokultivierung mit einem *L. monocytogenes* WSLC 1364-Titer von 5×10^5 KbE/cm² auf Festmedium, wurden nach 12, 18 und 24 Stunden mit einem Skalpell kleine Agarstücke in Form eines umgekehrten Pyramidenstumpfes ausgeschnitten (Oberseite: 5 x 5 mm, Basis: 3 x 3 mm), in 2 % Glutaraldehyd (EM-Grade; Plano, Wetzlar) (in 0,1 M Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,2) bei 4°C fixiert und in der Fixierlösung bis zur weiteren Aufarbeitung kühl gelagert. Die Proben wurden dann 3 x mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 % bis 100 %) (getrocknet; SeccoSolv-Qualität, Merck) entwässert. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Reihe (30 % bis 100 %) in Aceton (getrocknet; SeccoSolv-Qualität, Merck) überführt. Die Kritische-Punkt-Trocknung mit CO₂ erfolgte in einer CPD030-Anlage

(BAL-TEC, Lichtenstein). Die getrockneten Proben wurden auf Aluminium-Standard-Stiftprobentellern (Durchmesser: 12 mm; Plano, Wetzlar) mit Leit-C (Plano, Wetzlar) montiert. Die Proben wurden in eine MED020 Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage (BAL-TEC, Lichtenstein) überführt, die mit einem Gold-Target Wechselfansch-Sputterkopf (Abstand Probentisch – Goldtarget: 5 cm) ausgerüstet wurde. Die Anlage wurde evakuiert und der Rezipient anschließend mit Argon geflutet (Gasdruck: 5×10^{-2} mbar). Der Sputterprozess wurde für 35 sec bei einer Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Die Schichtdicke der aufgedampften Goldschicht (ca. 20 nm) wurde mit einem Quarz-Schichtdickenmessgerät (QSG 100, BAL-TEC, Lichtenstein) kontrolliert.

Rasterelektronenmikroskopie

Die REM-Analyse wurde in einem XL30 Rasterelektronenmikroskop (FEI Company, Eindhoven) im Hochvakuum-Modus („HiVac“) bei einer Beschleunigungsspannung von 10 kV mit einem Sekundärelektronen-Detektor durchgeführt (maximale Primärvergrößerung: 10.000 x). Die digitale Bilddokumentation erfolgte im Standard-TIFF-Format.

2.4 Gelelektrophorese

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (110) wurden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Durchführung wurde das Minigel-System von Biometra (Biometra GmbH, Göttingen) mit einer Gelgröße von 86 x 77 x 0,5 mm der 10%igen SDS-Gele benutzt. Die Proben wurden vorher in 4 x SDS-Probenpuffer (4 % SDS, 4 % Glycerin, 0,05 % β -Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau, 30 mM Tris-HCl, pH 6,8) für 10 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer (3 g/L Tris-Base, 14,4 g/L Glycin, 1 g/L SDS). Die Proben liefen bei 100 V in das Sammelgel ein. Nach dem Übergang in das Trenngel wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Als Molekulargewichtsstandard diente der PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas).

Die aufgetrennten Proteine wurden mit der Coomassie-Färbemethode visualisiert, die wie folgt durchgeführt worden ist. Die Gele wurden für 15 min in Coomassie-Färbelösung (0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma), 45 % Isopropanol,

9 % Essigsäure, 45,75 % Aqua dest.) gelegt, bis die Gele tiefblau gefärbt waren. Anschließend wurden sie kurz mit Aqua dest. gespült, bevor sie für 10 min in Entfärbelösung (10 % Essigsäure, 40 % Methanol, 50 % Aqua dest.) gegeben wurden. Der letzte Schritt wurde so oft wiederholt, bis das Trenngel fast farblos und der Molekulargewichtsstandard gut sichtbar war.

Für 4 Gele: Trenngel:

11 mL H₂O_{dest}
7,5 mL 1,5 M Tris pH 8,8
11,5 mL Acrylamid
300 µL 10% SDS
45 µL TEMED
45 µL APS

Sammelgel:

7,5 mL H₂O_{dest}
3,2 mL 0,5 M Tris pH 6,8
3,2 mL Acrylamid
128 µL 10% SDS
38 µL TEMED
53 µL APS

2.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Probenvorbereitung

Zur Gewinnung des Sekretoms wurde eine Hefe-Hauptkultur nach 10 h Kultivierung für 15 min bei 4.000 x g und 4°C abzentrifugiert, der Kulturüberstand unmittelbar danach sterilfiltriert (Millex[®]-GP, 0,22 µm) und auf Eis gelagert. Die Hefekulturen wurden teilweise für 15 min mit 100 mM NaCl behandelt, um oberflächengebundene Proteine zu solubilisieren, bevor die Zellen geerntet und der Überstand sterilfiltriert worden ist. Die Proteine wurden mit 10 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA, Sigma-Aldrich) über Nacht bei 4°C gefällt und am nächsten Tag per Zentrifugation für 1 h bei 10.000 x g und 4°C (Sigma 3K30) gewonnen. Das Pellet wurde vorsichtig in eiskaltem Aceton (-20°C) (Roth) aufgenommen, für 30 min bei 13.000 x g und 4°C abzentrifugiert und anschließend 6-mal mit eiskaltem Aceton (-20°C) mit 0,2 % 1,4-Dithiothreitol (DTT) (Merck) gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 200 µL Lysis-Puffer (2 M Thioharnstoff, 7 M Harnstoff, 1 % (w/v) DTT, 4 % (w/v) CHAPS, 2 % (w/v) Pharmalyte (pH 3-10), 10 mM Pefabloc) resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels 2-D Quant Kit (GE Healthcare) bestimmt und die Proben bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels zweidimensionaler (2D) Gelelektrophorese (148) nach dem Laboratory Manual von Görg *et al.* (82). Kurze Beschreibung: Die isoelektrische Fokussierung fand auf immobilisierten pH-

Gradienten (22) (IPG-strips, 18 cm, pH 4-7, GE Healthcare) im Ettan IPGphor 3 IEF System (GE Healthcare) statt. Die Rehydrierung der Gelstreifen geschah über Nacht in Puffer bestehend aus 2 M Thioharnstoff, 7 M Harnstoff, 1 % (w/v) Serdolit, 1 % (w/v) DTT, 4 % (w/v) CHAPS und 0,002 % (w/v) Bromphenolblau. Eine Proteinmenge von ca. 100 µg wurde auf jeweils einen Gelstreifen appliziert und über 35-45 kWh bei 20°C fokussiert. Die Gelstreifen wurden anschließend für 2 x 15 min äquibriert (50 mM Tris-HCl (pH 8.8) mit 2 % (w/v) SDS, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin), wobei beim ersten Schritt zusätzlich 1 % (w/v) Dithiothreitol (DTT) und beim zweiten Schritt 4 % (w/v) Iodacetamid im Puffer enthalten waren. Die zweite Dimension wurde mit 10 %igem SDS-Polyacrylamidgel im Ettan DALT six Vertical System (GE Healthcare) für 18 h bei 15 mA pro Gel ausgeführt. Nach Visualisierung der Proteine durch Silberfärbung, wurden die gefärbten Gele auf einem Flachbettscanner (HP Scanjet 4890) digitalisiert.

2.5 Untersuchung der antilisteriellen Aktivität von *St. equorum* WS 4524

2.5.1 Molekularbiologische Methoden

2.5.1.1 PCR und Sequenzierung

Die Kultivierung der *St. equorum*-Stämme WS 4524 und WS 2733 erfolgte über Nacht in 5 mL BHI-Bouillon bei 30°C und 160 U/min, die des *St. equorum*-Stammes WSGMO 2733 mic⁻ zusätzlich mit 5 µg/mL Tetracyclin. Die DNS wurde mit Hilfe des MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI, USA) nach Angaben des Herstellers isoliert. Vor der Lagerung der Proben bei -20°C, wurde die Konzentration im NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer bestimmt.

Zur Identifizierung eines putativen Peptidsynthetasegens im Genom der *St. equorum*-Stämme WS 4524, 2733 und WSGMO 2733 mic⁻, wurden degenerierte Oligonukleotidprimer nach Carnio *et al.* 2001 (38) verwendet, die aus einer hoch konservierten Region bereits bekannter Peptidsynthetasen abgeleitet sind. Unter Verwendung der Primer PSF3 (upstream) 5'-GG(ACT) (AT)C(AGT) AC(ACT) GG(ACT) (AC)A(AGCT) CC(ACT) AA(AG) GG-3' und PSR2 (downstream) 5'-GGC A(GT)C CAT (CT)T(CT) GCC A(AG)G TC(AGCT) CC(GT) GT-3' konnte der 738 bp lange DNS-Abschnitt im T3000 Thermocycler (Biometra GmbH) vervielfältigt werden. Der PCR-Ansatz bestand aus 100 pmol je Primer (MWG Biotech),

1,5 mM MgCl₂ (ABgene), 0,4 mM je dNTP (ABgene), 5 µL 10 x Thermoprime Standard Puffer (ABgene), ~100 ng DNS als Template, 0,5 U Thermoprime Taq Polymerase[®] (ABgene) und wurde mit sterilem MilliQ-Wasser auf 50 µL Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5 min folgte die Amplifizierung über 35 Zyklen (95°C für 15 s, 50°C für 30 s, 72°C für 1 min) und einer abschließenden Elongation bei 72°C für 5 min. Nach Überprüfung der PCR durch Agarose-Gelelektrophorese mit 1 %igem (w/v) Agarosegel (Sea-Kem[®] Agarose, Roth), konnten die PCR-Produkte mit dem GenElute[™] PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) aufgereinigt werden.

Die Sequenzierung wurde extern durch die Firma GATC Biotech AG durchgeführt. Die Identifizierung der erhaltenen Nukleotidsequenzen erfolgte über eine Datenbankrecherche mit BlastN und BlastX bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.5.1.2 Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

Bei der ARDRA wird mit einem universellen Primerpaar ein 2,4 kbp langes PCR-Produkt amplifiziert, welches die 16S rDNS, die 16S-23S rDNS Interspacer-Region und etwa 500 bp der 23S rDNS (193) enthält. Ein Vergleich des Fragmentmusters des nacheinander erfolgten Verdau mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XmnI ließ eine Speziesidentifizierung zu.

Zur Gewinnung der genomischen DNS wurde Zellmaterial einer zwei Tage auf modifiziertem Milchagar (mMA) mit Delvocid (93) bei 30°C kultivierten Staphylokokkenkultur mit einer sterilen Impföse aufgenommen, in 200 µL 1x PCR-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 1,5 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 0,01 % (w/v) Gelatine) resuspendiert und für 30 min bei 95°C unter Schütteln aufgeköcht. Für die anschließende PCR wurden 1,9 µL des Lysats verwendet. Die PCR erfolgte mit geringfügigen Änderungen nach Hoppe-Seyler *et al.* 2003 (94). Die Amplifizierung der PCR-Produkte mit einem universellen Primerpaar (upstream: 5'-TGG CTC AGA TTG AAC GCT GGC GGC-3'; downstream: 5'-CCT TTC CCT CAC GGT ACT GGT-3' (193)) geschah, nach einer initialen Denaturierung (92°C für 5 min), über 35 Zyklen (93°C für 1 min, 58°C für 2 min, 72°C für 2 min und 18 s), gefolgt von einer abschließenden Elongation bei 72°C für 10 min. Der Restriktionsverdau erfolgte über Nacht bei 37°C in einem Volumen von 20 µL, bestehend aus 5 U Restriktionsenzym, Inkubationspuffer und 10 - 17,5 µL des unaufgereinigten PCR-

Produkts, zuerst mit HindIII, gefolgt von XmnI (New England Biolabs). Die Auftrennung der DNS-Fragmente nach dem Restriktionsverdau geschah mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Das Färben des Agarosegels fand in Ethidiumbromid für 30 min statt, gefolgt von einem 15 minütigen Entfärben in destilliertem Wasser. Die digitale Bilddokumentation fand mit Hilfe des Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad) und der Software Quantity One 1-D Analysis (BioRad) statt.

2.5.1.3 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE ermöglicht, durch das sich periodisch verändernde elektrische Feld, eine Auftrennung großer DNS-Fragmente (bis zu 1×10^7 bp). Bei der herkömmlichen Agarose-Gelelektrophorese sind die Fragmente ab einer Größe von ca. 10^4 bp nicht mehr separierbar. Die genomische DNS wird mit einer selten schneidenden Restriktionsendonuklease (hier SmaI) in ca. 15 bis 20 Fragmente zerlegt (99). Diese werden in dem diskontinuierlichen elektrischen Feld aufgetrennt, sodass ein stammspezifisches Fragmentmuster entsteht und Stämme, z.B. die in dieser Arbeit verwendeten *St. equorum*-Stämme WS 4524 und WS 2733, voneinander differenziert werden können.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die schonende Behandlung der genomischen DNS. Durch das Einbetten in Agarblöcke ist sie bei den vielen Arbeitsschritten vor Scherkräften und damit vor dem Zerfallen in kleinere Fragmente geschützt.

Präparation der DNS

Die Stämme wuchsen zwei Tage bei 30°C in mPC-Bouillon mit Delvocid (93) ohne Schütteln an. Die Pellets der 2 mL-Aliquots wurden mit 1 mL 1x TE-Puffer (pH 8) resuspendiert und gewaschen; sie konnten bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert werden. Die Zellpellets wurden in 1 mL low melted Agarose (1 %ig (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht) resuspendiert und in die Taschen der Plugmolds (BioRad) pipettiert. Das Polymerisieren fand für 45 min bei 8°C statt. Ein Agarose Plug wurde in 1,5 mL Lysozymlösung (2 mg/mL Lysozym in 50 mM EDTA pH 8, 0,05 % N-Lauroylsarcosine, 20 U Mutanolysin, 5 mg/mL Brij 58, 2 mg/mL Na-Desoxycholat, 2,5 µg/mL RNase) gegeben und für ca. 6 h bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Plugs in Proteinase K-Lösung (1 mM Tris-HCl pH 8, 1 % (v/v) SDS, 0,45 M EDTA pH 8, 583 µg Proteinase K (Sigma)) umgesetzt und über Nacht bei 50°C inkubiert. Zum Inaktivieren der Proteinase K werden die Plugs zuerst für 1 h bei 50°C in 1x TE-Puffer (pH 8), danach bei 37°C über Nacht in Pe-

fabloc-Lösung (290 µg/mL Pefabloc (Merck) in 1xTE-Puffer pH 8) inkubiert. Vor dem Restriktionsverdau werden die Plugs sechs Mal je 30 min in 1xTE-Puffer (pH 8) gewaschen und bei 4°C gelagert.

Restriktionsverdau und Elektrophorese

Die Hälfte eines Plugs, die wiederum in zwei Teile geschnitten worden ist, wurde zuerst für 30 min in 1x Restriktionspuffer äquilibriert und anschließend in Gegenwart von 20 U SmaI (New England Biolabs) über Nacht bei 37°C verdaut. Zeitgleich wurde der molekulare Gewichtsstandard (LowRange PFG Marker, New England Biolabs) über Nacht bei 4°C in 1x TE-Puffer umgepuffert.

Die verdauten Proben wurden vor der Elektrophorese in Ficoll-Bromphenolblau-Lösung (3,75 mg/mL Ficoll (Calbiochem), 30,5 µg/mL Bromphenolblau (Merck), 0,5x TBE-Puffer) für 30 min bei 8°C umgepuffert. Nach Gießen und Polymerisieren des 1 %igen Agarosegels (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) konnten die Proben und der Gewichtsstandard in die Geltaschen eingesetzt und die Taschen mit 1 %iger Agarose versiegelt werden. Das Agarosegel wurde in die mit 0,5 x TBE-Puffer befüllte, auf 14°C vorgekühlte Gelkammer (BioRad) hineingelegt und die Elektrophorese gestartet. Eine Spannung von 6,4 V/cm wurde in 10 s Intervallen in einem Winkel von 120° über einen Zeitraum von 18 h angelegt. Das Färben des Agarosegels fand in Ethidiumbromid für 30 min statt, gefolgt von einem 15 minütigen Entfärben in destilliertem Wasser. Die digitale Bilddokumentation fand mit Hilfe des Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad) und der Software Quantity One 1-D Analysis (BioRad) statt.

2.5.2 Antilisterielle Aktivität und deren Stabilität

Der aufkonzentrierte und gefriergetrocknete Kulturüberstand der beiden *St. equorum*-Stämme WS 4524 und WS 2733 wurde von M. Koslowsky (Max Rubner-Institut, Abteilung für Mikrobiologie und Biotechnologie, Kiel) aufbereitet und zur Verfügung gestellt. Kurze Beschreibung: Die zwei Bakterienstämme wurden in einem 1,5 L Fermenter in mPC-Bouillon bei 25°C für 24 h angezüchtet und der Kulturüberstand mit Ammoniumsulfat (70 % (w/v)) über Nacht bei 4°C unter Rühren gefällt. Die nach Zentrifugation erhaltenen Pellets wurden in 50mM Tris-Puffer aufgenommen, über Nacht mit dem gleichen Puffer dialysiert und das gewonnene Dialysat gefriergetrocknet.

Die Bestimmung der antilisteriellen Aktivität der unaufgereinigten Hemmstoffe erfolgte mit der *critical dilution*-Methode nach Barefoot und Klaenhammer 1983 (14) die in *arbitrary units* (AU) pro mL ausgedrückt wird. Hierzu wurde eine fortlaufende, zweifache Verdünnungsreihe angefertigt und mittels Agar-Spot-Assay mit den Indikatorstämmen *L. monocytogenes* WSLC 1364, *L. innocua* WSLC 2339, WSLC 2394, und *L. ivanovii* WSLC 3061 getestet. Der Kehrwert der Verdünnungsstufe, die noch eine Hemmzone im Soft-Agar hervorruft, drückt die Aktivitätsstärke des Hemmstoffes aus.

Zur Klärung der biochemischen Eigenschaften des unaufgereinigten Hemmstoffes, wurde dieser einigen physikalischen, chemischen und enzymatischen Behandlungen unterzogen. Der in MilliQ-Wasser gelöste unaufgereinigte Hemmstoff (1 % (w/v)) wurde über einen Zeitraum von zwei Wochen bei - 20°C, 4°C und RT gelagert. Die Hitzesensitivität untersuchte man durch Erhitzen der hemmenden Lösung für 1 h bei 90°C, 100°C, 110°C oder 120°C. Die Stabilität gegenüber proteolytischen Enzymen wurde durch Inkubation mit 50 µg/mL Proteinase K (Roth), 50 µg/mL, 250 µg/mL oder 450 µg/mL Trypsin (Biochrom) über 2 h bei 37°C, gefolgt von einer Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 95°C, getestet. Das Löslichkeitsverhalten in organischen Lösungsmitteln und die verbleibende Wirksamkeit nach dem Auflösen in Aceton, Acetonitril, Chloroform, Dichlormethan, DMSO, Ethanol, Isopropanol oder Methanol wurden ebenfalls getestet. Der gelöste unaufgereinigte Hemmstoffe wurde für eine Stunde bei RT inkubiert, das Lösungsmittel anschließend in einer Vakuumzentrifuge bei 30°C evaporiert und das verbliebene Pellet in 100 µL MilliQ-Wasser gelöst. Die verbliebene antilisterielle Aktivität nach den oben genannten Behandlungen wurde mittels Agar-Spot-Assay bestimmt.

2.5.3 Flüssigchromatographie

Durch Einsatz des FPLC (Fast Protein Liquid Chromatographie)-Systems ÄKTA™ *purifier 10* (GE Healthcare) und unter Verwendung von Chromatographiesäulen mit verschiedenen Eigenschaften, konnte die hemmende Substanz nach weiteren Aspekten, wie Größe, Ladung oder Hydrophobizität untersucht werden. Alle hierbei verwendeten Geräte und Chromatographiesäulen wurden von GE Healthcare bezogen. Die Steuerung des Gerätes, sowie die Auswertung der Chromatographieläufe fand mit Hilfe der Software Unicorn™ 5.11 statt.

Der unaufgereinigte Hemmstoff wurde im jeweiligen Lauf- oder Auftragspuffer gelöst (1 % (w/v)), sterilfiltriert und 100 μ L der Probe mit 500 μ L des Lauf-/Auftragspuffers bei einer Geschwindigkeit von 0,5 mL/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte in der Regel über 1,5 Säulenvolumen (SV) bei einer Geschwindigkeit von 1 mL/min, während dieser Fraktionen von 1 mL aufgefangen wurden. Die Messung der Absorption fand bei 280 nm statt und wird in Milli Absorbance Units (mAU) ausgedrückt. Die verwendeten Puffer sind bei den jeweiligen Säulen aufgeführt. Die Säulenläufe erfolgten bei RT.

Die Gelfiltrationssäule HiTrap Desalting besitzt eine Ausschlussgrenze von 5 kDa und wird üblicherweise zur Entsalzung von Proben verwendet. Mit dieser Säule konnte schnell nach großen (< 5 kDa) und kleinen (> 5 kDa) Substanzen aufgetrennt werden. Setzte man dem Laufpuffer (siehe unten) noch 6 M Harnstoff zu, so konnten evtl. vorhandene Aggregate aufgetrennt werden. Eine weitere Gelfiltrationssäule, Superose 6 10/300 GL, erlaubt eine Auftrennung der Moleküle über einen Bereich von 5 kDa bis 5.000 kDa. Die Elutionsgeschwindigkeit wurde bei dieser Säule auf 0,5 mL/min reduziert.

Gelfiltration:

Säule:	HiTrap Desalting	Superose 6 10/300 GL
Säulenvolumen(SV):	5 mL	24 mL
Ausschlussgrenze:	$5 \times 10^3 M_r$	$4 \times 10^7 M_r$
Trennbereich:		$5 \times 10^3 - 5 \times 10^6 M_r$
Laufpuffer:	50 mM Na-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 7	
Gradient:	isokratisch	isokratisch
Flussrate:	1 mL/min	0,5 mL/min
Elutionsvolumen:	1,5 SV	1,5 SV

Die Hydrophobizität des Hemmstoffes wurde mit Säulen der hydrophoben Interaktions-Chromatographie (HIC) untersucht. Die HiTrap Phenyl FF (high/low sub)-Säulen weisen eine mittlere bis hohe Hydrophobizität auf und eignen sich für initiale Reinigungsschritte. Die HiTrap Butyl-S FF-Säule weist eine geringe Hydrophobizität und einen anderen Bindungsliganden auf, das die Selektivität erweitert. Mit diesen Säulen fand die Elution bei 0,5 mL/min über einen linearen Gradienten statt. Die Probe wurde im Auftragspuffer (Puffer B) gelöst und über 2,5 SV auf die Säule aufgetragen. Über einen Zeitraum von 10 SV wurde die Ammoniumsulfat-Konzentration von 1,5 M auf Null gesenkt und diese Konzentration für weitere 2 SV beibehalten. Das Waschen der Säule fand im Anschluss über 5 SV mit Puffer B statt.

Die Fraktionen wurden zum Teil in einer Vakuum-Zentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) aufkonzentriert. Die Aktivitätsbestimmung der Fraktionen fand mittels Agar-Spot-Assay statt.

Hydrophobe Interaktionschromatographie:

Säule:	HiTrap Phenyl Sephacrose 6 FF (high sub)	HighTrap Phenyl Sephacrose 6 FF (low sub)	HiTrap Butyl-S Sephacrose 6 FF
Säulenvolumen (SV):	1 mL	1 mL	1 mL
Ligand:	Phenyl	Phenyl	Butyl-S
Ligandendichte:	40 µmol/mL	25 µmol/mL	10 µmol/mL

folgende Angaben sind für alle drei Säulen identisch

Puffer:	A: 50 mM Na-Phosphat, pH 7 B: Puffer A + 1,5 M Ammoniumsulfat, pH 7
Gradient:	linear Start: 100% Puffer B über 2,5 SV Gradient: 100% -> 0% Puffer B über 10 SV Ende: 0% Puffer B über 2 SV Waschen: 100% Puffer B über 5 SV
Flussrate:	0,5 mL/min

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Experimente zur partiellen Charakterisierung des antilisteriellen Wirkprinzips von *Pichia norvegensis* WSYC 592 und *Staphylococcus equorum* WS 4524 sind in zwei voneinander unabhängigen Abschnitten aufgeführt. Zunächst wird auf die Ergebnisse und Erkenntnisse eingegangen, die mit dem Hefestamm *P. norvegensis* WSYC 592 erzielt worden sind.

***Pichia norvegensis* WSYC 592**

3.1 Bestimmung des Hemmpotentials einiger Hefeisolate mittels Cokultivierung auf Festmedium

Die antilisterielle Aktivität einiger Hefeisolate wurde im Vorfeld mittels Cokultivierung auf Festmedium bestimmt. Bei eingesetzten 6 KbE/cm^2 des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364 wurde die Listerienzellzahl in Anwesenheit der Hefeisolate *Issatchenkia orientalis* WSYC 555, 557, 558 und 559 um vier Zehnerpotenzen gegenüber dem Kontrollansatz, bei dem die Listerien bis auf 10^6 KbE/cm^2 anwachsen, reduziert. *P. norvegensis* WSYC 592 war in der Lage einen Titer von 10^5 KbE/cm^2 des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 nach 24 Stunden Cokultivierung bis unter die Nachweisgrenze zu reduzieren. Der eingesetzte Titer lag weit über einer realistischen Kontamination mit *L. monocytogenes* von i.d.R. $<10 \text{ KbE/cm}^2$ (168, 169). *Pichia* sp. WSYC 623 und *I. orientalis* WSYC 776 reduzierten die Listerien lediglich um eine Zehnerpotenz.

3.2 Hemmungskinetik auf Festmedium

Zur Bestimmung des Zeitpunktes, zu dem die Hemmwirkung einsetzte, wurde eine Hemmungskinetik über 48 Stunden mittels Cokultivierung auf Festmedium durchgeführt. Während der Kultivierung des Kontrollansatzes (*L. monocytogenes* WSLC 1364 ohne Hefen) bzw. der Cokultivierung mit der nicht-hemmenden Kontrollhefe *Pichia* sp. WSYC 623 (eingesetzter Hefentiter 10^5 - 10^6 KbE/cm^2) konnten die Listerien von ursprünglich 10^5 KbE/cm^2 auf 10^8 KbE/cm^2 anwachsen (Abb. 3). In Anwesenheit der hemmenden Hefe *P. norvegensis* WSYC 592 (eingesetzter Hefentiter 10^5 - 10^6 KbE/cm^2) wuchsen die Listerien innerhalb von neun Stunden bis auf 10^7 KbE/cm^2 , wurden jedoch nach 21 Stunden Cokultivierung bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Nach ca. zehn Stunden Cokultivierung, der Zeitpunkt, ab dem die stationäre Wachstumsphase der

die stationäre Wachstumsphase der *P. norvegensis* WSYC 592 begann, setzte die Hemmwirkung ein.

Der pH-Wert des Cokultivierungsansatzes mit der Hefe WSYC 592 sank nach sechs Stunden Cokultivierung, ca. vier Stunden vor den beiden Kontrollansätzen, ab und erreichte nach zwölf Stunden Cokultivierung einen Wert von pH 4,8. Weitere sechs Stunden später erreichte der pH-Wert mit pH 4,6 sein Minimum. Vergleichbare pH-Werte erreichten die Kontrollansätze erst nach 18 bzw. 24 Stunden Cokultivierung (Abb. 3). Nach 48 Stunden Cokultivierung lag der pH-Wert des Cokultivierungsansatzes mit der hemmenden Hefe WSYC 592 bei pH 4,9, mit der nicht-hemmenden Kontrollhefe WSYC 623 bei pH 4,5 und der pH-Wert des Kontrollansatzes ohne Anwesenheit der Hefen bei pH 4,3.

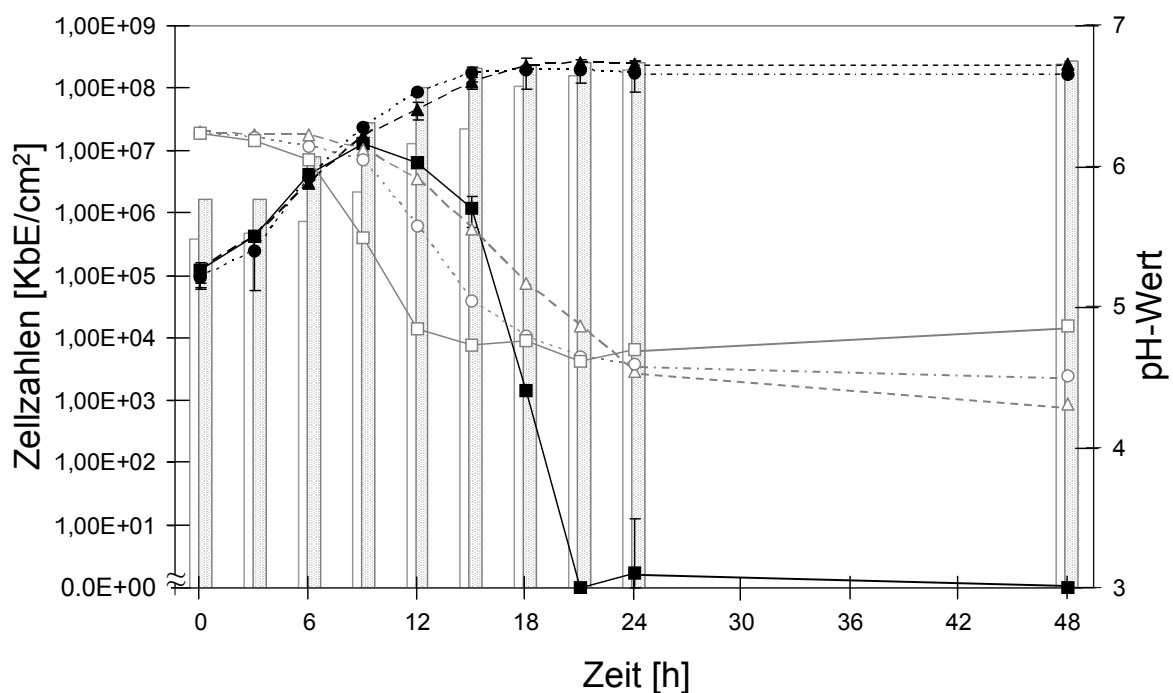


Abbildung 3. Listerien- und Hefezellzahlen während Cokultivierung auf Festmedium. Zellzahlen von *L. monocytogenes* WSLC 1364 ohne den Einfluss von Hefen (▲) bzw. während Cokultivierung mit den Hefestämmen WSYC 592 (■) oder WSYC 623 (●); Zellzahlen der hemmenden Hefe WSYC 592 (■) und der Kontrollhefe WSYC 623 (□), gemessen über einen Zeitraum von 48 h. Parallel wurden die pH-Werte (leere Symbole) der Agarplatten mit einer Oberflächen-pH-Elektrode gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei bis acht unabhängigen Experimenten mit Fehlerbalken.

Mit der Erkenntnis, dass die Hemmung der Listerien in der stationären Wachstumsphase des Stammes *P. norvegensis* WSYC 592 stattfand und der Hefestamm seine volle antilisterielle Wirkung während dieser Wachstumsphase entfaltete, konnten nachfolgende Versuche zur Untersuchung des hemmenden Prinzips darauf ausgerichtet werden.

3.3 Bestimmung der Hemmaktivität in Flüssigmedium

Die Hefe-Hauptkulturen (Flüssigkulturen) der Stämme WSYC 592 und WSYC 623 in ihrer stationären Wachstumsphase wurden aufgrund vorheriger Ergebnisse auf ihr antilisterielles Hemmpotential untersucht. Der Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364 wurde in einer Dichte von ca. 10^5 KbE/mL direkt zur jeweiligen Hefe-Hauptkultur gegeben und nach mehreren Zeitpunkten die Listerienzellzahl bestimmt. Bereits nach zwei Stunden Cokultivierung konnten die Listerien durch die Hauptkultur der *P. norvegensis* WSYC 592 um anderthalb Zehnerpotenzen, nach sechs Stunden Cokultivierung um vier Zehnerpotenzen bzw. bis unter die Nachweisgrenze in ihrer Zellzahl reduziert werden (Abb. 4). Nach 24 Stunden waren mit dem Plattenausählverfahren keine Listerien mehr detektierbar. Eine Hemmung der Listerien in Flüssigkulturen bzw. Flüssigmedium war somit ebenfalls möglich. Bei der Cokultivierung mit der nicht-hemmenden Kontrollhefe WSYC 623 war ein minimaler Rückgang der Listerienzellzahlen zu erkennen.

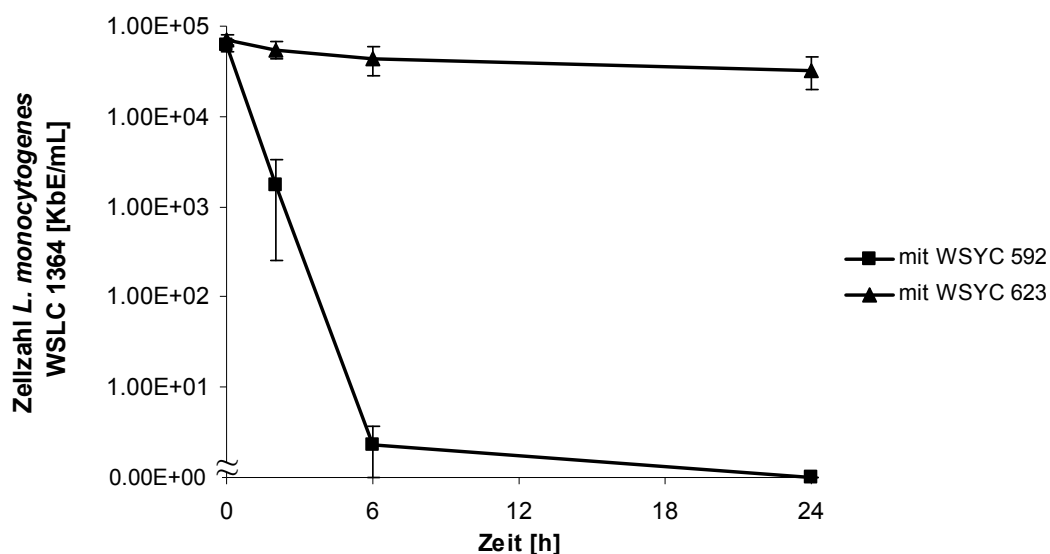


Abbildung 4. Listerienzellzahlen während der Cokultivierung mit den Hauptkulturen der Hefen WSYC 592 (▲) und WSYC 623 (■) bei 27°C und 180 U/min für 24 h. Die Zellzahlbestimmungen erfolgten nach 0 h, 2 h, 6 h und 24 h. Angegeben sind die Mittelwerte von neun unabhängigen Experimenten mit Fehlerbalken.

3.4 Einflussnahme auf die Hemmaktivität und deren Stabilität

Da sich zeigte, dass die Hemmung des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364 auch im Flüssigmedium möglich war, wurde der Versuchsaufbau dementsprechend umgestellt. Dies bedeutete, gegenüber der Cokultivierung auf Festmedium, eine erhebliche Erleichterung, da mehrere Bedingungen gleichzeitig untersucht werden konnten. Untersucht wurde die Stabilität des Hemmpotentials

der *P. norvegensis* WSYC 592 und die Einflussnahme einer Auswahl an Kohlenstoffquellen und Detergenzien (Tab. 3, 4) auf den antilisteriellen Wirkmechanismus.

3.4.1 Abhängigkeit der antilisteriellen Aktivität vom Zugabezeitpunkt der Listerien

Nachdem eine nahezu vollständige Hemmung von *L. monocytogenes* WSLC 1364 durch den aktiven Hefestamm WSYC 592 bereits nach sechs Stunden Cokultivierung möglich war, stellte sich die Frage, ob nach einer erneute Zugabe an Listerien zur selben Hefekultur bzw. Cokultur ebenfalls eine vollständige oder auch partielle Reduktion der Listerienzellzahl erreicht werden könnte. Hierzu wurde sechs bzw. 24 Stunden nach der ersten Listerienzugabe (eingesetzter Titer 10^3 KbE/mL) der gleiche Titer an Listerien ein weiteres Mal hinzugefügt und die Listerienzellzahl nach 24 bzw. 48 Stunden bestimmt (Abb. 5).

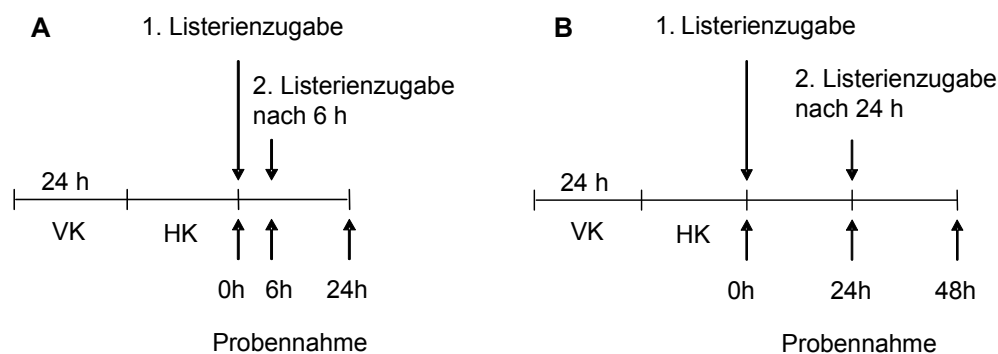


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Cokultivierungen bei erneuter Zugabe der Listerien. Die Listerienzugabe erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0 h und zusätzlich nach 6 h (A) bzw. 24 h (B) Cokultivierung. Die Listerienzellzahl wurde nach 0 h, 6 h, 24 h (A) bzw. nach 0 h, 24 h und 48 h (B) bestimmt. VK: Hefen-Vorkultur. HK: Hefen-Hauptkultur.

Die zweite zugeführte Listeriendosis nach sechs Stunden (Abb. 5 A) konnte von *P. norvegensis* WSYC 592 vollständig gehemmt bzw. bis unter die Nachweisgrenze reduziert werden (Tab. 5). Im Falle der Kontrollhefe WSYC 623 verdoppelte sich die Listerienzellzahl, bedingt durch die erneute Zugabe, auf 2×10^3 KbE/mL. Erfolgte die erneute Listerienzugabe nach 24 Stunden (Abb. 5 B), so konnte der zusätzliche Listerientiter durch *P. norvegensis* WSYC 592 nicht mehr gehemmt werden und blieb somit bei der eingesetzten Konzentration von 1×10^3 KbE/mL (Tab. 5).

Eine Modifizierung dieses Versuchsansatzes sah vor der erneuten Listerienzugabe nach 24 Stunden einen Nährmediumswechsel vor. Das Zellpellet der Cokultur wurde dazu in frischer YG^+ -Bouillon resuspendiert und für weitere 24 Stunden mit

einem Listerientiter von 10^3 KbE/mL kokultiviert. Durch diesen Nährmediumswechsel konnte auch die nach 24 Stunden zugeführte Listeriendosis vollständig gehemmt werden.

In einem weiteren Versuch wurden die Hefen WSYC 592 und WSYC 623 über 72 Stunden statt 24 Stunden kultiviert, bevor ein Listerientiter von $\sim 10^3$ KbE/mL zugegeben worden ist. Eine Listerienhemmung nach 24 Stunden Kokultivierung konnte nicht beobachtet werden.

Tabelle 5. Listerienzellzahlen während der Kokultivierung mit erneuter Zugabe an Listerien nach sechs Stunden (A) bzw. nach 24 Stunden (B). Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zeitpunkt der Zellzahlbestimmung			WSYC 592 [KbE/mL]	WSYC 623 [KbE/mL]
A	0 h	nach 1. Listerienzugabe	7×10^2	7×10^2
	6 h	vor 2. Listerienzugabe	0	8×10^2
		nach 2. Listerienzugabe	8×10^2	1×10^3
	24 h		0	1×10^3
B	0 h	nach 1. Listerienzugabe	7×10^2	6×10^2
	24 h	vor 2. Listerienzugabe	0	5×10^2
		nach 2. Listerienzugabe	9×10^2	1×10^3
	48 h		1×10^3	1×10^3

3.4.2 Einfluss diverser Kohlenstoffquellen auf die antilisterielle Aktivität

Die Kohlenstoffquelle (C-Quelle) als Bestandteil des Nährmediums und als mögliche Ursache des beobachteten Wiederauftretens der antilisteriellen Aktivität wurde, zur Aufklärung des Effektes, genauer untersucht. In den folgenden Versuchen galt es einige Fragestellungen zu beantworten.

3.4.2.1 Welche C-Quellen nehmen Einfluss auf die Hemmwirkung?

Zu Glucose strukturähnliche C-Quellen

Die standardmäßig in den Kokultivierungsversuchen genutzte C-Quelle Glucose wurde durch strukturähnliche C-Quellen ersetzt (Abb. 6) und die Hemmwirkung der *P. norvegensis* WSYC 592 überprüft. An Stelle des unter 3.4.1 beschriebenen Nährmedienwechsels wurde lediglich die C-Quelle zu einer 24 Stunden alten Kokultur hinzugegeben. Es zeigte sich, dass die Hefe WSYC 592 eine zweite hinzugefügte Listeriendosis ($\sim 10^3$ KbE/mL) des Indikatorstammes WSLC 1364 nach

weiteren 24 Stunden Cokultivierung (Abb. 5 B) erneut bis unter die Nachweisgrenze reduzierte, wenn Glucose, Fructose oder Mannose (2 % v/v) zugegeben wurden. Ohne erneute Zugabe der C-Quellen oder bei Cokultivierung mit der nicht-hemmenden Hefe WSYC 623 blieb die Listerienzellzahl auf Höhe des eingesetzten Titors von $\sim 10^3$ KbE/mL.

Kulturen des Hefestammes WSYC 592, die über 72 Stunden kultiviert wurden, waren nicht in der Lage den eingesetzten Listerientiter von $\sim 10^3$ KbE/mL in der Zellzahl zu reduzieren. Die Zugabe eines der drei Monosaccharide Glucose, Fructose oder Mannose (2 % v/v) zu einer 72 Stunden alten Hefekultur von WSYC 592 bewirkte ein erneutes Auftreten der antilisteriellen Aktivität, sodass *L. monocytogenes* WSLC 1364 bis unter die Nachweisgrenze gehemmt werden konnte.

Die drei Hexosen weisen im Bereich der Kohlenstoffatome C3 bis C6 eine identische Struktur auf (Abb. 6). Um zu überprüfen, ob die strukturelle Komponente im Zusammenhang mit dem Wiederauftreten der antilisteriellen Aktivität steht, wurde der Fokus auf weitere strukturähnliche C-Quellen gelegt. Im gleichen Versuchsaufbau wurde D-Arabinose, die ebenfalls den beschriebenen Strukturteil aufweist, sowie D-Galactose, die sich nur am C4-Kohlenstoffatom von der Glucose unterscheidet, getestet. Hinzu kamen die beiden Disaccharide Maltose und Saccharose, bestehend aus Glucose und Fructose bzw. aus zwei Glucosemolekülen. Keines der vier letztgenannten Mono- oder Disaccharide konnte eine Reaktivierung der antilisteriellen Aktivität herbeiführen.

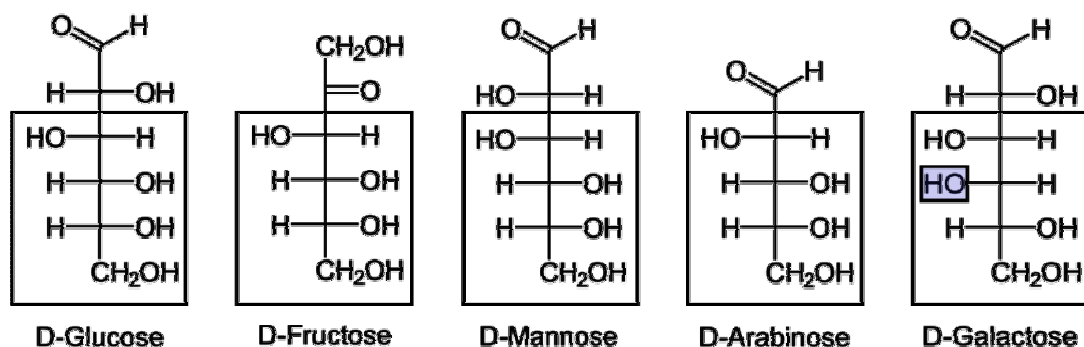


Abbildung 6. Strukturvergleich der D-Formen der Monosaccharide Glucose, Fructose, Mannose, Arabinose und Galactose. Der eingerahmte Strukturteil ist mit Ausnahme der Galactose identisch. Die blau markierte Hydroxygruppe hebt den Unterschied der Galactose zur Glucose hervor.

Selektiv von den Organismen verwertbare C-Quellen

Weiterhin wurden C-Quellen getestet, die nur von einem der beiden Organismen verwertet werden konnten. L-Rhamnose, die von *L. monocytogenes* (69), nicht aber von der Spezies *P. norvegensis* (15) verstoffwechselt werden kann, wurde hierzu ausgewählt. Auf Seite der Hefen wurde di-Ammoniumhydrogencitrat ausgewählt, da diese Citrat verstoffwechseln konnten (15). Listerien verwerteten aufgrund ihres unvollständigen Citrat-Zyklus (67, 86, 186) das Citrat nicht (12).

Als Basismedium für die Kultivierung der beiden Organismen in Abwesenheit der Glucose diente Y⁺-Bouillon, der 2 % (v/v) der zu testenden C-Quelle hinzugefügt wurden. Nach der 24h-Cokultivierung eines Titers von 10⁴ KbE/mL des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSC 1364 mit den Hefekulturen von WSYC 592 bzw. WSYC 623, wurde in Gegenwart von di-Ammoniumhydrogencitrat keine Hemmung der Listerien festgestellt, obwohl ein zu Glucose vergleichbares Hefenwachstum zu beobachten war. Auffallend war der neutrale End-pH-Wert. Im Gegensatz zur Cokultivierung mit di-Ammoniumhydrogencitrat war bei der Cokultivierung in Gegenwart von Glucose ein End-pH-Wert von ca. 4,6 erreicht worden.

In Anwesenheit von L-Rhamnose konnten weder der Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364, noch die beiden Hefestämme WSYC 592 und WSYC 623 merklich wachsen. Eine Hemmung der Listerien blieb ebenfalls aus.

3.4.2.2 Tritt eine Initiierung der Hemmaktivität auf Seite der Listerien auf?

An dieser Stelle galt es herauszufinden, ob die C-Quellen Glucose und Mannose auf Seite der Listerien eine Reaktion in Gang setzen, die eine Hemmung durch *P. norvegensis* WSYC 592 ermöglicht oder sogar beschleunigt.

Falls die Glucose maßgebend an der Listerienhemmung durch den Hefestamm WSYC 592 beteiligt ist, so müsste der Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364 bei Überschuss an Glucose im Kultivierungsmedium schneller durch den aktiven Hefestamm abgetötet werden können.

L. monocytogenes WSLC 1364 wurde über Nacht mit zusätzlich 2 % (v/v) Glucose in BHI-Bouillon kultiviert, 17 Stunden später in einem Titer von 10³ KbE/mL zu Kulturen der Hefen WSYC 592 und WSYC 623 zugegeben und die Listerienzellzahlen in engen Zeitabständen bestimmt. Sowohl die normal in BHI-Bouillon, als auch die mit Glucose im Wachstum geförderten Listerien wurden gleich schnell von der

aktiven Hefe WSYC 592 in ihrer Zellzahl reduziert (Abb. 7). Die Vermutung, dass ein Überschuss an Glucose die Hemmung der Listerien beschleunigt bzw. dass durch Glucose im Wachstum geförderte Listerien schneller gehemmt werden, wurde widerlegt.

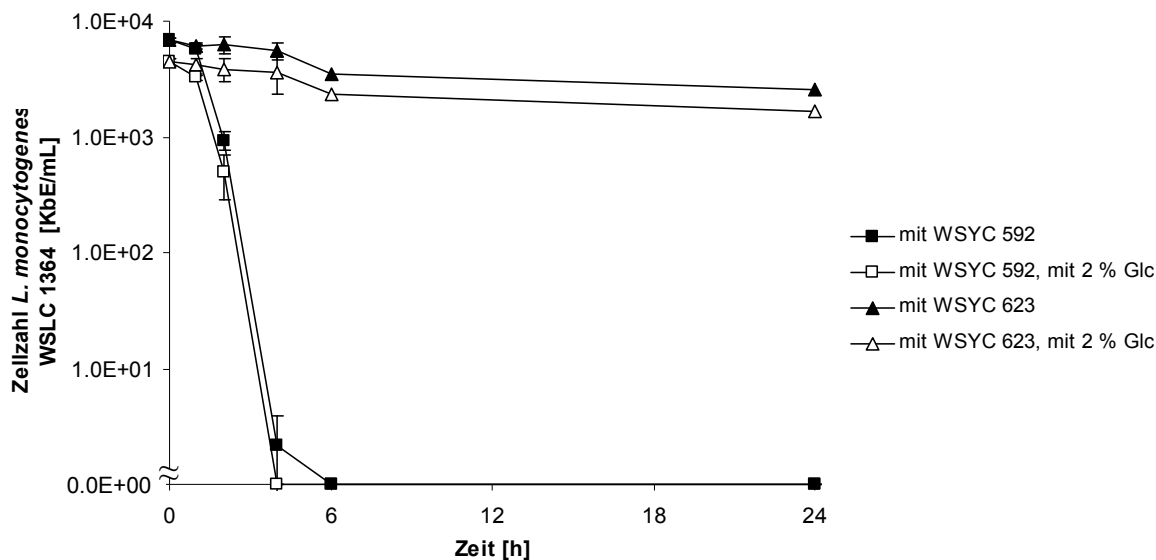


Abbildung 7. Listerienzellzahlen während Cokultivierung mit den Hauptkulturen der Hefen WSYC 592 (■) und WSYC 623 (▲) bei 27°C und 180 U/min für 24 h. Die Zellzahlbestimmungen erfolgten nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h. Leere Symbole: Das Wachstum der Listerien-ÜNK wurde zusätzlich mit 2 % (v/v) Glucose gefördert. Angegeben sind die Mittelwerte von zwei bis drei unabhängigen Experimenten mit Fehlerbalken.

Mit Hilfe der Mannose wurde getestet, ob sich die Hemmwirkung verändert, wenn der Listerien-Indikatorstamm die C-Quelle nicht verstoffwechseln kann. Hierzu wurde die Deletionsmutante *L. monocytogenes* EGD-e Δpts^{Man} , $\Delta Imo0027$ herangezogen, bei der der Mannosetransport durch die Deletion des Mannose-Phosphotransferase (PTS)-Systems unterbunden ist. Somit konnte der Einfluss auf die Hemmwirkung mit einer C-Quelle getestet werden, unter deren Einsatz eine Hemmung der Listerien möglich war.

Die beiden Hefestämme WSYC 592 und WSYC 623, sowie der Wildtypstamm *L. monocytogenes* EGD-e und die Deletionsmutante EGD-e Δpts^{Man} , $\Delta Imo0027$, wurden in Y^+ -Bouillon mit 2 % (v/v) Mannose vorkultiviert. Die Zellzahl beider Hefe-Hauptkulturen lag im Bereich von $10^8 - 10^9$ KbE/mL und war vergleichbar mit Glucose kultivierten Hefen. Auch die beiden Listerienstämme waren in der Lage bis zu einer Zelldichte anzuwachsen, die mit der Kultivierung in BHI-Bouillon vergleichbar war. Der aktive Hefestamm WSYC 592 reduzierte während der Cokultivierung über 24 Stunden den eingesetzten Titer des Wildtypstammes *L. monocytogenes* EGD-e und der Deletionsmutante von je 10^4 KbE/mL bis auf

wenige Zellen bzw. bis unter die Nachweisgrenze (Tab. 6). In Gegenwart der nicht-hemmenden Kontrollhefe WSYC 623 blieb der eingesetzte Titer der Deletionsmutante von 10^4 KbE/mL nahezu unverändert, wohingegen es bei der Cokultivierung mit dem Wildtypstamm *L. monocytogenes* EGD-e einen Zellzahlrückgang von ca. einer Zehnerpotenz gab. Die Hemmung der Deletionsmutante *L. monocytogenes* EGD-e Δpts^{Man} , $\Delta mo0027$ war unabhängig von ihrer Fähigkeit Mannose zu verwerten.

Tabelle 6. Zellzahlen nach 24 Stunden Cokultivierung der beiden *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e und EGD-e Δpts^{Man} , $\Delta mo0027$ mit den Kulturen der beiden Hefen WSYC 592 und WSYC 623. Die eingesetzten Hefezellzahlen lagen bei $\sim 7 \times 10^8$ KbE/mL, die eingesetzte Listerienzellzahl bei ca. 4×10^4 KbE/mL. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Stamm	<i>L. monocytogenes</i> EGD-e [KbE/mL]	<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δpts^{Man} , $\Delta mo0027$ [KbE/mL]
<i>P. norvegensis</i> WSYC 592	6,8	0
<i>Pichia</i> sp. WSYC 623	$2,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$

3.4.2.3 Die Sonderrolle des Lactat

Lactose wird in der frühen Phase der Käsureifung durch Starter- und Nicht-Starterkulturen schnell zu Lactat metabolisiert (188). Die Verstoffwechslung des Lactats durch Hefen führt zu einer Entsäuerung der Käsoberfläche (33, 63). Da Lactat im Käse eine natürlich vorkommende C-Quelle darstellt, wurden Natrium-Lactat (nachfolgend nur als Lactat bezeichnet), sowie Natrium-Pyruvat mit ebenfalls drei Kohlenstoffatomen, als Einflussfaktoren auf die Hemmwirkung der *P. norvegensis* WSYC 592 getestet.

Der aktive Hefestamm WSYC 592, sowie der Kontrollstamm WSYC 623 wurden in YL⁺-Bouillon (enthielt 2 % v/v Lactat) kultiviert. Mit 10^8 KbE/ml nach Kultivierung über 24 Stunden zeigten die Hefen ein sehr gutes Wachstum, das mit Glucose als C-Quelle vergleichbar war. Der eingesetzte Listerientiter von $\sim 10^3$ KbE/mL des Indikatorstammes WSLC 1364 stieg während der Cokultivierung über 24 Stunden unter Einfluss der Hefekulturen bis auf 10^8 KbE/ml an. Die Listerien wurden von der antilisteriell wirksamen Hefe WSC 592 nicht in ihrer Zellzahl reduziert. Eine weitere Beobachtung war der erhöhte pH-Wert der Cokultur. Lag dieser nach der Cokultivierung mit Fructose, Glucose oder Mannose über 24 Stunden mit pH $\sim 4,6$ im sauren Bereich, so wurde in Gegenwart von Lactat ein pH-Wert von 8 bis 9 er-

reicht. Mit Natrium-Pyruvat konnten weder der Listerien-Indikatorstamm, noch die beiden Hefestämme merklich wachsen. Eine Hemmung der Listerien wurde nicht beobachtet.

Aufgrund des vollständigen Ausbleibens der Hemmung mit Lactat als C-Quelle wurde die Rolle des Lactats innerhalb des Hemmmechanismus genauer untersucht. In Zusammenarbeit mit Dr. Stefanie Goerges wurden Cokultivierungen mit einer festen Glucosekonzentration von 2 % bzw. 1,5 % (w/v) und variierenden Anteilen an Lactat durchgeführt (Abb. 8). *L. monocytogenes* WSLC 1364 wurde in einem Titer von $\sim 10^3$ KbE/ml eingesetzt und die Listerienzellzahl über einen Zeitraum von 24 Stunden in engen Zeitabständen bestimmt. Aufgrund der oben beobachteten pH-Wert-Erhöhung in Gegenwart von Lactat wurden parallel die pH-Werte bestimmt.

Bei den Versuchsreihen mit ausschließlich 2 % Glucose hemmte die aktive Hefe WSYC 592 den Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364, in Abwesenheit von Lactat, nach acht Stunden Cokultivierung vollständig. Der pH-Wert sank nach ca. vier Stunden von ursprünglich pH 6,5 auf ein Minimum von pH 4,5 und verblieb auf diesem Niveau. Die zusätzliche Gegenwart von 1,5 % oder 3 % (v/v) Lactat beeinflussten die Hemmung der Listerien nicht, sodass auch hier nach acht Stunden keine Listerien mehr vorgefunden wurden. Mit diesen beiden Lactatkonzentrationen sank der pH-Wert nach vier Stunden auf pH $\sim 5,5$ ab und pendelte sich nach zehn Stunden Cokultivierung in einen Bereich zwischen pH 6 und pH 7 ein. In einer weiteren Versuchsreihe (graue Kurven) mit 2 % Glucose und 4,5 % Lactat wurde die Hemmung der Listerien durch *P. norvegensis* WSYC 592 soweit herabgesetzt, dass nach 24 Stunden noch einige wenige Listerien vorhanden waren. Die pH-Werte dieser Versuchsreihe (hellblaue Kurven) waren ähnlich den Werten, wie bei den Cokultivierungen mit 1,5 % und 3 % Lactat.

Bei den Versuchsreihen mit einer festen Glucosekonzentration von 1,5 % (w/v) wurde das Lactat in wesentlich niedrigeren Konzentrationen zudosiert. Im Vergleich zum vorhergehenden Versuch führte die niedrigere Glucosekonzentration zu einer zwei Stunden verzögerten Listerienhemmung durch die aktive Hefe WSYC 592, sodass erst nach zehn Stunden Cokultivierung keine Listerien mehr nachweisbar waren, wenn kein Lactat vorhanden war. Die pH-Wert-Entwicklung war jedoch nahezu identisch zu den Versuchsreihen mit 2 % Glucose. Eine Re-

duktion der Listerienzellzahlen bis unter die Nachweisgrenze nach zehn Stunden Cokultivierung war auch beim Versuchsansatz kombiniert mit 0,25 % Lactat zu beobachten. Hier waren pH-Werte zu verzeichnen, die bis zwölf Stunden Cokultivierung mit dem Versuchsansatz ohne Lactat vergleichbar waren. Nach 24 Stunden Cokultivierung lag der pH-Wert bei pH 7,5 und differierte vom Cokultivier-

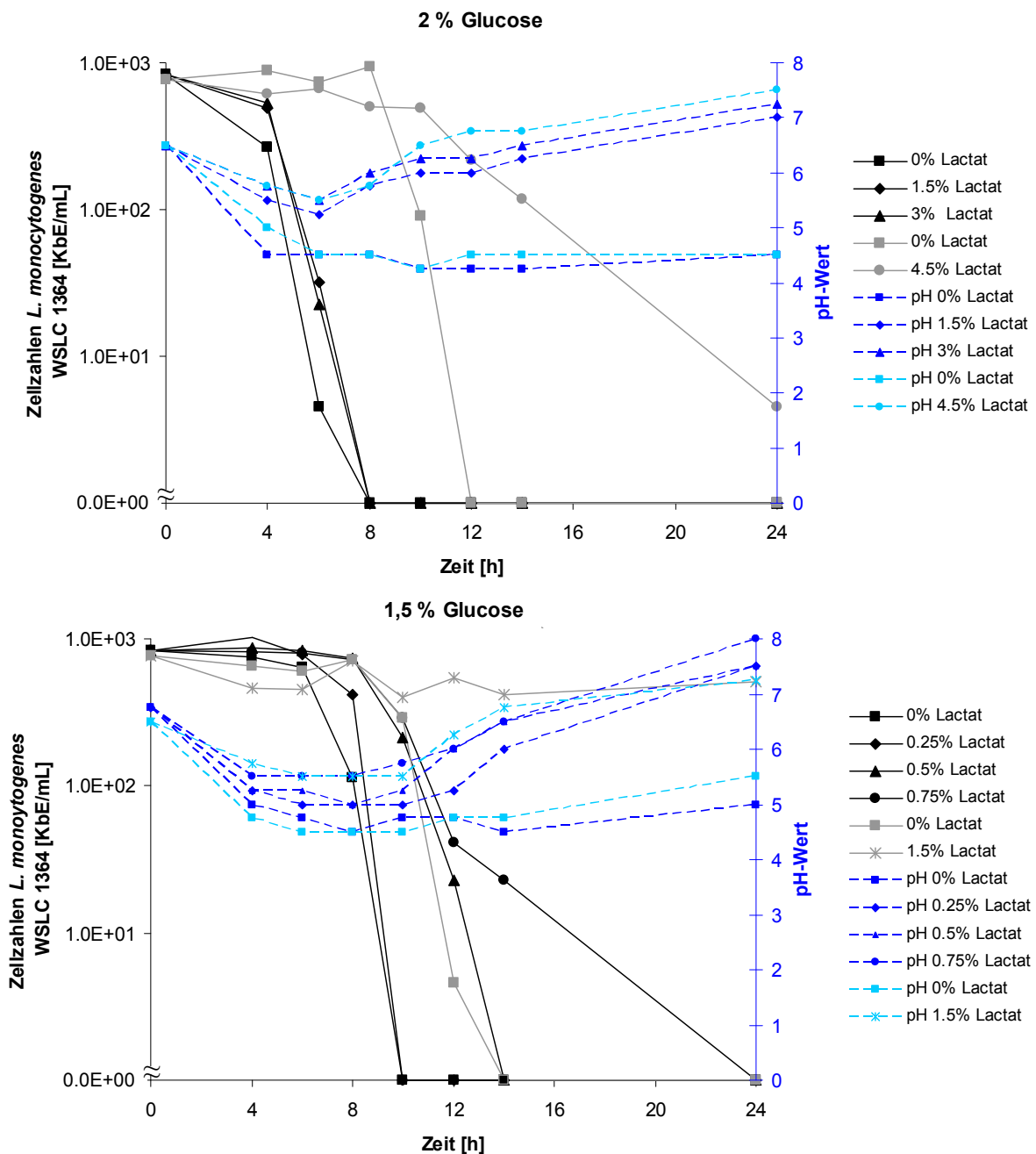


Abbildung 8. Cokultivierung des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364 mit dem Hefestamm WSYC 592 mit einem festen Glucoseanteil von 2% (oben) bzw. 1,5% (unten) und variierenden Lactatanteilen. Die Kultivierung fand über 24 h bei 27°C und 180 U/min statt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte zwischen 4 h und 14 h in 2 h-Abständen. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier Einzelerperimente. Die bestimmten Listerienzellzahlen und ermittelten pH-Werte sind in schwarz und dunkelblau (erster Versuchsdurchgang) bzw. grau und hellblau (zweiter Versuchsdurchgang) dargestellt.

ungsansatz ohne Lactat um 2,5 pH- Einheiten. Wurde die Cokultivierung mit 0,5 % Lactat durchgeführt, waren nach vierzehn Stunden Cokultivierung keine Listerien mehr auffindbar. Beim Versuchsansatz mit 0,75 % Lactat konnte erst nach 24 Stunden eine vollständige Inhibierung der Listerien festgestellt werden. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Lactatkonzentration an die der Glucose angeglichen, sodass jeweils 1,5 % der beiden C-Quellen vorhanden waren. Hier war nach 24 Stunden Cokultivierung eine Listerienzellzahl detektierbar, die minimal niedriger als der eingesetzte Titer war. Der pH-Wert lag hier nach vier Stunden Cokultivierung ca. eine Einheit über dem pH-Wert des Ansatzes ohne Lactat. Nach 24 Stunden wurde, wie bei den anderen Konzentrationen, ein Unterschied von ca. zwei pH-Einheiten festgestellt. In der zweiten Versuchsreihe (graue Kurven) war bei der Cokultivierung ohne Lactat, im Vergleich zur ersten Versuchsreihe, eine Verzögerung der Hemmung um vier Stunden festzustellen, was gegenüber früheren Versuchen unüblich war. Die Entwicklung der Listerienzellzahlen mit 2 % Glucose und 4,5 % Lactat bzw. je 1,5 % Glucose und Lactat kann demnach nicht ohne weiteres mit den anderen Ergebnissen verglichen werden. Sie dienen der Orientierung und dem Erkennen einer allgemeinen Tendenz.

Bei Verwendung der Kontrollhefe WSYC 623 blieben die Listerienzellzahlen während der Cokultivierungen bei allen getesteten Glucose-Lactat-Kombinationen mit 3×10^2 bis 8×10^2 KbE/mL im Bereich des eingesetzten Listerientiters.

Nachfolgend sind in Tabelle 7 eine Übersicht der Verwertbarkeit der oben getesteten C-Quellen, sowie ihr Einfluss auf die Hemmwirkung der *P. norvegensis* WSYC 592 gegeben.

Tabelle 7. Übersicht der Verwertbarkeit der C-Quellen und die Hemmung des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 in ihrer Gegenwart.

C-Quelle		Glucose	Fructose	Mannose	Rhamnose	di-Ammoniumhydrogen-citrat	Lactat	Pyruvat
Verwertbarkeit	<i>P. norvegensis</i> WSYC 592	+	+	+	-	+	+	-
	<i>L. monocytogenes</i> WSLC 1364	+	+	+	-	-	+	-
Hemmung der Listerien		+	+	+	-	-	-	-

3.4.3 Einfluss von Detergenzien

Im Vorfeld wurden die Hefen WSYC 592, WSYC 623 und der Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364 auf ihr Wachstum in Anwesenheit einer Auswahl von nicht-ionischen und zwitterionischen Detergenzien untersucht (Tab. 8). Die beiden Hefestämme erreichten auch in Anwesenheit der Detergenzien Zellzahlen zwischen 10^8 und 10^9 KbE/mL, was mit den Kontrollwerten (Kultivierung ohne Detergens) vergleichbar war. Nonidet P-40 vermochte in Konzentrationen von 0,5 % (v/v) und 1 % (v/v) das Listerienwachstum um ca. eine bzw. anderthalb Zehnerpotenzen zu inhibieren. Die übrigen nicht-ionischen und die beiden zwitterionischen Detergenzien beeinflussten das Listerienwachstum nicht.

Tabelle 8. Hefen- und Listerienzellzahlen [KbE/mL] nach 24 h Kultivierung mit Detergenzien in den angegebenen Konzentrationen. n.b.: nicht bestimmt.

Detergens	Konzentration [%] (v/v)	WSYC 592	WSYC 623	WSLC 1364
ohne	0	5×10^8	4×10^8	8×10^8
Brij [®] 35	0,5	7×10^8	5×10^8	n.b.
Chaps	2	4×10^8	5×10^8	1×10^8
Nonidet P-40	0,2	n.b.	n.b.	1×10^8
	0,5	3×10^8	5×10^8	7×10^7
	1	n.b.	n.b.	2×10^7
Triton [®] X-100	0,125	3×10^8	1×10^9	3×10^8
Tween [®] 20	0,02	4×10^8	4×10^8	4×10^8
Zwittergent [®] 3-08	2	5×10^8	3×10^8	3×10^8

3.4.3.1 Nicht-ionische Detergenzien

Tween[®] 20, Brij[®] 35, Triton[®]-X-100

Die drei nicht-ionischen Detergenzien Brij[®] 35, Triton[®]-X-100 und Tween[®] 20 setzten bereits bei Einsatz niedriger Konzentrationen die Hemmleistung der *P. norvegensis* WSYC 592 herab.

Den größten Effekt zeigte Tween[®] 20, das keinen Einfluss auf das Verhalten der Kontrollhefe WSYC 623 gegenüber den Listerien ausübte, wogegen schon eine geringe Mengen des Detergens (0,001 % v/v) ausreichte, um die Hemmung der Listerien durch die Hefe WSYC 592 partiell aufzuheben (Abb. 9). Bei Einsatz einer Konzentration von 0,001 % (v/v) Tween[®] 20 wuchsen die Listerien in Cokultur mit der Hefe WSYC 592 im Vergleich zum Ansatz ohne Tween[®] 20 um ca. eine Zeh-

nerpotenz höher an. Der Einsatz höherer Konzentrationen (ab 0,02 % v/v) hatte eine vollständige Aufhebung der Hemmwirkung zur Folge.

Der antilisteriellen Aktivität der *P. norvegensis* WSYC 592 wirkte Brij® 35 ab einer Konzentration von 0,01 % (w/v) entgegen. Im Hemmverhalten der Hefe WSYC 592 war ab dieser Konzentration eine deutliche Veränderung zu sehen (Abb. 9). Ab Konzentrationen von 0,05 % (w/v) war keine Hemmung durch die He-

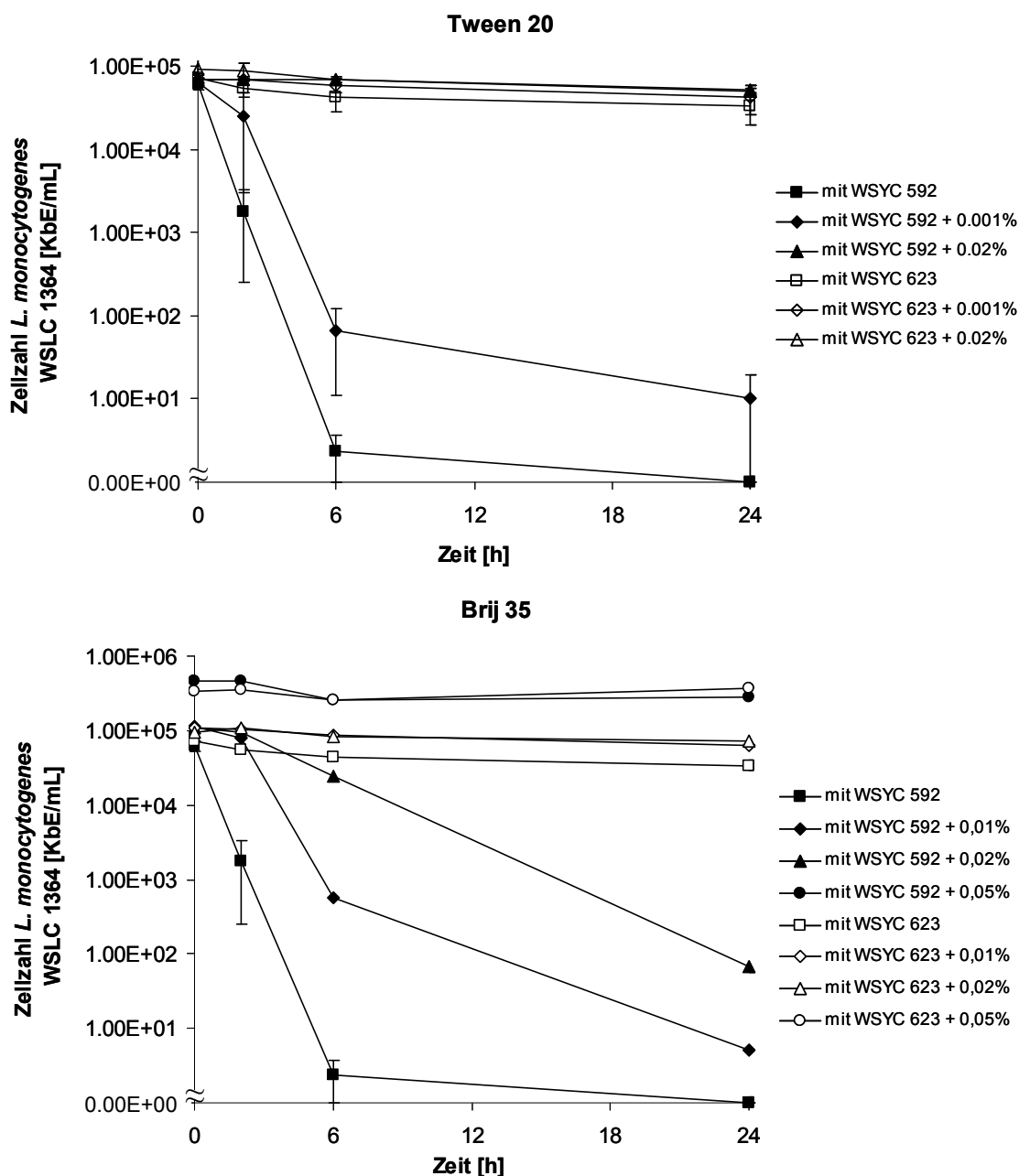


Abbildung 9. Cokultivierung des Indikatorstammes WSLC 1364 mit den Hauptkulturen der Hefen WSYC 592 und WSYC 623 in Gegenwart der nicht-ionischen Detergenzien Tween® 20 (oben) und Brij® 35 (unten). Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach 0 h, 2 h, 6 h und 24 h. Angegeben sind die Mittelwerte von zwei bis drei unabhängigen Experimenten mit Fehlerbalken.

fe WSYC 592 mehr möglich. Mit Brij[®] 35 wurde das Verhalten der Kontrollhefe WSYC 623 auf das Listerienwachstum nicht beeinflusst.

Der Einsatz von Triton[®] X-100 erforderte eine Konzentration von 0,0375 % (v/v), um eine partielle Aufhebung der Hemmwirkung zu verursachen (Abb. 10). Die vollständige Aufhebung der Hemmaktivität der *P. norvegensis* war ab einer Konzentration von 0,125 % (v/v) des Detergens zu beobachten.

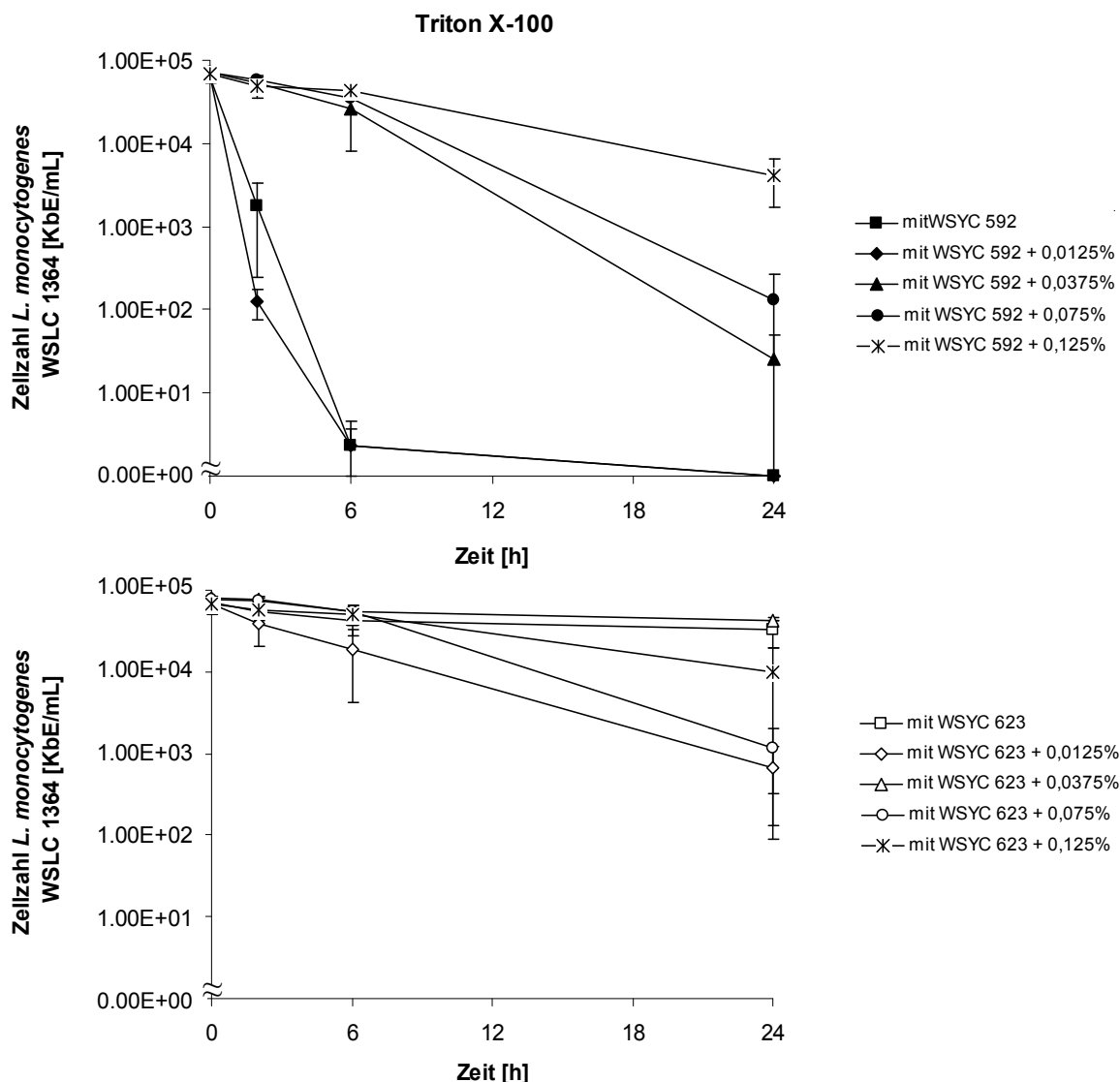


Abbildung 10. Cokultivierung des Indikatorstammes WSLC 1364 mit den Hauptkulturen der Hefen WSYC 592 (oben) und WSYC 623 (unten) in Gegenwart des nicht-ionischen Detergens Triton[®]X-100. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach 0 h, 2 h, 6 h und 24 h. Angegeben sind die Mittelwerte von zwei bis drei unabhängigen Experimenten mit Fehlerbalken.

Nonidet P-40

Das nicht-ionischen Detergens Nonidet P-40 (NP-40) wirkte toxisch auf den Indikatorstamm *L. monocytogenes* WSLC 1364. In Gegenwart von 0,5 % bzw. 1 % (v/v) NP-40 wurde die Listerienzellzahl nach 24 Stunden Kultivierung um ca. eine

halbe bzw. eine Zehnerpotenz reduziert (Tab. 8). Bei Cokultivierung des Listerie-Indikatorstammes mit der nicht-hemmenden Kontrollhefe *Pichia* sp. WSYC 623 in Gegenwart von 0,5 % (v/v) NP-40 wurde die Listerienzellzahl nach 24 Stunden um über zwei Zehnerpotenzen reduziert (Abb. 11). Aufgrund der Toxizität des NP-40 gegenüber *L. monocytogenes* WSLC 1364 konnte keine Aussage über den Einfluss dieses Detergens auf das Hemmpotential der *P. norvegensis* WSYC 592 gegeben werden.

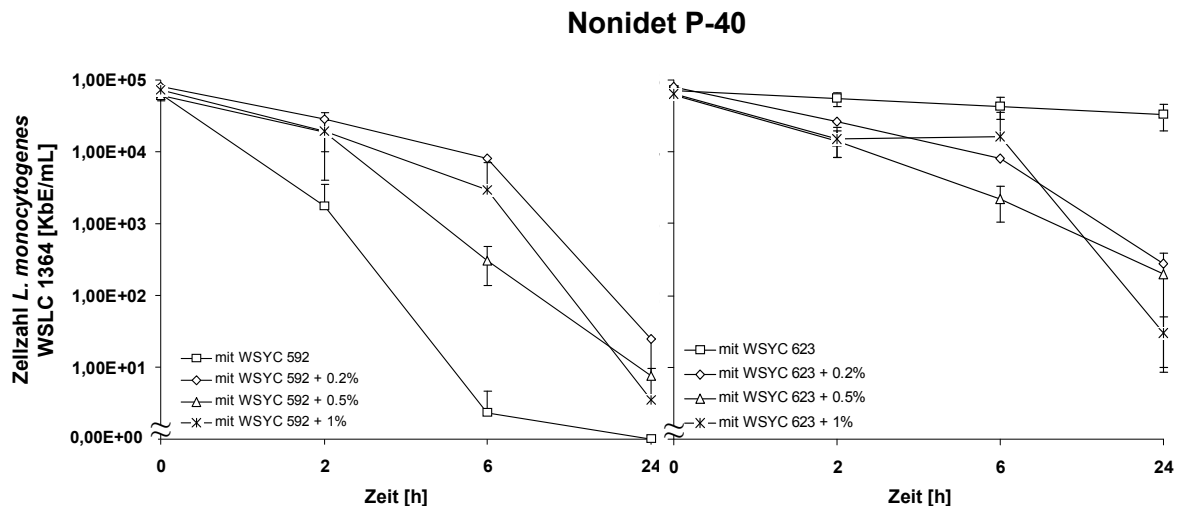


Abbildung 11. Cokultivierung des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 mit den Hauptkulturen der Hefen WSYC 592 (links) und WSYC 623 (rechts) in Gegenwart des nicht-ionischen Detergens Nonidet P-40. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach 0 h, 2 h, 6 h und 24 h. Angegeben sind die Mittelwerte von zwei bis vier unabhängigen Experimenten mit Fehlerbalken.

3.4.3.2 Zwitterionische Detergenzien

Die beiden zwitterionischen Detergenzien CHAPS und Zwittergent® 3-08 wurden jeweils in den Konzentrationen 0,5 % (v/v) und 2 % (v/v) getestet. Mit beiden Konzentrationen von CHAPS wurde die Hemmung des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 durch die Hefe WSYC 592 vollständig aufgehoben (Abb. 12 oben). Im Gegensatz dazu hatte Zwittergent® 3-08 keinen bzw. nur einen minimalen Einfluss auf das Hemmvermögen der *P. norvegensis* WSYC 592 (Abb. 12 unten). Bemerkenswert war, dass Zwittergent® 3-08 in einer Konzentration von 0,5 % (v/v) scheinbar einen stärkeren Effekt auf die Hemmleistung der Hefe WSYC 592 ausübte, als in 2 %iger Konzentration. Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden. Bei Cokultivierungen mit der Kontrollhefe WSYC 623, unter Einsatz der zwitterionischen Detergenzien in den oben angegebenen Konzentrationen, blieb die Listerienzellzahl nahezu unverändert beim eingesetzten Titer von $\sim 10^5$ KbE/mL.

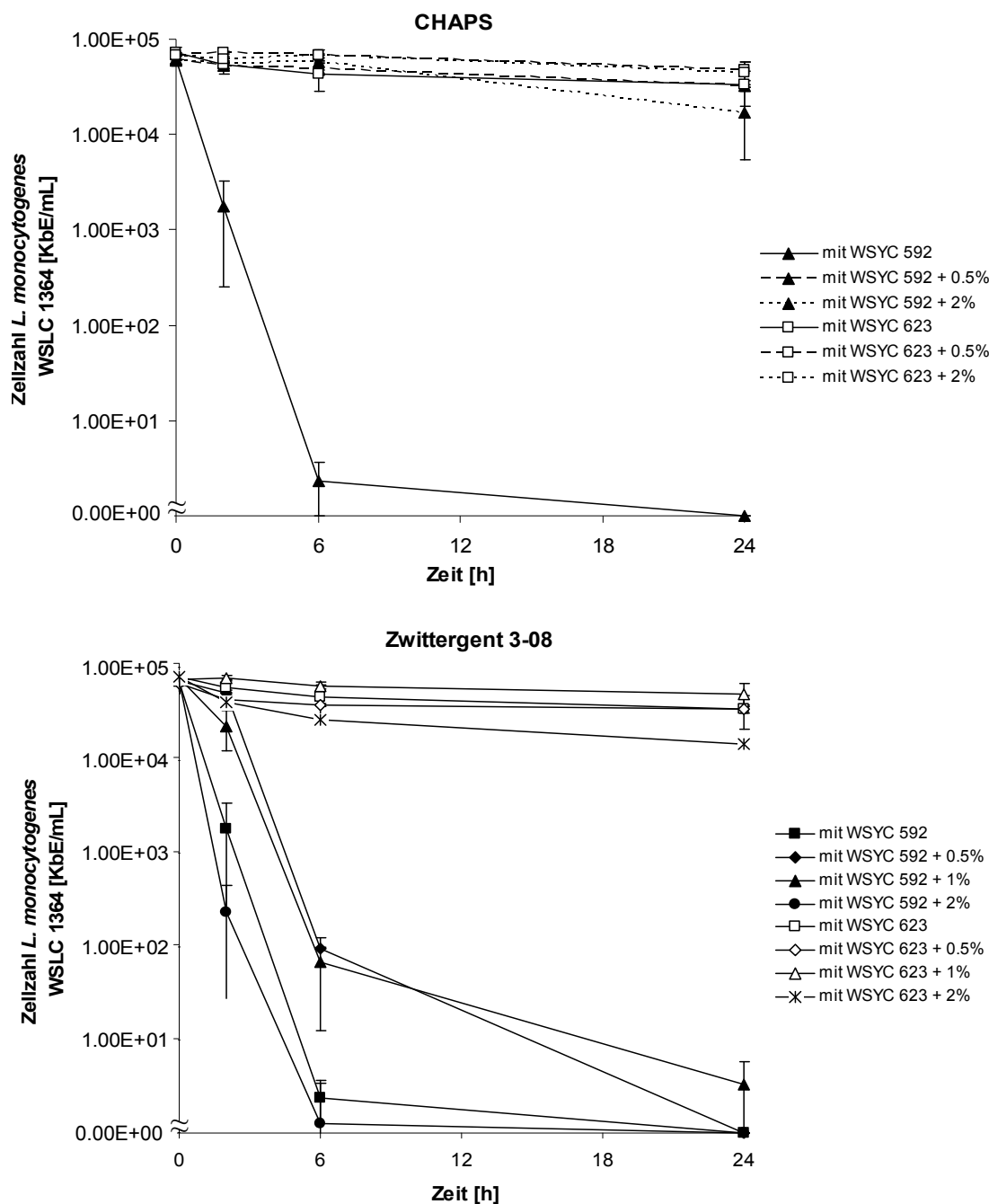


Abbildung 12. Cokultivierung des Indikatorstammes WSLC 1364 mit den Hauptkulturen der Hefen WSYC 592 und WSYC 623 in Gegenwart der zwitterionischen Detergenzien CHAPS (links) und Zwittergent® 3-08 (rechts). Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach 0 h, 2 h, 6 h und 24 h. Angegeben sind die Mittelwerte von zwei bis vier unabhängigen Experimenten mit Fehlerbalken.

3.4.3.3 Einfluss von Tween® 20 auf Hefen und Listerien

Die bisherigen Ergebnisse zeigten auf, dass einige Detergenzien einen antagonistischen Effekt auf das Hemmpotential der *P. norvegensis* WSYC 592 ausübten; das genaue Prinzip dahinter ist allerdings noch unklar. Zur Aufklärung, auf welchen der an der Cokultivierung beteiligten Organismen die Detergenzien Einfluss nehmen, wurden *L. monocytogenes* WSLC 1364, sowie die beiden Hefestämme

WSYC 592 und WSYC 623 separat in Anwesenheit von 0,05 % (v/v) Tween® 20 kultiviert. Die mehrmals mit ¼-Ringerlösung gewaschenen Hefe- bzw. Listerienzellen wurden anschließend mit standardmäßig kultivierten Hefen bzw. Listerien in Cokultivierungen eingesetzt.

Bei der Cokultivierung des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 - der in Gegenwart von Tween® 20 kultiviert wurde - mit der Hefe WSYC 592, die keinen Kontakt mit dem Detergens hatte, wurde der eingesetzte Listerientiter von $\sim 10^4$ KbE/mL bis auf $\sim 10^1$ KbE/mL reduziert (Tab. 9). In umgekehrter Kombination konnten die Listerien nicht in ihrer Zellzahl reduziert werden. Wenn beide Organismen Kontakt mit Tween® 20 hatten, so war ebenfalls keine Hemmung der Listerien mehr möglich. Tween® 20 band offenbar irreversibel an die Hefenzelloberfläche und verhinderte möglicherweise dadurch die Hemmung der Listerien.

Tabelle 9. Cokultivierungsvarianten zur Beurteilung des Einflusses von Tween® 20 auf Hefen und Listerien. Angegeben sind die Listerienzellzahlen [KbE/mL] nach 24 h Cokultivierung. Der eingesetzte Titer des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364 betrug 8×10^3 KbE/mL.

Cokultivierungsvarianten	Listerienzellzahl [KbE/mL] mit	
	WSYC 592	WSYC 623
Hefen klassisch, Listerien mit Tween® 20 kultiviert	5×10^1	1×10^4
Hefen mit Tween® 20, Listerien klassisch kultiviert	7×10^3	8×10^3
Hefen und Listerien mit Tween® 20 kultiviert	1×10^4	9×10^3

3.5 Untersuchung des Sekretoms von *P. norvegensis* WSYC 592

Die Wahl der C-Quelle kann, wie oben gezeigt, auf die Hemmwirkung der *P. norvegensis* WSYC 592 einen enormen Einfluss haben. Durch Analyse des Sekretoms der hemmenden Hefe WSYC 592 wurde versucht die Auswirkung des Lactats sichtbar zu machen.

Die Proteine im Überstand einer zehn Stunden alten Hefekultur von WSYC 592, kultiviert in Gegenwart von 2 % (w/v) Glucose oder Lactat, wurden gefällt und nach Auftrennung mit Hilfe der SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Zusätzlich wurde parallel 1 mM oder 2 mM Pefabloc (Roche) zur Kultur gegeben, um vorhandene Proteasen zu inhibieren. Beim Vergleich des Bandenmusters des SDS-Gels konnten Unterschiede zwischen den beiden C-Quellen

festgestellt werden (Abb. 13). In Gegenwart von Glucose trat knapp unter 40 kDa eine Bande auf, während bei der Kultivierung mit Lactat bei ca. 25 kDa eine Bande zu erkennen war.

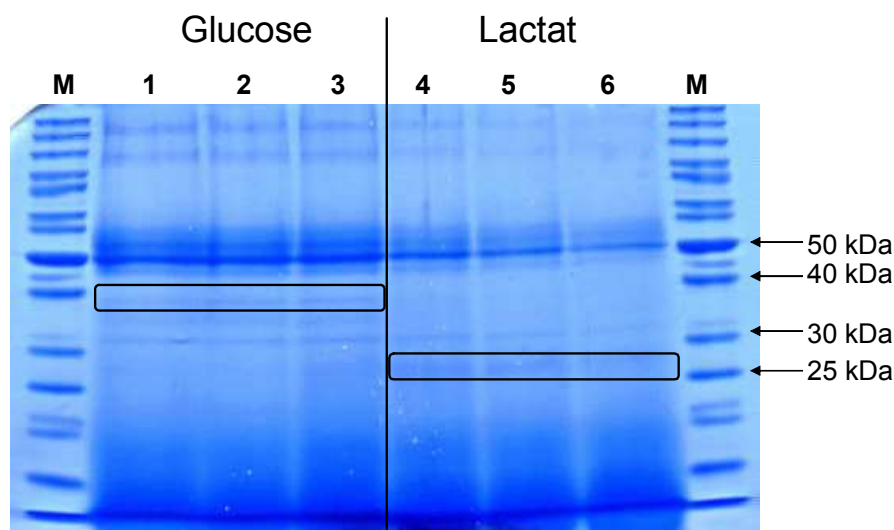


Abbildung 13. SDS-PAGE der präzipitierten Proteine im Überstand einer über zehn Stunden kultivierten Hefekultur von WSYC 592 mit Glucose (linke Hälfte) oder Lactat (rechte Hälfte) als C-Quelle. Die Hefe wurde in Abwesenheit eines Proteaseinhibitors (Spuren 1, 4), mit 1 mM Pefabloc (Spuren 2, 5) bzw. 2 mM Pefabloc (Spuren 3, 6) kultiviert. M: Größenmarker PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas). Die Größe einiger mit Pfeilen gekennzeichneten Banden ist in kDa angegeben. Eingerahmte Banden kommen nur in Anwesenheit jeweils einer der beiden C-Quellen vor.

Die Unterschiede im Sekretom der aktiven Hefe WSYC 592 bei der Kultivierung mit Glucose oder Lactat wurden durch das Auftrennen der Proteine mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese verdeutlicht. Die stark ausgeprägten Spots bei ca. 50 kDa, jeweils rechts neben den weißen Rechtecken (Abb. 14), kamen sowohl bei Kultivierung der Hefe mit Glucose, als auch mit Lactat vor. Die Spots in den weißen Rechtecken traten im Beisein des Lactat jedoch als sog. *trains* oder *train spots* hervor (Abb. 14 B). Auch die Spots bei G1 und G2, sowie L1 und L2 erschienen als *trains*. Bei der Kultivierung der Hefe WSYC 592 mit Glucose wurden im Vergleich zum Lactat mehrere Spots aufgefunden, die nur mit dieser C-Quelle auftraten (G1-G8) (Abb. 14 A). Auch im Falle des Lactat konnten drei deutlich unterschiedliche Bereiche festgestellt werden, in denen die aufgetretenen Spots für diese C-Quelle spezifisch waren (L1-L3). Die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden C-Quellen im Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abb. 13) konnten hier nicht wiedergefunden werden.

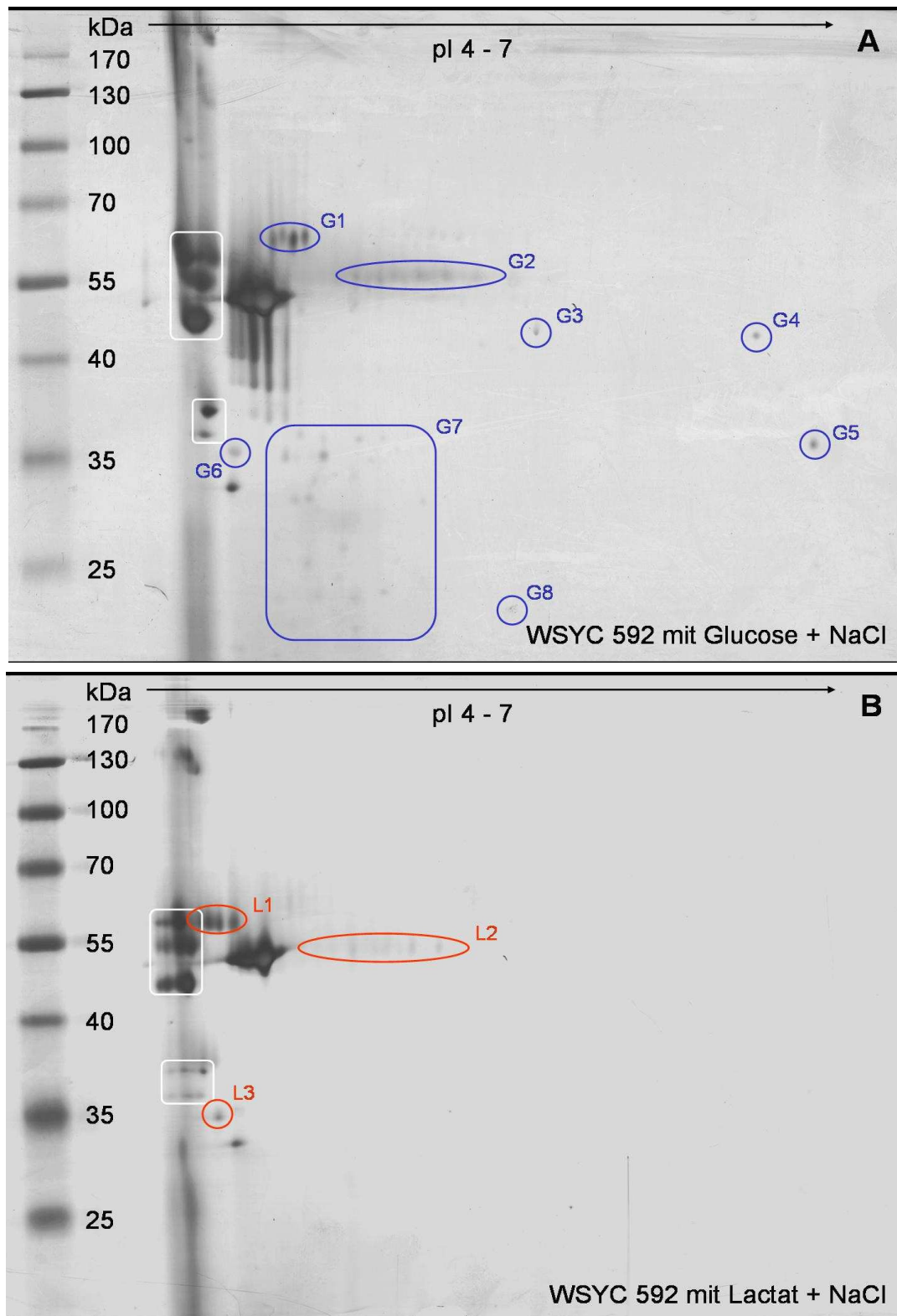


Abbildung 14. 2D-Gelelektrophorese des Sekretoms von *P. norvegensis* WSYC 592 kultiviert in Gegenwart von Glucose (A) bzw. Lactat (B) als C-Quelle. Mit Hilfe von 100mM NaCl wurden oberflächengebundene Proteine präzipitiert. Die erste Dimension fand auf immobilisierten pH-Gradienten (pH 4-7), die zweite Dimension mit Hilfe der SDS-PAGE im Ettan-System (GE Healthcare) statt. Größenstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). Die Größe der Banden ist in kDa angegeben. Blau: Nur im Beisein von Glucose auftretende Proteine. Rot: Nur im Beisein von Lactat auftretende Proteine. Weiß: Bei beiden C-Quellen auftretende Proteine. Gezeigt sind die Ergebnisse eines einzelnen Experiments.

3.6 Kultivierung von Hefen und Listerien in getrennten Kompartimenten

Eine antilisterielle Aktivität der *P. norvegensis* WSYC 592 wurde bisher auf Fest- oder in Flüssigmedium nur durch direkten Zell-Zell-Kontakt beobachtet. Es stellte sich die Frage, ob die aktive Hefe WSYC 592 eine (oder mehrere) Substanz(en) in ihre Umgebung freisetzt, die eine Inhibierung der Listerien herbeiführ(t/en). Dazu wurden die Hefen und Listerien in getrennten Kompartimenten kultiviert.

In den Wachstumsversuchen wurde der Indikatorstamm *L. monocytogenes* WSLC 1364 in Titern von 10^2 KbE/mL bzw. 10^4 KbE/mL eingesetzt. Bei Verwendung der Transwells[®] (Corning) mit 0,4 µm Porendurchmesser und des niedrigeren Listerientiters wuchs der Indikatorstamm WSLC 1364 bis auf ca. 4×10^7 KbE/mL an, wenn er sich im unteren Kompartiment und die nicht-hemmende Hefe WSYC 623 im oberen Kompartiment befand (Tab. 10). Die aktive Hefe WSYC 592 reduzierte die Listerienzellzahl in der unteren Kavität um ca. drei Zehnerpotenzen auf ca. 6×10^4 KbE/mL. Befand sich der Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364 dagegen im oberen Kompartiment und die hemmende Hefe bzw. die Kontrollhefe im unteren Kompartiment, so wurde das Listerienwachstum durch *P. norvegensis* WSYC 592, im Vergleich zum Kontrollansatz, um ca. dreieinhalb Zehnerpotenzen gesenkt. Bei Verwendung des höheren Titers (10^4 KbE/mL) wurden die Listerien im unteren Kompartiment durch den aktiven Hefestamm WSYC 592 im oberen Kompartiment, im Vergleich zur nicht-hemmenden Hefe, um anderthalb Zehnerpotenzen in ihrer Zellzahl reduziert. Ein Rückgang der Listerienzellzahl um ca. drei

Tabelle 10. Listerienzellzahlen [KbE/mL] des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364 nach 24 h Kultivierung mit der Hefe WSYC 592 bzw. WSYC 623 in getrennten Kompartimenten der Transwells[®] (Corning) mit 0,4 µm Porendurchmesser. Die eingesetzten Hefezellzahlen lagen bei 10^6 KbE/mL. Angegeben sind die Mittelwerte von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

eingesetzter Listerientiter	10^2 KbE/mL		10^4 KbE/mL	
	WSYC 592	WSYC 623	WSYC 592	WSYC 623
Listerien im unteren Komp. [KbE/mL]	$6,4 \times 10^4$	$3,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$3,8 \times 10^8$
Reduktion der Listerien im Vgl. zur nicht-hemmenden Hefe um [log/mL]	2,8		1,5	
Listerien im oberen Komp. [KbE/mL]	$4,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^7$	$5,9 \times 10^5$	$4,0 \times 10^8$
Reduktion der Listerien im Vgl. zur nicht-hemmenden Hefe um [log/mL]	3,4		2,8	

Zehnerpotenzen im Vergleich zur Kontrollhefe wurde erreicht, wenn die aktive Hefe WSYC 592 im unteren Kompartiment und die Listerien im oberen Kompartiment kultiviert wurden (Tab. 10).

Wurden Zellkultureinsätze der Firma Nunc mit 0,2 µm Porendurchmesser verwendet, so wurde, im Vergleich zu den Transwells[®] (Corning) mit 0,4 µm Porendurchmesser, eine geringere Hemmung der Listerien beobachtet. Befand sich der Kontrollhefestamm WSYC 623 im oberen Kompartiment, war der Indikatorstamm WSLC 1364 im unteren Kompartiment in der Lage von ursprünglich 10^2 KbE/mL auf 10^6 KbE/mL anzuwachsen (Tab. 11). Die aktive Hefe WSYC 592 reduzierte die Listerien im Vergleich zur Kontrollhefe um ca. eineinhalb Zehnerpotenz auf ca. 4×10^4 KbE/mL. Im umgekehrten Fall konnte im Vergleich zur Kontrollhefe eine Reduktion der Listerienzellzahl von ca. einer Zehnerpotenz erreicht werden, wenn sich der Hefestamm WSYC 592 in der unteren, der Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364 in der oberen Kavität befand. Bei Einsatz des höheren Listerientiters (10^4 KbE/mL) wurde eine Hemmwirkung von einer Zehnerpotenz beobachtet, wenn sich der Indikatorstamm WSLC 1364 im unteren Kompartiment befand. Ein Rückgang der Listerienzellzahlen um ca. eine halbe Zehnerpotenz konnte erzielt werden, wenn sich die Listerien im oberen Kompartiment befanden (Tab. 11).

Tabelle 11. Listerienzellzahlen [KbE/mL] des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364 nach 24 h Kultivierung mit der Hefe WSYC 592 bzw. WSYC 623 in getrennten Kompartimenten der Zellkultureinsätze (Nunc) mit 0,2 µm Porendurchmesser. Die eingesetzten Hefezellzahlen lagen bei durchschnittlich 10^7 KbE/mL. Angegeben sind die Mittelwerte von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

eingesetzter Listerientiter	10^2 KbE/mL		10^4 KbE/mL	
	WSYC 592	WSYC 623	WSYC 592	WSYC 623
Listerien im unteren Komp. [KbE/mL]	$4,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^7$
Reduktion der Listerien im Vgl. zur nicht-hemmenden Hefe um [log/mL]	1,4		1,1	
Listerien im oberen Komp. [KbE/mL]	$8,7 \times 10^7$	$5,4 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$
Reduktion der Listerien im Vgl. zur nicht-hemmenden Hefe um [log/mL]	0,8		0,4	

Zum Ausschluss einer Nährstoffkonkurrenz als Ursache für die Hemmung der Listerien in den Transwells - durch ein schnelleres Anwachsen der aktiven Hefe WSYC 592 im Vergleich zur Kontrollhefe WSYC 623, was ein schlechteres Listerienwachstum zur Folge hätte - wurden die beiden Hefestämme in Abwesenheit

des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 in den Transwells kultiviert und nach 0, 4, 8 und 12 Stunden die Zellzahlen bestimmt (Abb. 15). Ein unterschiedliches Anwachsen der untersuchten Hefen war zu den oben erwähnten Zeitpunkten nicht festzustellen, egal ob die Hefen in den unteren oder oberen Kavitäten kultiviert wurden. Das Ansteigen der Zellzahlen beider Hefen erfolgte über den Kultivierungszeitraum hinweg in einem gleich bleibenden Verhältnis. Eine Nährstoffkonkurrenz als Grund für die Hemmung der Listerien konnte demnach ausgeschlossen werden.

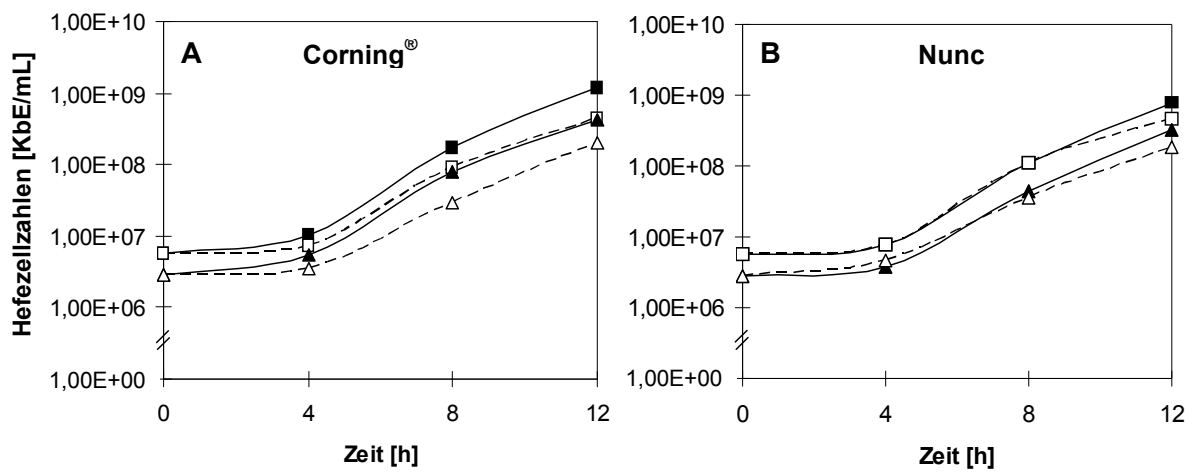


Abbildung 15. Hefezellzahlen während der Kultivierung in (A) Transwells® der Firma Corning mit 0,4 µm Porendurchmesser (B) bzw. in Zellkultureinsätzen der Firma Nunc mit 0,2 µm Porendurchmesser. Kultivierung der Hefe WSYC 592 (■,□) bzw. WSYC 623 (▲,△) fand in den oberen (volle Symbole, durchgezogene Linien) bzw. unteren Kompartimenten (leere Symbole, gestrichelte Linien) über einen Zeitraum von 12 Stunden bei 27°C und ~100 U/min statt.

Die Tatsache, dass die Listerien trotz räumlicher Trennung von der aktiven Hefe WSYC 592, im Vergleich zur nicht-hemmenden Hefe WSYC 623, um bis zu dreieinhalb Zehnerpotenzen (Transwells®, Corning) bzw. um bis zu eineinhalb Zehnerpotenzen (Zellkultureinsätze, Nunc) in ihrer Zellzahl reduziert wurden, deutete darauf hin, dass das Hemmprinzip einem Zell-Zell-Kontakt unabhängigen Mechanismus zugrunde lag.

3.7 Untersuchung der Freisetzung einer antilisteriellen Substanz in das Nährmedium

Das zuvor beschriebene Experiment machte deutlich, dass die Möglichkeit der Freisetzung einer oder mehrerer antilisterieller Substanzen in das Nährmedium durch die aktive Hefe *P. norvegensis* WSYC 592 durchaus bestand. Nachfolgende

Versuche dienten zum Ausschluss einer Bakteriozin-ähnliche Substanz oder eines Killertoxins als inhibitorisch wirkende Substanz.

3.7.1 Killertoxin-Assay

Der Hefestamm *P. norvegensis* WSYC 592 wurde auf das Vorhandensein eines Killertoxins gegen zwei Stämme derselben Spezies (*P. norvegensis* WSYC 338, WSYC 773), sowie gegen Vertreter vier nahverwandter Spezies (*P. cactophila* WSYC 364, *P. pseudocactophila* WSYC 366, *P. nakasei* WSYC 731, *P. kluyveri* WSYC 775) (32) und vier Listerienspezies (*L. monocytogenes* WSLC 1364, *L. innocua* WSLC 2339 und 2394, *L. ivanovii* WSLC 3061 und 3889, *L. seeligeri* WSLC 4550 und 41132) getestet. Keiner der getesteten Hefestämme, wie z.B. *P. pseudocactophila* WSYC 366 und *P. nakasei* WSYC 731 (Abb. 16), oder auch Listerienstämme wurde in diesem Assay durch *P. norvegensis* WSYC 592 inhibiert, womit ein Killertoxin als inhibitorisch wirkende Substanz ausgeschlossen werden konnte.

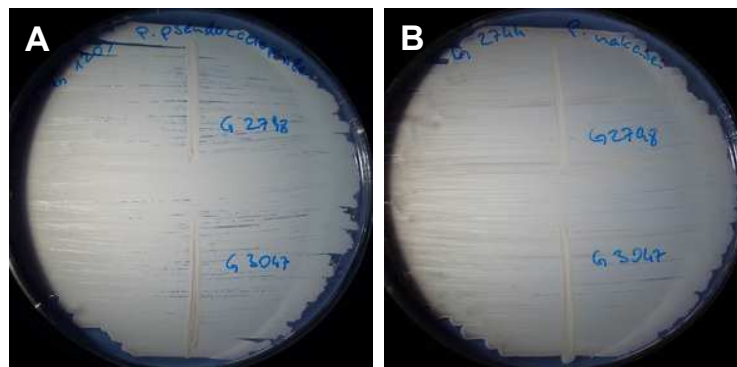


Abbildung 16. Killertoxin-Assay. Test der aktiven Hefe WSYC 592 (unterer vertikaler Strich, G3047) und der Kontrollhefe WSYC 623 (oberer vertikaler Strich, G2798) gegen die Hefestämme *P. pseudocactophila* WSYC 366 (A) (G1203) und *P. nakasei* WSYC 731 (B) (G2744).

3.7.2 Diffusionsversuche

Im Agar-Well-Diffusion-Assay bewirkten weder die Hauptkulturen der beiden Hefestämme WSYC 592 und WSYC 623, noch die aufkonzentrierten (Faktor 25 bis 30) oder nicht-aufkonzentrierten, zellfreien Hefeüberstände im Soft-Agar eine Hemmung des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364 (Abb. 17 A), so wie es bei der Positivkontrolle Pediocin Ach der Fall war (Abb. 17 C). Der Agar-Spot-Assay lieferte das gleiche Ergebnis (Abb. 17 B). Auch das gewonnene Exopolysaccharid beider Hefekulturen verursachte in diesem Assay keine Hemmung.

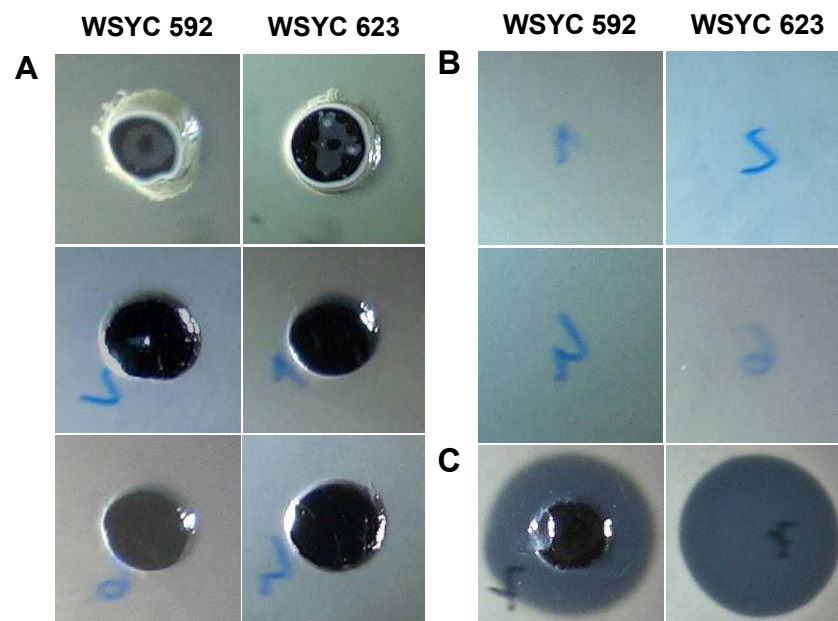


Abbildung 17. A. Agar-Well-Diffusion-Assay. Die Hefe-Hauptkulturen der beiden Stämme WSYC 592 und WSYC 623 (oben), sowie die sterilfiltrierten Kulturüberstände im nicht-aufkonzentrierten (Mitte) und aufkonzentrierten (Faktor 25-30) Zustand (unten) wurden in die ausgestanzten Vertiefungen des Soft-Agars (inokuliert mit *L. monocytogenes* WSLC 1364) pipettiert. **B. Agar-Spot-Assay.** Die sterilfiltrierten Kulturüberstände im nicht-aufkonzentrierten (oben) und aufkonzentrierten (unten) Zustand der beiden Hefestämme wurden auf die Agaroberfläche appliziert. **C. Positivkontrolle Pediocin Ach.** Kultivierung der Agarplatten fand für 24 h bei 27°C statt und wurde anschließend mittels Schräglicht ausgewertet.

Im Soft-Agar-Membran-Assay verursachten die zellfreien Kulturüberstände der beiden Hefen WSYC 592 und WSYC 623 ebenfalls keine Hemmung des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364, weder im nicht-aufkonzentrierten, noch im aufkonzentrierten Zustand. Allerdings wurde eine Aufhellung des Soft-Agars beobachtet, als die Hauptkulturen beider Hefen bzw. Aliquots einer Cokultivierung in Flüssigmedium auf die Membran aufgetropft wurden (Abb. 18 A links, Positionen 1 bis 4). Da sich sowohl bei der nicht-hemmenden Kontrollhefe WSYC 623 (Pos. 2), als auch bei der Listerien-Übernachtkultur (Pos. 5) eine Aufhellung des Agars zeigte, war von einer unspezifischen Hemmung der Listerien im Soft-Agar auszugehen.

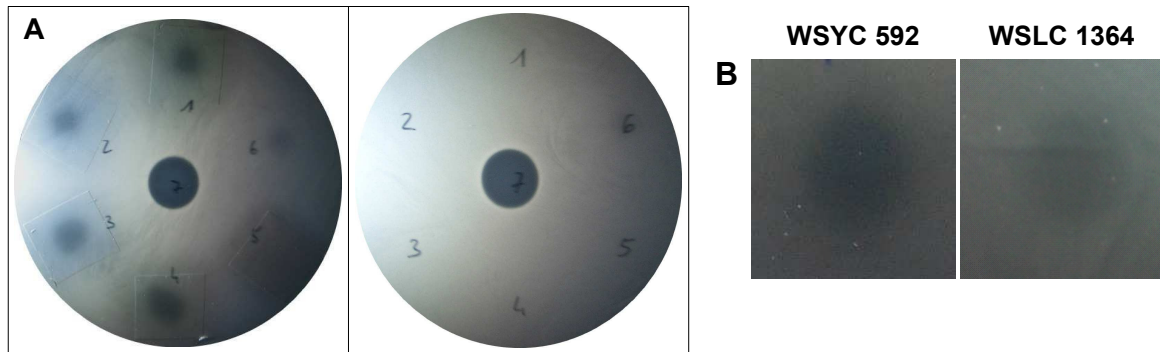


Abbildung 18. Agar-Membran-Assay. **A.** links: Cokultur (Co), Hefe- bzw. Listerienkultur wurden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetropft, die nach der Kultivierung der Agarplatten bei 27°C für 24 h wieder entfernt wurde. 1: Co WSYC 623 mit WSLC 1364, 2: WSYC 623, 3: Co WSYC 592 mit WSLC 1364, 4: WSYC 592, 5: WSLC 1364, 6: 0,05 M HCl, 7: Pediocin AcH als Kontrolle. rechts: Pipettierschema wie links. Hier wurden die sterilfiltrierten Kultur- bzw. Cokulturüberstände direkt auf die Soft-Agaroberfläche aufgetropft. **Vergrößerungsausschnitt der Positionen 4 und 5 aus Teilabbildung A links.** **B.** links: Hauptkultur der Hefe WSYC 592. rechts: Übernachtkultur *L. monocytogenes* WSLC 1364. Die visuelle Auswertung erfolgte mittels Schräglicht.

3.7.3 Cokultivierung der Kultur- und Cokulturüberstände mit *L. monocytogenes*

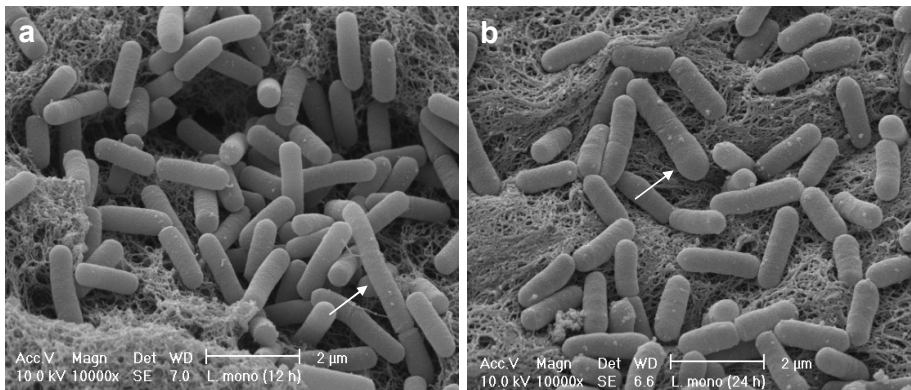
WSLC 1364

Anders als bei den Soft-Agar-Assays wurde hier ein Listerientiter von $\sim 10^3$ bzw. 10^4 KbE/mL des Indikatorstammes WSLC 1364 direkt zum Kulturüberstand der Hefen WSYC 592 oder WSYC 623 gegeben und die Listerienzellzahl nach einer Kultivierung über 24 Stunden bestimmt. Die Kulturüberstände der Hefen wurden entweder sterilfiltriert oder nur abzentrifugiert, damit eventuell vorhandene antilisterielle Substanzen nicht im Filtermaterial verblieben. Die Überprüfung des antilisteriellen Potentials der Kulturüberstände beider Hefen und der Überstände von Cokulturen der Hefen WSYC 592 und WSYC 623 mit *L. monocytogenes* WSLC 1364 fiel negativ aus. Die Überstände konnten keine Inhibierung der Listerien herbeiführen.

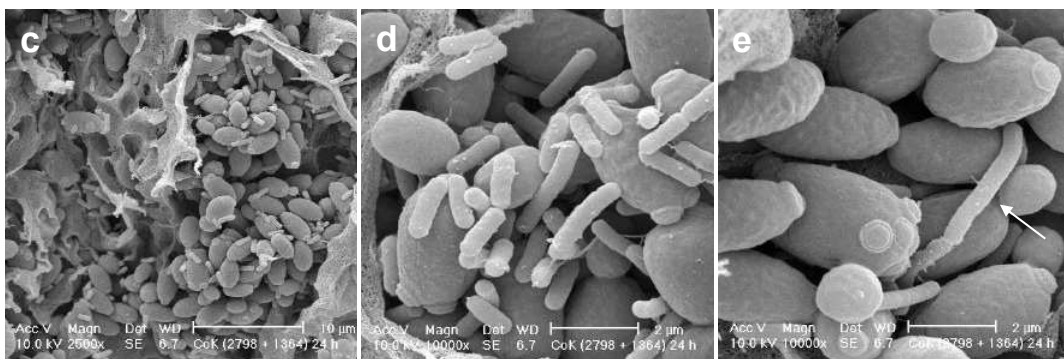
3.8 Rasterelektronenmikroskop (REM)-Analyse der Cokultivierung auf Festmedium

Das Wirkprinzip der antilisteriellen *P. norvegensis* WSYC 592 konnte mit den bisherigen Experimenten nicht eindeutig geklärt werden. Es bestand die Hoffnung, dem Wirkprinzip durch Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen von Cokultivierungen auf Festmedium näher zu kommen. Hierzu wurden von Cokultivierungen des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364 mit der aktiven Hefe WSYC 592 bzw. der Kontrollhefe WSYC 623 nach 12, 18 und 24 Stunden Proben entnommen und im REM analysiert (Abb. 19).

WSLC 1364



WSYC 623 + WSLC 1364 - 24 h



WSYC 592 + WSLC 1364 - 24 h

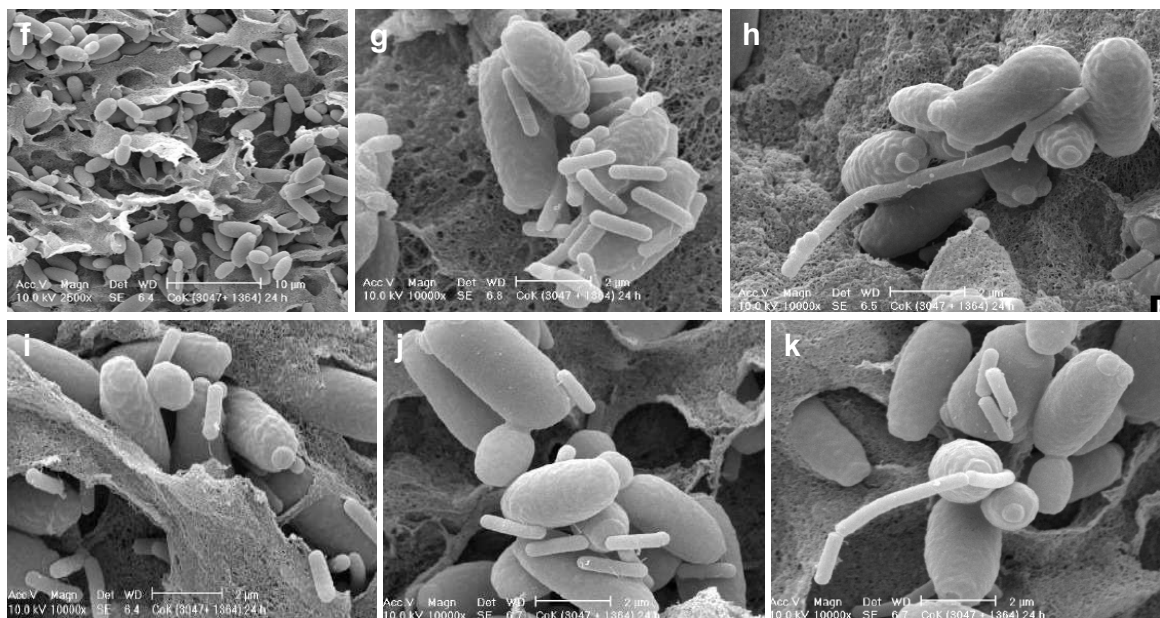


Abbildung 19. REM-Aufnahmen von Hefen und Listerien bei Cokultivierung auf Festmedium. Kultivierung des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364 auf Festmedium ohne Hefen über 12 h (a) bzw. 24 h (b). Cokultivierung des Indikatorstammes WSLC 1364 mit der Kontrollhefe WSYC 623 (c-e) bzw. der hemmenden Hefe WSYC 592 (f-k) über 24 h. Pfeile markieren markante Listerienzellen. Der Vergrößerungsfaktor betrug 10.000x, mit Ausnahme der Bilder c und f, die mit 2.500-facher Vergrößerung aufgenommen wurden.

Bei 2.500-facher Vergrößerung ließen sich Konsortien aus Hefen- und Listerienzellen gut erkennen (Abb. 19 c, d). Nach 24 Stunden Cokultivierung in Anwesenheit der nicht-hemmenden Kontrollhefe WSYC 623 waren ungefähr genauso viele Listerien- wie Hefezellen vorhanden. Die Listerienzellen zeigten keine auffällige Zellmorphologie. Erkennbar waren zwar einzelne Listerienzellen, die länger als normale Listerien waren (Abb. 19 e), doch eine ähnliche Zellmorphologie war ebenfalls bei der Kultivierung des Listerien-Indikatorstammes allein zu beobachten (Abb. 19 a). Hier war nicht von einer Einflussnahme der Kontrollhefe auf die Listerienzellen auszugehen.

Im Unterschied zur Cokultivierung mit der nicht-hemmenden Kontrollhefe WSYC 623, bei der nach 24 Stunden ein Verhältnis der Hefe- zu Listerienzellen von 1:1 festzustellen war, zeigten sich in Anwesenheit der hemmenden Hefe WSYC 592 nach 24 Stunden ca. fünfmal weniger Listerien- als Hefezellen, doch sahen die Listerienzellen intakt aus. Auch in Gegenwart der aktiven Hefe WSYC 592 waren sehr lange Listerienzellen erkennbar, die sich nach der Vermehrung nicht getrennt hatten (Abb. 19 h, k). Im Vergleich zu den Aufnahmen in Anwesenheit der Kontrollhefe WSYC 623 fielen bei der Cokultivierung mit der hemmenden Hefe WSYC 592 zwar vermehrt lange Listerienzellen auf, jedoch stellten hier die morphologisch veränderten Listerienzellen weniger als 1 % der gesamten Listerienzellen dar. Vereinzelt waren Zellreste vorzufinden, die möglicherweise vom Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364 stammten (Abb. 20), jedoch gaben diese einzelnen Funde keine allgemeine Tendenz wieder. Außer den Zellresten in Abbildung 20 waren keine Hinweise auf beschädigte oder aufgebrochene Listerienzellen zu finden.

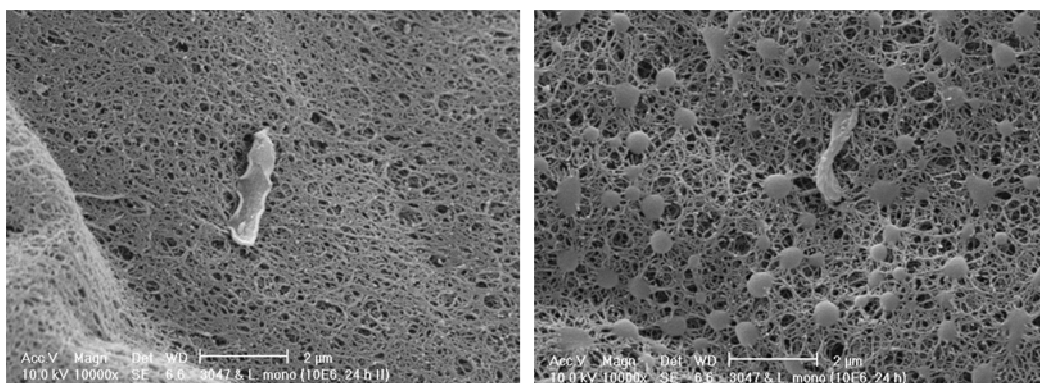


Abbildung 20. REM-Aufnahmen von Zellüberresten bei Cokultivierungen auf Festmedium, die möglicherweise von *L. monocytogenes* WSLC 1364 stammten.

In einigen Präparaten befanden sich auf der Hefenzelloberfläche globuläre Vesikel (Abb. 21 c-e). Bei diesen Strukturen handelte es sich nicht um Knospungen oder Knospungsnarben, die an den terminalen Enden der Hefezellen vorkamen (Abb. 21 a, b). Die Vesikel konnten auch auf den Listerienzellen und der Agaroberfläche wiedergefunden werden (Abb. 21 f). Bei den Vesikeln könnte es sich möglicherweise um sekretorische Vesikel der Hefen handeln, in denen *P. norvegensis* WSYC 592 die antilisteriell wirksame(n) Substanz(en) nach außen transportiert. Die Überprüfung dieser Hypothese ging jedoch über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinaus.

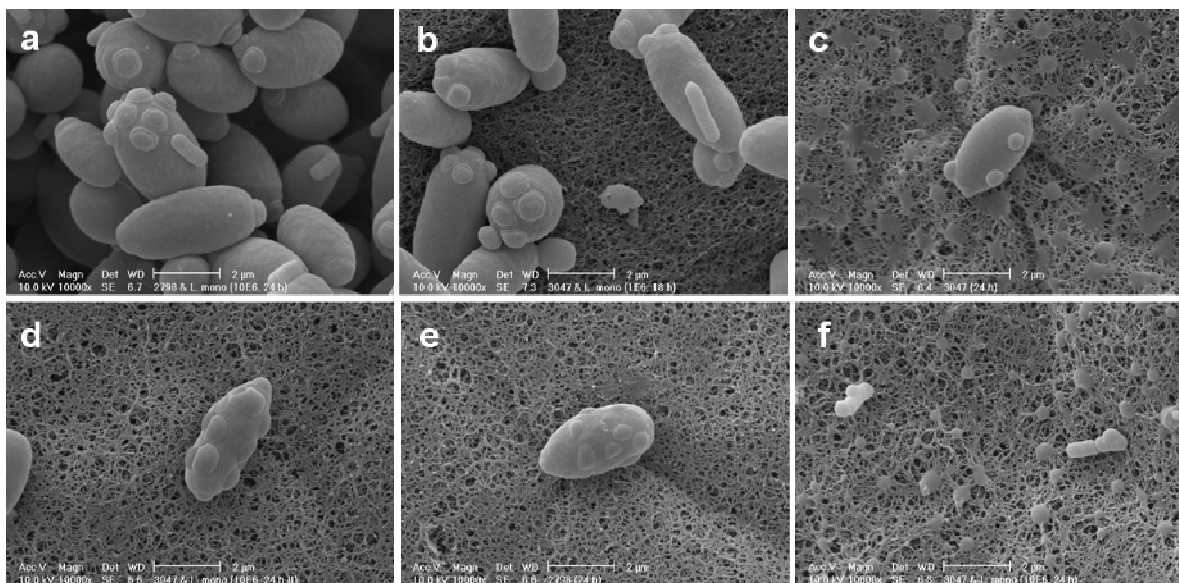


Abbildung 21. REM-Aufnahmen ungewöhnlicher Zellstrukturen. Knospungsnarben bei der Kontrollhefe WSYC 623 (a) und der hemmenden Hefe WSYC 592 (b). Globuläre Vesikel auf der Oberfläche der Hefen- (c-e) und Listerienzellen (f), sowie in deren Umgebung.

Mit Hilfe der REM-Aufnahmen konnte ausgeschlossen werden, dass die Ursache für das Absterben der Listerien auf sich nicht mehr teilende Listerienzellen zurück zu führen war. Ebenfalls auszuschließen war eine Zellyse als Ursache für das Zellsterben.

3.9 Überprüfung der Zellyse als mögliche Ursache der Hemmung

Folgend wurde der Aspekt einer lytischen Wirkungsweise der *P. norvegensis* WSYC 592 genauer untersucht, da die REM-Aufnahmen keine Anzeichen für eine Zellyse der Listerienzellen ergaben.

Während Cokultivierungen des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 (eingesetzter Titer $\sim 10^7$ KbE/mL) in Flüssigkulturen der aktiven Hefe WSYC 592 ($\sim 10^9$ KbE/mL) über 24 Stunden wurde die Listerien-Gesamtkeimzahl mittels Thoma-

Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm, Brand GmbH & Co. KG) und die Lebendkeimzahl der Listerien mittels Plattieren auf Oxford-*Listeria*-Selektivagar (Sifin) ermittelt (Abb. 22). Im Verlauf der ersten acht Stunden der Cokultivierung wurde sichtbar, wie die Lebendkeimzahl des Indikatorstammes um fünfeinhalb Zehnerpotenz auf ca. 2×10^1 KbE/mL abnahm und die Listerien-Gesamtkeimzahl auf dem ursprünglichen Niveau von $\sim 10^7$ KbE/mL blieb. Nach 24 Stunden Cokultivierung waren mittels Plattieren keine Listerien mehr nachweisbar. Die Zellyse konnte deshalb als Grund für das Absterben der Listerienzellen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

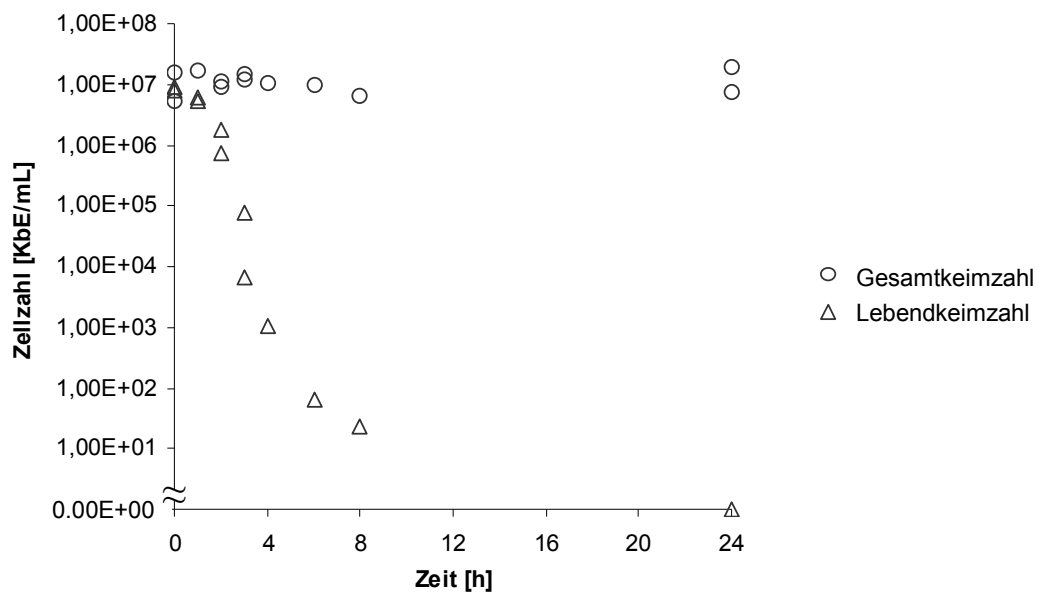


Abbildung 22. Gesamt- und Lebendkeimzahlen des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364 [KbE/mL] während Cokultivierungen mit der Hefekultur des Stammes WSYC 592. Die Zellzahlbestimmung fand über einen Zeitraum von 24 h per Thoma-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm) (\circ , Gesamtkeimzahl) und Oberflächenausstrichverfahren (Δ , Lebendkeimzahl) statt. Dargestellt sind die Werte von ein bis zwei unabhängigen Experimenten.

***Staphylococcus equorum* WS 4524**

Im folgenden Abschnitt wird auf die Ergebnisse und Erkenntnisse eingegangen, die mit dem antilisteriellen *St. equorum*-Stamm WS 4524 erzielt worden sind.

3.10 Molekularbiologische Untersuchungen

3.10.1 Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA)

Zur Bestätigung der Bakterienspezies diente die ARDRA. Die genomische DNS der *St. equorum*-Stämme WS 4524, WS 2733, WS 4523, WS 4525 wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XmnI verdaut und die entstandenen Fragmente per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Alle vier Stämme konnten anhand dieses Fragmentmusters als Spezies *St. equorum* identifiziert bzw. bestätigt werden (Abb. 23).

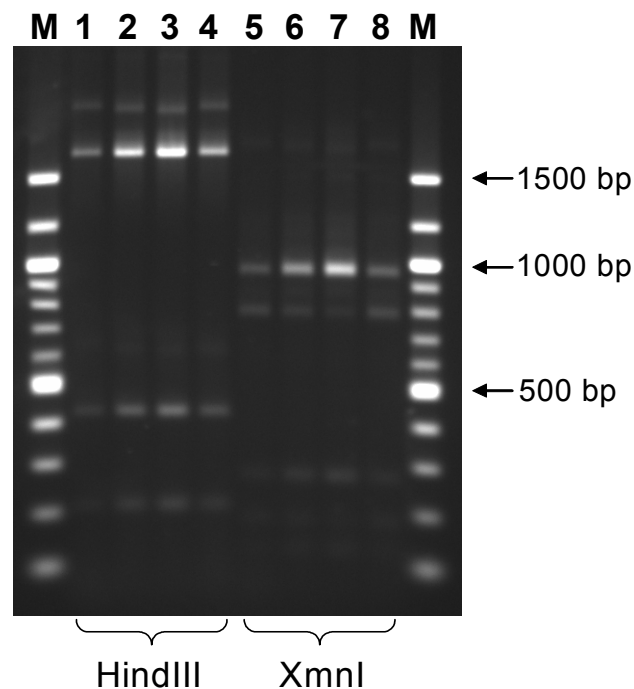


Abbildung 23. ARDRA. Die genomische DNS der vier *St. equorum* Stämme WS 2733 (Spuren 1 und 5), WS 4524 (Spuren 2 und 6), WS 4554 (Spuren 3 und 7), WS 4525 (Spuren 4 und 8) wurden jeweils mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XmnI verdaut und die Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. M: Größenmarker 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs). bp: Basenpaare.

3.10.2 Nachweis eines Peptidsynthetasegens mittels PCR

Der Micrococcin P₁ produzierende Stamm *St. equorum* WS 2733, sowie andere Peptidantibiotika produzierende Spezies, wie *Bacillus brevis* (Gramicidin S), *Bacillus licheniformis* (Bacitracin) oder *Penicillium chrysogenum* (ACV-Tripeptid), besitzen hoch konservierte Genregionen (127), die für nicht-ribosomale Peptidsynthe-

tasen kodieren. Mit der Amplifikation eines Genfragments von ~740 bp zwischen den konservierten Kernmotiven YTSGTTGxPKG und LxRTGD (38), unter Zuhilfenahme degenerierter Oligonukleotidprimer, konnte das Vorhandensein eines Peptidsynthetasegens nachgewiesen werden. Die Abbildung 24 zeigt, dass mit der genomischen DNS des *St. equorum*-Stammes WS 4524 ein ca. 740 bp langes Fragment amplifiziert werden konnte. Bei der Negativkontrolle, bei der keine DNS in der PCR zum Einsatz kam, als auch bei der Insertionsmutante WSGMO 2733 mic^- und dem Stamm WS 4523, die beide keine inhibitorische Substanz produzieren, waren keine PCR-Produkte feststellbar (Abb. 24, links).

Die direkte Sequenzierung des PCR-Produktes ergab eine Sequenz von 655 bp (Anhang A). Der Sequenzvergleich auf Nukleotid- (BlastN) und Aminosäurenebene (BlastX) ergab eine Homologie von 98 % (Anhang B) zum Micrococцин P₁-Peptidsynthetasegen (GenBank, Zugangsnummer AF183902). Demnach wäre der Stamm WS 4524 ebenfalls in der Lage das Micrococцин P₁ zu produzieren.

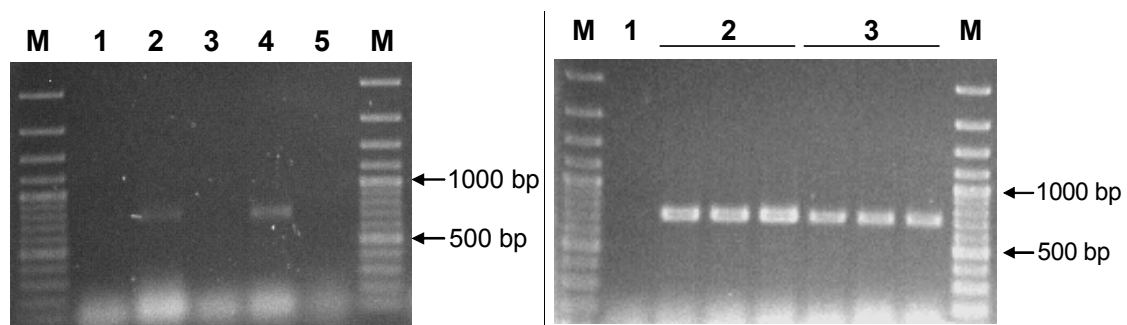


Abbildung 24. Amplifikation eines Fragments eines Peptidsynthetasegens. links: Spur 1: Negativkontrolle ohne DNS, Spur 2: WS 2733, Spur 3: WSGMO 2733 mic^- , Spur 4: WS 4524, Spur 5: WS 4523. rechts: Spur 1: Negativkontrolle ohne DNS, Spuren 2: WS 2733, Spuren 3: WS 4524. M: Größenmarker GeneRuler 100 bp Plus DNS Ladder (Fermentas). bp: Basenpaare.

3.10.3 Pulsfeldgelelektrophorese

Zur Differenzierung der beiden *St. equorum*-Stämme WS 4524 und WS 2733, sowie drei weiterer *St. equorum*- und zweier *St. aureus*-Stämme, wurde die genomische DNS mit der Restriktionsendonuklease SmaI verdaut, mittels PFGE aufgetrennt und sichtbar gemacht (Abb. 25). Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm WS 4524 und der Micrococцин P₁ produzierende Stamm WS 2733 unterschieden sich deutlich in ihrem Bandenmuster (Spuren 1 und 2), sodass ausgeschlossen werden konnte, dass es sich um ein und denselben Stamm handelte. Die restlichen drei *St. equorum*-Stämme (Spuren 3-5), die keine antilisterielle Aktivität aufwiesen (siehe unten), unterschieden sich untereinander, wie auch von den aktiven

Stämmen WS 4524 und WS 2733. Deutlich weniger Banden waren im Vergleich zu den beiden aktiven Stämmen nach dem Verdau der genomischen DNS der beiden *St. aureus* Stämme WS 2609 und WS 2612 zu sehen (Spuren 6 und 7).

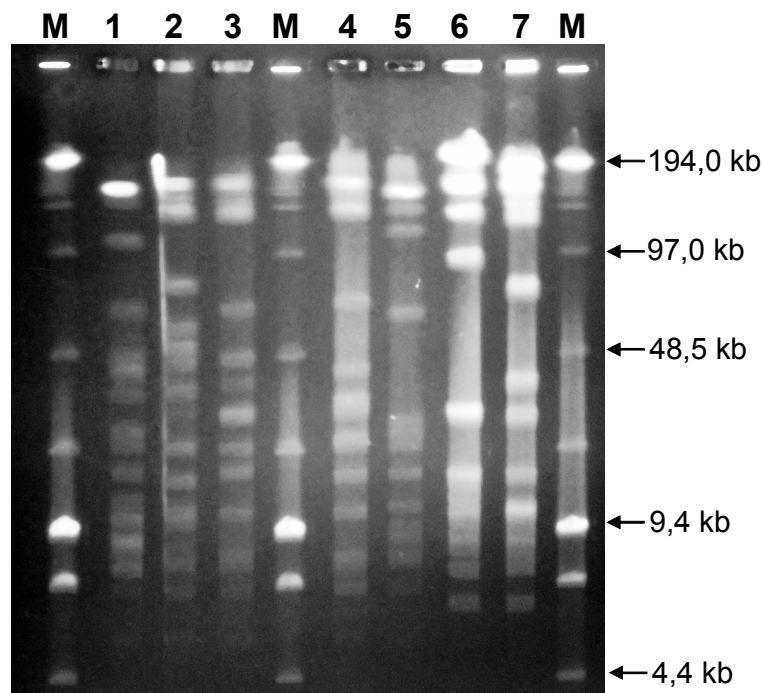


Abbildung 25. PFGE. Die genomische DNS der fünf *St. equorum*-Stämme WS 2733 (Spur 1), WS 4524 (Spur 2), WS 4554 (Spur 3), WS 4523 (Spur 4), WS 4525 (Spur 5) und der beiden *St. aureus*-Stämme WS 2609, WS 2612 (Spuren 6 und 7) wurden mit der Restriktionsendonuklease SmaI verdaut und die Fragmente mittels PFGE aufgetrennt. M: Low Range PFG Marker (New England Biolabs). kb: Kilobasen.

3.11 Antilisterielle Aktivität, Stabilität des unaufgereinigten Hemmstoffes von *St. equorum* WS 4524 und die Sensitivität der *Listerien-Indikatorstämme*

3.11.1 Bestimmung der antilisteriellen Aktivität

Die Aktivität des aufkonzentrierten und gefriergetrockneten Kulturüberstands des Stammes WS 4524 wurde unter Verwendung von drei *Listerien*spezies mittels Agar-Spot-Assay bestimmt (Abb. 26). Der *L. ivanovii*-Stamm WSLC 3061 reagierte am sensitivsten auf den 1 %ig (w/v) angesetzten unaufgereinigten Hemmstoff; hier wurde eine Aktivität von 6.400 AU erreicht. Beim Stamm *L. innocua* WSLC 2339 wurde mit 3.200 AU eine halb so hohe Aktivität erzielt. Am insensitivsten reagierte der *L. monocytogenes*-Stamm WSLC 1364. Hier konnte lediglich eine Aktivität von 800 AU beobachtet werden.



Abbildung 26. Aktivitätsbestimmung mittels Agar-Spot-Assay des unaufgereinigten Hemmstoffes von *St. equorum* WS 4524 mit den Indikatorstämmen *L. monocytogenes* WSLC 1364, *L. innocua* WSLC 2339 und *L. ivanovii* WSLC 3061. Getestete Verdünnungsstufen des Hemmstoffes: von oben, gegen den Uhrzeigersinn laufend: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. Bei WSLC 1364 und WSLC 2339 wurde in der Mitte der Soft-Agarplatte Pediocin AcH als Positivkontrolle aufgetropft. Bei WSLC 3061 wurde in die Mitte die Verdünnungsstufe 1:128 des Hemmstoffes aufgetropft. Die Inkubation der Platten fand bei 30°C für 24 h statt, die anschließende Auswertung erfolgte mittels Schräglicht.

3.11.2 Sensitivität der Listerien-Indikatorstämmen gegenüber dem Hemmstoff

Der unaufgereinigte Hemmstoff des Stammes WS 4524 war am wirksamsten gegenüber *L. ivanovii* WSLC 3061, gefolgt von den beiden *L. innocua*-Stämmen WSLC 2339 und WSLC 2394 (Abb. 27). Am unwirksamsten war der unaufgereinigte Hemmstoff gegenüber *L. monocytogenes* WSLC 1364. Die Sensitivität der Indikatorstämmen war an der Trübung und den Durchmessern der Hemmzonen abzulesen.

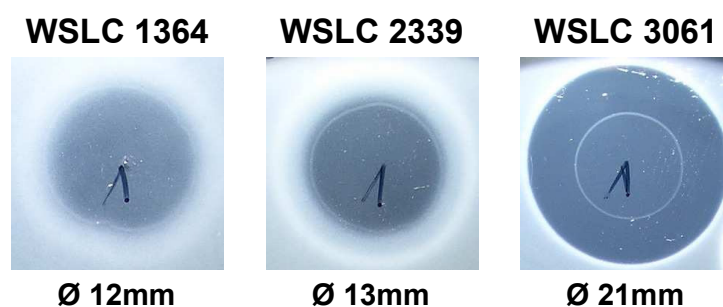


Abbildung 27. Sensitivität der Indikatorstämmen *L. monocytogenes* WSLC 1364, *L. innocua* WSLC 2339 und *L. ivanovii* WSLC 3061 gegenüber dem unaufgereinigten Hemmstoff von *St. equorum* WS 4524. Nach dem Auftropfen des Hemmstoffes (je 1 % w/v) wurden die Soft-Agarplatten für 24 h bei 30°C bebrütet und anschließend mittels Schräglicht ausgewertet. Der Durchmesser der Hemmzonen ist unterhalb der Teilabbildungen in mm angegeben. Die handgeschriebenen Ziffern dienen der Codierung und haben hier keinerlei Bedeutung.

3.11.3 Stabilität und biochemische Eigenschaften

Temperatureinfluss

Der in MilliQ-Wasser gelöste Hemmstoff (1 % w/v) lagerte über einen Zeitraum von 14 Tagen bei -20°C, 4°C oder Raumtemperatur. Anschließend wurde die Aktivität mittels Agar-Spot- bzw. Agar-Well-Diffusion-Assay überprüft (Abb. 28). Zur Aktivitätsbestimmung kam in der jeweils linken Hälfte jeder Teilabbildung (Abb. 28) der bei entsprechender Temperatur gelagerte Hemmstoff und in der rechten Teilabbildung der frisch angesetzte Hemmstoff zum Einsatz. Beim Vergleich der Durchmesser der Hemmzonen und der Stärke der Hemmung war kein merklicher Aktivitätsverlust feststellbar. Die niedrigen Temperaturen, sowie die lange Lagerungszeit beeinträchtigten die Aktivität des Hemmstoffes nicht.

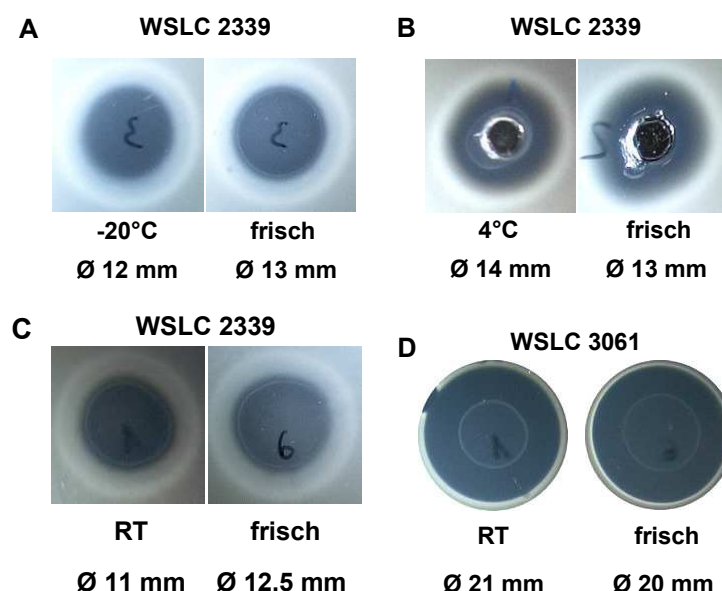


Abbildung 28. Aktivität des unaufgereinigten Hemmstoffes (1 %w/v) von *St. equorum* WS 4524 nach Lagerung bei -20°C (A), 4°C (B) und RT (C, D) für 14 Tage. In der jeweils linken Teilabbildung wurde der bei angegebener Temperatur gelagerte Hemmstoff auf seine Hemmaktivität überprüft; auf der jeweils rechten Teilabbildung der frisch angesetzte Hemmstoff. Der Durchmesser der Hemmzonen ist jeweils unter den Abbildungen in mm angegeben. Als Indikatorstamm diente *L. innocua* WSLC 2339, bei RT noch zusätzlich der Stamm *L. ivanovii* WSLC 3061. Die Soft-Agarplatten wurden für 24 h bei 30°C inkubiert und anschließend mit Hilfe von Schräglicht ausgewertet. Die handgeschriebenen Ziffern dienten der Codierung und haben hier keine Bedeutung.

Der für eine Stunde bei 90°C erhitzte Hemmstoff zeigte bei den Listerien-Indikatorstämmen WSLC 1364 und WSLC 2339 eine verminderte Wirkung (Abb. 29), um bei weiterer Temperatursteigerung gänzlich inaktiviert zu werden. Im Gegensatz zum sensitivsten Indikatorstamm WSLC 3061, der auch nach dem Erhitzen der aktiven Substanz bei 120°C eine deutliche Inhibierung erkennen ließ. Zwar nahm der Durchmesser der Hemmzone bei Steigerung der Temperatur ab,

doch blieb die Hemmzone auch nach der Hitzeeinwirkung klar und durchscheinend, so wie beim unbehandelten Hemmstoff.

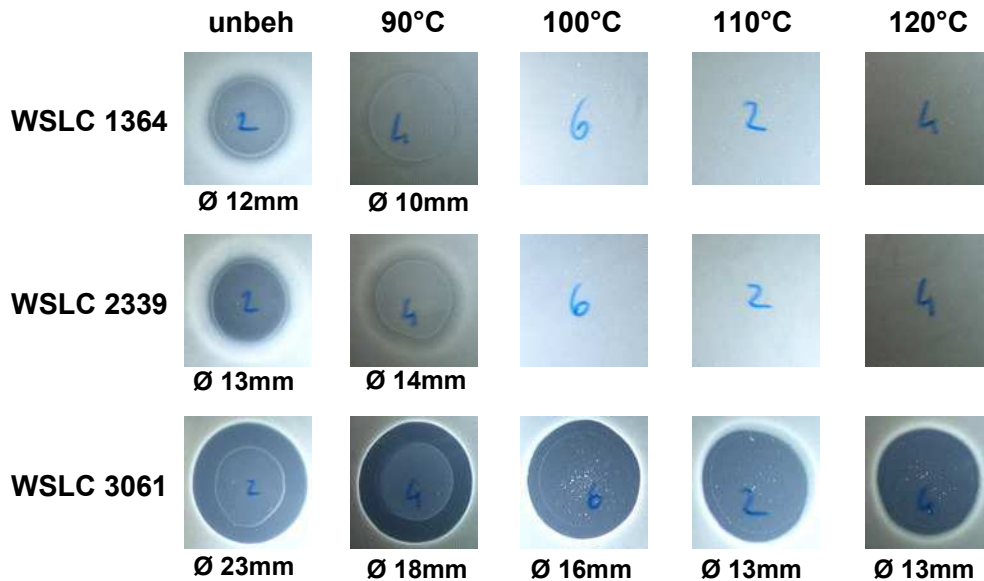


Abbildung 29. Auswirkung unterschiedlicher Temperaturen auf die Aktivität des unaufgereinigten Hemmstoffes. Verwendet wurden die Indikatorstämme *L. monocytogenes* WSLC 1364, *L. innocua* WSLC 2339 und *L. ivanovii* WSLC 3061. Der Hemmstoff (1 % w/v) wurde für 60 min bei 90°C, 100°C, 110°C oder 120°C erhitzt und mittels Agar-Spot-Assay auf seine Hemmaktivität getestet. Die Soft-Agarplatten wurden für 24 h bei 30°C bebrütet und anschließend mittels Schräglicht ausgewertet. Der Durchmesser der Hemmzone ist unterhalb des Bildes in mm angegeben. unbeh.: Der Hemmstoff kam unbehandelt zum Einsatz. Die handgeschriebenen Ziffern dienen der Codierung und haben hier keine Bedeutung.

Proteolytische Enzyme

Der unaufgereinigte Hemmstoff von *St. equorum* WS 4524 blieb nach der Inkubation mit Proteinase K (50 µg/µL) und Trypsin (250 µg/µL) weiterhin aktiv. Bei Verwendung des Indikatorstammes WSLC 2339 war aufgrund der Trübung innerhalb der Hemmzone eine leichte Aktivitätsabnahme sichtbar (Abb. 30). Diente der Stamm WSLC 3061 als Indikator, so war nach Inkubation des Hemmstoffes mit 250 µg/µL Trypsin zwar eine kleinere Hemmzone, aber immernoch eine vollständige Aufklärung des Soft-Agars zu erkennen. Die Enzymlösungen selbst hatten keinen inhibitorischen Einfluss. Ein Protein als inhibitorische Substanz konnte ausgeschlossen werden.

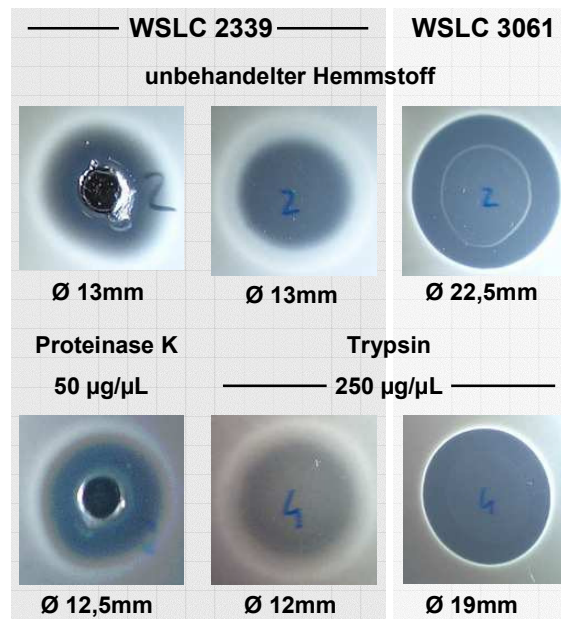


Abbildung 30. Einfluss der proteolytischen Enzyme Proteinase K (50 µg/µL) und Trypsin (250 µg/µL) auf den unaufgereinigten Hemmstoff von *St. equorum* WS 4524. Die Inkubation mit den Enzymen erfolgte bei 37°C für 2 h, die anschließende Inaktivierung bei 95°C für 15 min. In der oberen Reihe wurde der unbehandelte Hemmstoff, in der unteren Reihe der mit Enzymen behandelte Hemmstoff auf seine Aktivität getestet. Die Inkubation der Soft-Agarplatten erfolgte bei 30°C für 24 h, die Auswertung mittels Schräglicht.

Organische Lösungsmittel

Der unaufgereinigte Hemmstoff (1% w/v) löste sich in DMSO, Methanol, MilliQ-Wasser und Isopropanol vollständig. Nach dem Versetzen des gefriergetrockneten Präparates mit Aceton, Acetonitril, Chloroform, Dichlordimethan und Ethanol zeigte sich ein teilweises Lösen. Bei der Überprüfung der inhibitorischen Aktivität des in den Lösungsmitteln gelösten Hemmstoffes mittels Agar-Spot-Assay, unter Zuhilfenahme des sensitivsten Indikatorstammes *L. ivanovii* WSLC 3061, war keine Verminderung zu erkennen. Ein deutlicher Rückgang der Aktivität ließ sich nur bei Verwendung des Lösungsmittels DMSO und unter Verwendung des Indikatorstammes *L. innocua* WSLC 2339 feststellen (Abb. 31). Das Lösungsmittel DMSO

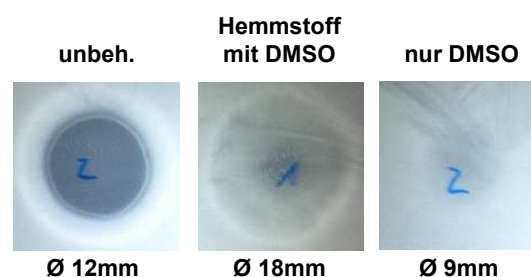


Abbildung 31. Hemmung des Indikatorstammes *L. innocua* WSLC 2339 durch den in DMSO gelösten Hemmstoffes von *St. equorum* WS 4524 (Mitte) und durch DMSO selbst (rechts). Als Kontrolle wurde der unbehandelte Hemmstoff aufgetropft (links). Inkubation der Soft-Agarplatten erfolgte bei 30°C für 24 h, die Auswertung mittels Schräglicht.

selbst bewirkte ebenfalls eine Inhibierung des Indikatorstammes WSLC 2339 im Soft-Agar, jedoch war die Inhibierung minimal (Abb. 31).

3.12 Flüssigchromatographie

Die Chromatographieläufe wurden stets mit dem unaufgereinigten Hemmstoff von *St. equorum* WS 4524 durchgeführt. Zur groben Größeneinschätzung der antilisteriellen Substanz wurde der in Natrium-Phosphatpuffer gelöste unaufgereinigte Hemmstoff über eine HiTrap Desalting-Säule (GE Healthcare) mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa eluiert. Der Hemmstoff wurde zudem in Laufpuffer mit 6 M Harnstoff gelöst, für 10 min bei 100°C aufgeköcht und auf eine HiTrap Desalting-Säule aufgetragen. Eventuell vorhandene Aggregate der Substanz sollten durch diese Behandlung aufgelöst werden. Bei beiden chromatographischen Läufen mit und ohne Harnstoff war bei den Peaks nach 1,39 mL bzw. 1,77 mL (437 mAU bzw. 516 mAU) (Abb. 32) eine antilisterielle Aktivität festzustellen, die der Stärke des in Laufpuffer oder MilliQ-Wasser gelösten Hemmstoffes entsprach. Die Peaks am Ende des Chromatographielaufes nach 4,86 mL bzw. 5,36 mL resultierten von dem im Laufpuffer enthaltenen Salz. Die chromatographischen Läufe wiesen entweder auf eine Substanzgröße von über 5 kDa hin, da die aktive Fraktion gleich zu Beginn der Läufe auftrat, oder sie wiesen auf nicht durch Harnstoff zu dissoziierende Molekülaggregate hin.

Eine bessere Größenaufftrennung erlaubt die Superose 6 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) mit einem Trennbereich von 5 bis 5.000 kDa. Der Säulenlauf mit der gleichen Probenmenge wie bei der kleinen Desalting-Säule lieferte mit ca. 120 mAU nach 19,22 mL (Abb. 33) einen Peak mit einer deutlich niedrigeren Absorption als im Lauf mit der Desalting-Säule. Der Peak wurde aufgrund seiner Größe in sechs Fraktionen je 1 mL aufgeteilt. Die Fraktionen wurden zusammen mit den restlichen Peaks bei 7,20 mL, 21,41 mL und 24,85 mL separat aufgefangen und auf ihre antilisterielle Aktivität getestet. Keine der getesteten Fraktionen rief im Agar-Spot-Assay mit *L. ivanovii* WSLC 3061 als Indikatorstamm eine Hemmung hervor.

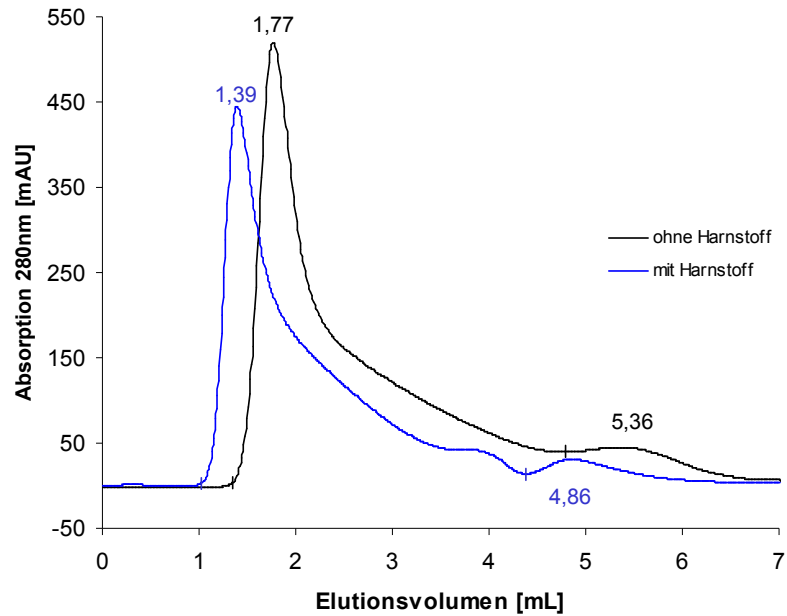


Abbildung 32. Elutionsprofil des unaufgereinigten Hemmstoffes von *St. equorum* WS 4524 unter Verwendung einer HiTrap Desalting Säule (GE Healthcare). Dargestellt ist die Absorption bei 280nm in Gegenwart (blaue Kurve) und in Abwesenheit (schwarze Kurve) von 6M Harnstoff. Die Peaks wurden bei den angegebenen Volumina eluiert.

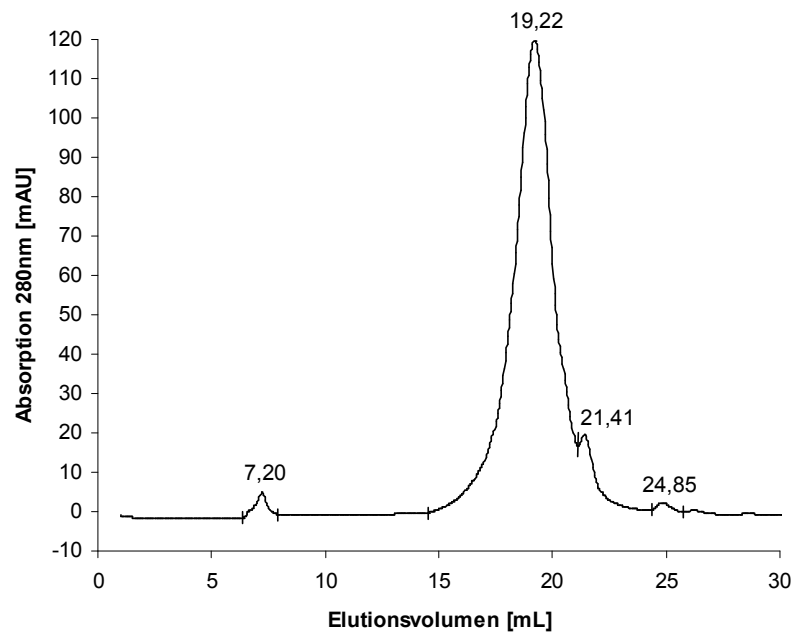


Abbildung 33. Elutionsprofil des unaufgereinigten Hemmstoffes von *St. equorum* WS 4524 unter Verwendung der Superose 6 10/300 GL Säule (GE Healthcare). Dargestellt ist die Absorption bei 280nm. Die Peaks wurden bei den angegebenen Volumina eluiert.

Folgend wurde die Methode der hydrophoben Interaktionschromatographie (*HIC*, *hydrophobic interaction chromatography*) angewandt, bei der eine Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial aufgrund einer hohen Ammoniumsulfatkonzentration erreicht wird. Durch Entzug der Hydrathülle haben die hydrophoben

Seitenketten der Proteine die Möglichkeit, an die ebenfalls hydrophobe Gelmatrix der Säule zu adsorbieren. Die an die Gelmatrix gebundenen Substanzen werden anschließend in einem absteigenden Salzgradienten eluiert. Als Trägermaterial kamen hier Phenyl-Sepharose (HiTrap Phenyl Sepharose 6 Fast Flow high/low sub (HiTrap Phenyl FF), GE Healthcare) und Butyl-Sepharose (HiTrap Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow (HiTrap Butyl-S FF), GE Healthcare) zum Einsatz. Je höher die Konzentration des Liganden in der Säule, desto stärker die Bindung der Substanz. Dies war an den Absorptionskurven der verschiedenen Säulen in Abbildung 34 abzulesen.

Die HiTrap Phenyl FF high sub-Säule - mit der stärksten Bindungskapazität in dieser Versuchsreihe - war anscheinend in der Lage mehr Material an die Säulenmatrix zu binden, da hier über den ganzen Gradientenverlauf eine Absorption gemessen wurde (Abb. 34, dunkelblaue Kurve). Beim Chromatographielauf mit dieser Säule wurde in den letzten beiden Fraktionen des Gradienten eine antilisterielle Aktivität festgestellt. Die Stärke der Aktivität der letzten Fraktion (11,5 bis 12,5 mL) lag bei ca. 50 % des frisch in MilliQ-Wasser gelösten Hemmstoffes, die Aktivität der vorletzten Fraktion (10,5 bis 11,5 mL) bei etwa 15 bis 20 %. Die unaufgereinigte aktive Substanz von *St. equorum* WS 4524 band anscheinend stark an die Gelmatrix der Säule, was für eine hohe Hydrophobizität spricht. Beim Chromatographielauf mit der Phenyl FF low sub-Säule (Abb. 34, blaue Kurve) war zwischen 6,8 und 7,8 mL eine Fraktion mit einer sehr schwachen antilisteriellen Aktivität zu finden, die 5 - 10 % der Aktivität des frisch angesetzten Hemmstoffes entsprach. Bei Verwendung der Butyl-S FF-Säule - mit der schwächsten Bindungskapazität in dieser Versuchsreihe - nahm die Absorption nach Erreichen eines großen Peaks zu Beginn des Laufs rapide ab (Abb. 34, hellblaue Kurve). Vor Beendigung des Gradientenlaufes konnte keine Absorption mehr gemessen werden. Hier konnte keine aktive Fraktion gefunden werden. Bei allen Säulenläufen wurde das Eluat des Waschvorgangs nach dem Gradientenverlauf auf antilisterielle Aktivität getestet. Auch diese Fraktionen waren inaktiv.

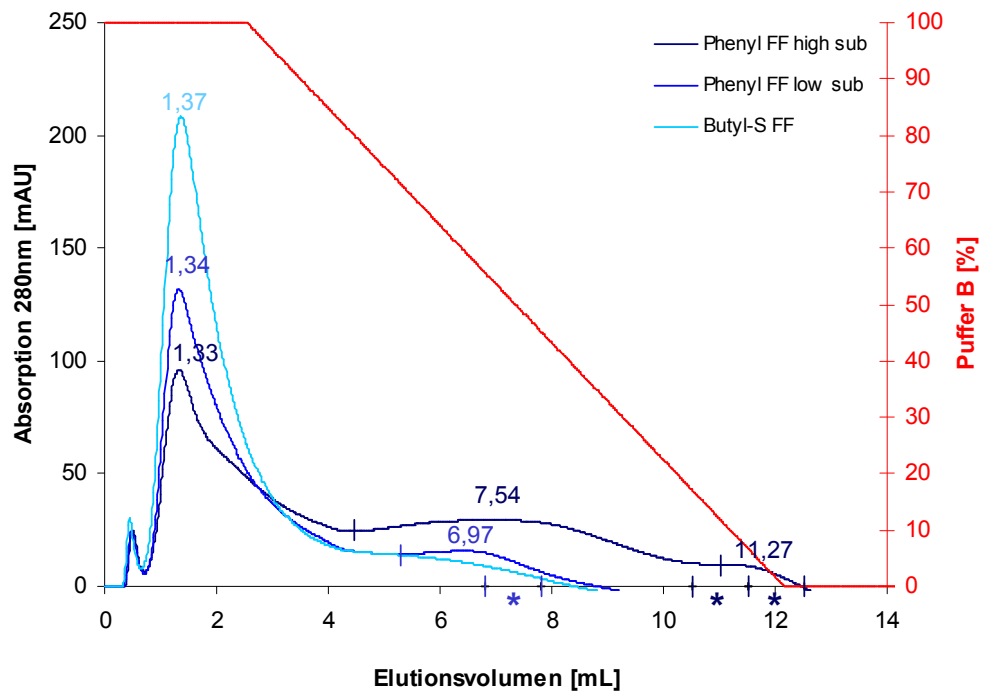


Abbildung 34. Elutionsprofile des unaufgereinigten Hemmstoffes von *St. equorum* WS 4524 unter Verwendung von HIC-Säulen (GE Healthcare). Dargestellt sind die bei 280nm gemessenen Absorptionskurven bei Verwendung der Säulen HiTrap Phenyl FF high sub (dunkelblau), Phenyl FF low sub (blau) und Butyl-S FF (hellblau) und die Konzentration [%] des Puffer B. Die Peaks wurden bei den angegebenen Volumina eluiert. Die antilisteriell aktiven Fraktionen sind mit * markiert.

4 Diskussion

***Pichia norvegensis* WSYC 592**

4.1 Stärke des Hemmpotentials

Einigen Vertretern der Spezies *I. orientalis* konnte in dieser Arbeit und in einer Studie von Goerges *et al.* (80) eine antilisterielle Aktivität nachgewiesen werden. Der in dieser Arbeit näher untersuchte Stamm *P. norvegensis* WSYC 592 wurde mit Hilfe des API 20C AUX (Biomerieux) zunächst als *C. krusei* bzw. *I. orientalis* identifiziert. Aus diesem Grund lag der Fokus hinsichtlich der Klärung des hemmenden Prinzips zunächst auf der Spezies *I. orientalis*. Durch Sequenzierung der 26S rDNS des Hefestammes WSYC 592 und mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie wurde die Hefe schließlich als *P. norvegensis* identifiziert werden (80), sodass der Fokus letztlich auf diese Spezies gelegt wurde.

Beim Cokultivierungsassay auf Festmedium war die *P. norvegensis* WSYC 592 in der Lage einen Listerientiter von 10^5 - 10^6 KbE/cm² nach 24 Stunden bis unter die Nachweisgrenze zu reduzieren. Anhand des eingesetzten Listerientiters, der weit über einer realistischen Kontaminationsrate von i.d.R. <10 KbE/cm² lag (168, 169), war das außerordentliche Hemmpotential der *P. norvegensis* zu erkennen. Selbst nach Anreicherungsverfahren nach § 64 LFGB konnten nach 24 Stunden Cokultivierung mit dem aktiven Hefestamm WSYC 592 keine Listerien mehr gefunden werden (30, 80). Die Kontrollhefe *Pichia* sp. WSYC 623 reduzierte die Listerien lediglich um eine Zehnerpotenz, was sehr wahrscheinlich auf Nahrungskonkpetition beruhte (79).

Aufgrund der außerordentlichen antilisteriellen Aktivität, die das Hemmvermögen der zuvor genannten *I. orientalis*-Stämme bei weitem überstieg, wurde *P. norvegensis* WSYC 592 zur näheren Charakterisierung der Hemmwirkung herangezogen.

4.2 Initiation der Hemmung

Mittels der Hemmungskinetik auf Festmedium über 48 Stunden konnte das Einsetzen der antilisteriellen Aktivität zu Beginn der stationären Wachstumsphase der Hefe WSYC 592 aufgezeigt werden (Abb. 3). Die Hemmung entfaltete sich vollends während der stationären Phase der *P. norvegensis*, sodass nach 21 Stunden Cokultivierung keine Listerien mehr vorzufinden waren. In einer von acht Cokulti-

vierungen konnten nach 24 Stunden wenige Listerien detektiert werden. Die eingesetzte Listerienzellzahl (10^5 - 10^6 KbE/cm²) stellte den maximalen Titer dar, der durch die *P. norvegensis* WSYC 592 gehemmt werden konnte. Minimale Titterschwankungen innerhalb dieser Größenordnung führten dazu, dass offenbar ein gewisser Schwellenwert überschritten und die Listerien nicht vollständig abgetötet werden konnten.

Neben der Abnahme der Zellzahl sank während der Cokultivierung mit der *P. norvegensis* WSYC 592 über 24 Stunden auch der pH-Wert von anfänglich pH 6,6 auf ca. pH 4,6. Nach zwölf Stunden Cokultivierung, in der Anfangsphase der Listerienhemmung, wurde ein niedriger pH-Wert von pH 4,8 erreicht. Der pH-Wert sank weiter ab, während die Hemmung der Listerien weiter voranschritt. Der niedrige pH-Wert kann nicht der Hauptgrund für diesen starken Hemmeffekt sein, da ein pH-Wert von 4,6 für Listerien nicht bakteriozid ist (69, 151). Auch in den beiden Kontrollansätzen lag der pH-Wert nach 24 Stunden bei ca. pH 4,6, doch sanken die pH-Werte, im Vergleich zur Cokultivierung mit der aktiven Hefe WSYC 592, langsamer ab. Ein Hemmeffekt blieb hier trotz des niedrigen pH-Werts aus.

4.3 Stabilität und Einflussnahme auf die Hemmaktivität in Flüssigmedium

Es zeigte sich, dass eine Hemmung von *L. monocytogenes* WSLC 1364 nicht nur auf Festmedium, sondern auch mit der Hauptkultur (Flüssigkultur) der *P. norvegensis* WSYC 592 möglich war (siehe 3.3). Bereits nach sechs Stunden Cokultivierung konnten die Listerienzellzahlen teilweise bis unter die Nachweisgrenze reduziert werden (Abb. 4). Bei der Cokultivierung mit der nicht-hemmenden Kontrollhefe WSYC 623 war ein minimaler Rückgang der Listerienzellzahlen zu erkennen, was mit dem niedrigen Nährstoffangebot der 24 Stunden alten Kultur begründet sein könnte.

Aufgrund der Schnelligkeit und Stärke der Hemmung lag die Vermutung nahe, die Hefekultur von WSYC 592 könnte nach Inhibierung des ersten Listerientiters von 10^3 KbE/mL noch eine zweite Listeriendosis in gleicher Höhe in ihrer Zellzahl reduzieren. Dies bewahrheitete sich nur zum Teil.

Erfolgte die Zugabe der zweiten Listeriendosis nach sechs Stunden Cokultivierung, war eine erneute Hemmung möglich, während die nach 24 Stunden zur Cokultur gegebenen Listerien nicht in ihrer Zellzahl reduziert werden konnten (Tab. 5). Hier könnte davon ausgegangen werden, dass die aktive/n Substanz/en

entweder verbraucht war/en, sodass eine erneute Hemmung nach 24 Stunden nicht mehr möglich war. Oder die Substanz/en so instabil war/en, dass sie nur über einen bestimmten Zeitraum agieren konnte/n. Auch die Erschöpfung der Nährstoffvorräte des Mediums könnten als Grund angenommen werden, so dass sich die Hefe nicht mehr vermehrte bzw. die Energie für die Produktion der Substanz/en nicht mehr aufbrachte. Im Ergebnis lag bei den ermittelten Hefezellzahlen kein Wachstum im Zeitraum von 24 bis 48 Stunden vor.

Mit einem Nährmediumswechsel vor der erneuten Listerienzugabe in Höhe von 10^3 KbE/mL nach 24 Stunden Cokultivierung bzw. lediglich bei Zugabe von 2 % (v/v) Glucose, Fructose oder Mannose zusammen mit den Listerien zur bestehenden Cokultur, konnte auch die zweite Listeriendosis gehemmt werden. Ein gleiches Bild ergab sich bei Zugabe einer C-Quelle zu einer über 72 Stunden kultivierten Hefekultur von WSYC 592. Auch diese war in einer anschließenden Cokultivierung in der Lage einen Listerientiter von 10^3 KbE/mL bis unter die Nachweisgrenze zu hemmen. Anscheinend wurde durch die Zugabe der C-Quellen der Stoffwechsel der aktiven Hefe WSYC 592 reaktiviert, sodass die Produktion der antilisteriellen Substanz(en) wieder stattfand.

4.3.1 Einflussnahme von C-Quellen auf die antilisterielle Aktivität

4.3.1.1 Zu Glucose strukturähnliche C-Quellen

Die Inhibierung einer zweiten Listeriendosis konnte durch Zugabe von 2 % (v/v) einer der leicht verwertbaren C-Quellen Glucose, Fructose oder Mannose (73) herbeigeführt werden. Eine Gemeinsamkeit der drei Hexosen ist der identische Strukturteil vom dritten bis zum sechsten Kohlenstoffatom (Abb. 6). Zur Klärung, ob dieser Strukturteil mit der Hemmung der Listerien in Verbindung stehen könnte, wurden die Pentose Arabinose mit einem identischen und die Hexose Galactose mit einem ähnlichen Strukturteil (Abb. 6) als weitere C-Quellen in die Versuchsreihe aufgenommen. Hinzu kamen noch die beiden Disaccharide Maltose und Saccharose. Die Tatsache, dass ein Wiederauftreten der Hemmaktivität mit diesen vier C-Quellen nicht beobachtet werden konnte und die Spezies *Pichia* nicht in der Lage ist diese C-Quellen zu verstoffwechseln (15), lässt eine vom Hefenwachstum abhängige Hemmung der Listerien vermuten. Listerien können die genannten C-Quellen sehr schlecht bzw. gar nicht verwerten (12, 152, 154).

Würde eine Auslösung der Hemmwirkung durch die Bindung eines Zuckerstrukturteils an die Listerienoberfläche initiiert werden, so konnte diese Hypothese durch eine ausbleibende Reaktion bei Zugabe von Arabinose, Galactose, Maltose und Saccharose widerlegt werden.

4.3.1.2 Selektiv verwertbare C-Quellen

Die Spezies *Pichia* ist befähigt Citrat zu metabolisieren (15), sodass die beiden Hefestämme WSYC 592 und WSYC 623 mit di-Ammoniumhydrogencitrat als C-Quelle nahezu identische Zellzahlen wie im Standardnährmedium mit Glucose erreichten. Listerien können Citrat aufgrund ihres unvollständigen Citrat-Zyklus nicht in ihren Stoffwechsel einbeziehen (62, 86, 186). Durch die fehlende 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (62), die α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA oxidiert, wird der Citrat-Zyklus in einen oxidativen (Acetyl-CoA \rightarrow Citrat \rightarrow Isocitrat \rightarrow α -Ketoglutarat) und einen reduktiven Arm (Oxalacetat \rightarrow Malat \rightarrow Fumarat) gespalten (121) (Abb. 35).

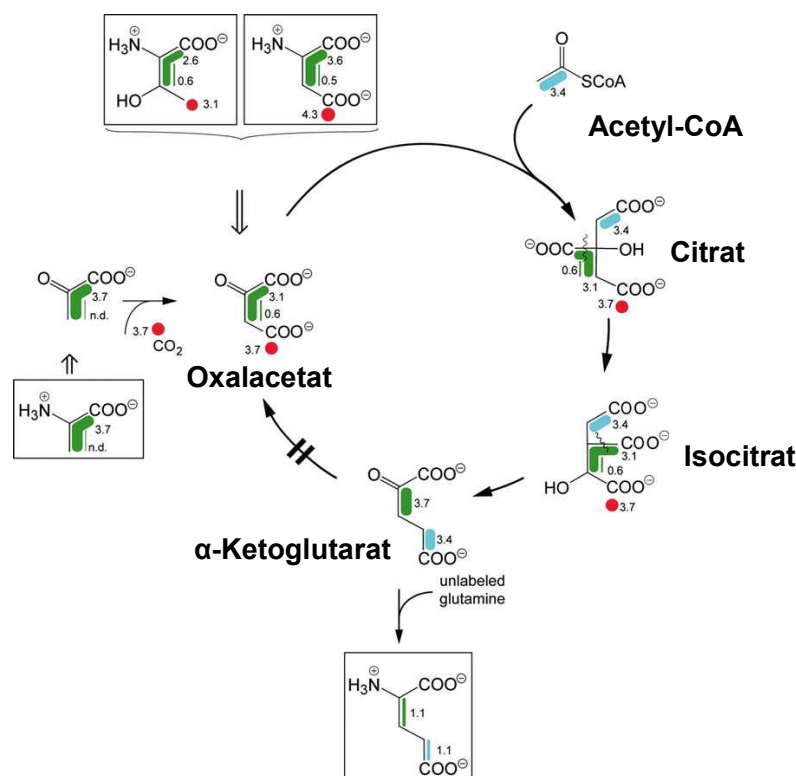


Abbildung 35. Rekonstruktion des unvollständigen Citrat-Zyklus in *L. monocytogenes* EGD (modifizierte Abbildung aus Eisenreich et al. 2006). Der doppelt durchgestrichene Pfeil kennzeichnet die fehlende 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase.

Trotz des sehr guten Hefenwachstums in Gegenwart von di-Ammoniumhydrogencitrat war eine Reduzierung des in der Cokultivierung einge-

setzten Listerientiters von 10^4 KbE/mL nicht möglich. Mit di-Ammoniumhydrogencitrat als C-Quelle lag der End-pH-Wert nach der Kultivierung der Hefen bzw. der Cokultivierung über 24 Stunden bei pH \sim 7. Unter Einsatz von Glucose, Fructose oder Mannose sank der pH-Wert während der Hefenanzucht bzw. der Cokultivierung über 24 Stunden von ursprünglich pH 6,6 auf ca. pH 4.6 ab. Obwohl der pH-Wert hier im sauren Bereich lag, kann der niedrige pH-Wert allein nicht für die Hemmung der Listerien verantwortlich sein. *L. monocytogenes* ist fähig auch bei niedrigen pH-Werten von pH 5 und niedriger zu wachsen (46, 69). Der Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364 selbst säuerte das Nährmedium während der Kultivierung ohne Anwesenheit der Hefen bzw. während Cokultivierung ebenfalls stark an und erreichte trotzdem Zellzahlen im Bereich von über 10^8 KbE/cm² (Abb. 3) bzw. 10^8 - 10^9 KbE/mL. Zudem ist bekannt, dass aus Käse isolierte *L. monocytogenes*-Stämme, wie der in dieser Arbeit verwendete Indikatorstamm WSLC 1364, resistenter gegenüber Stresseinflüssen wie niedrigem pH oder hohen Salzkonzentrationen sind (68). Der niedrige pH-Wert als Hauptgrund für die inhibierende Wirkung kann ausgeschlossen werden, doch könnte er bei der Hemmung der Listerien eine unterstützende Rolle spielen. So werden z.B. einige von Hefen produzierte Proteasen, die allerdings in der Vakuole lokalisiert sind, im sauren pH-Bereich aktiviert (116, 170).

Jaradat & Bhunia (101) zeigten die Abhängigkeit der Expression des *Listeria* Adhäsionsproteins (LAP) vom gewählten Nährmedium und von der Glucosekonzentration. In den nährstoffreichen Medien BHI und TSB, mit einer Glucosekonzentration von $>1,6$ g/L, sank der pH-Wert während der Kultivierung, was die LAP Expression erheblich reduzierte. Im nährstoffärmeren LB-Medium mit niedrigem Glucoseanteil konnte eine stärkere Adhäsion an Caco-2-Zellen beobachtet werden, als bei einer Glucosekonzentration über 1,6 g/L. Wie oben beschrieben, sank in dieser Arbeit der pH-Wert der Cokulturen in Gegenwart von Glucose ab, während er im Beisein von di-Ammoniumhydrogencitrat bzw. Lactat (siehe 3.4.2.3) als C-Quellen im neutralen Bereich blieb bzw. ins alkalische überging. Die Listerien könnten im basischen Milieu befähigt sein, eine bestimmte Oberflächenstruktur auszubilden, die sie für eine Inhibierung durch die *P. norvegensis* WSYC 592 unzugänglich machen könnte.

Obwohl Rhamnose von Farber *et al.* (69) und Nelson *et al.* (142) als eine unter aeroben Bedingungen verwertbare C-Quelle ausgewiesen wurde, war im vorliegenden Fall kein Listerienwachstum während der Kultivierung bzw. Cokultivierung zu verzeichnen. Die Kultivierungszeit von 17 Stunden und die anschließende Cokultivierung über 24 Stunden waren zu kurz, um die L-Rhamnose zu metabolisieren (135). Die Spezies *Pichia* ist nicht befähigt Rhamnose zu verwerten (15).

4.3.1.3 Unabhängigkeit der Hemmaktivität von der Mannose-Verwertung durch Listerien

In Gegenwart von Mannose erbrachten die Hefestämme WSYC 592 und WSYC 623 vergleichbare Zellzahlen wie bei der Kultivierung im Standardnährmedium mit Glucose. Auch der Wildtypstamm *L. monocytogenes* EGD-e und die Deletionsmutante *L. monocytogenes* EGD-e Δpts^{Man} , $\Delta lmo0027$, die keine Mannose verstoffwechseln kann, erreichten mit Pepton, Hefeextrakt und Mannose als angebotene Nährstoffe Zellzahlen, die mit BHI-Bouillon als Nährmedium vergleichbar waren. Im Falle der Deletionsmutante reduzierte *P. norvegensis* WSYC 592 den eingesetzten Listerientiter von 10^4 KbE/mL innerhalb von 24 Stunden Cokultivierung bis unter die Nachweisgrenze (Tab. 6). Einige wenige Zellen des Wildtypstammes EGD-e konnten indes nach 24 Stunden in Gegenwart der aktiven Hefe WSYC 592 detektiert werden. Bei der Cokultivierung der Deletionsmutante mit der Kontrollhefe WSYC 623 blieb der eingesetzte Titer von 10^4 KbE/mL nahezu unverändert, wohingegen sich bei der Cokultivierung mit dem Wildtypstamm eine Zellzahlreduktion von ca. einer Zehnerpotenz feststellen ließ. Für eine präzisere Aussage bzgl. des Zellzahlrückganges des Wildtypstammes in Gegenwart der Kontrollhefe WSYC 623 sind weitere Cokultivierungen erforderlich. Nichtsdestotrotz war eine vollständige Hemmung der Deletionsmutante durch *P. norvegensis* WSYC 592 erkennbar, was deutlich auf eine Unabhängigkeit der Hemmwirkung von der Verwertbarkeit der Mannose auf Seite der Deletionsmutante und womöglich der Spezies *L. monocytogenes* hindeutet.

4.3.1.4 Die Sonderrolle des Lactat

Lactat, das durch die Metabolisierung von Lactose durch Starter- und Nicht-Starterkulturen entsteht (188), ist eine im Käse natürlich vorkommende C-Quelle.

Aus diesem Grund wurde Lactat als Einflussfaktor auf die Hemmwirkung der *P. norvegensis* WSYC 592 getestet.

Mögliche Auswirkungen des Lactats auf die Hemmaktivität

Die beiden Hefestämme WSYC 592, WSYC 623 und der Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364 zeigten in Gegenwart von 2 % (v/v) bzw. 2,5 % (w/v) (Δ 278mM) Lactat keine Wachstumsdefizienz, sodass die Zellzahlen mit den in glucosehaltigem Nährmedium bzw. BHI-Bouillon erreichten Zellzahlen nahezu identisch waren. Eine Inhibierung von *L. monocytogenes* WSLC 1364 durch *P. norvegensis* WSYC 592 blieb trotzdem aus. Eine Konzentration von 2,5 % (w/v) Milchsäure kann sich inhibitorisch auf das Wachstum auswirken, wie die Studie von Narendranath *et al.* (140) über die inhibitorische Wirkung von Essig- und Milchsäure gegen *S. cerevisiae* demonstriert. Für eine toxische Wirkung der Milchsäure in einem definierten Minimalmedium war eine minimale inhibitorische Konzentration (MIC) von 2,5 % (w/v) (278mM) notwendig. Im Unterschied zu der genannten Studie wurde in dieser Arbeit mit Lactat, dem Salz der Milchsäure, gearbeitet. Da Milchsäure fast vollständig zu einem Proton und Lactat dissoziiert, ist die Menge an zugeführter Milchsäure fast gleich der des zugeführten Anions Lactat. Abbot *et al.* (6) wiesen in ihrer Studie ebenfalls eine toxische Wirkung von Milchsäure nach. Auch wenn die Ergebnisse der Studien von Narendranath *et al.* (140) und Abbot *et al.* (6), aufgrund der Verwendung einer anderen Hefenspezies (*S. cerevisiae*) und eines definierten Minimalmediums, nicht direkt mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar sind, ist erwiesen, dass sich das Lactat in der vorliegenden Arbeit nicht negativ auf das Wachstum der *P. norvegensis* auswirkte. Das Lactat griff demnach an einer anderen Stelle in einen Stoffwechsel-/Regulationsprozess ein, was einen totalen Verlust der Hemmaktivität bewirkte.

Das in dieser Arbeit verwendete Nährmedium enthielt Pepton und Hefeextrakt, die einen gewissen Schutz gegen Stresseinflüsse bieten (140). Da bereits de Vuyst (52) einen negativen Einfluss der Medienkomponenten auf die Nisinproduktion aufzeigen konnte, ist es denkbar, dass auch hier die Medienkomponenten auf die Produktion der antilisteriell wirksamen Substanz(en) eine negative Auswirkung gehabt haben könnten. Abbot *et al.* (6) wiesen in ihrer Studie nach, dass sich eine hohe Milchsäurekonzentration nicht nur auf das Wachstum, sondern auch auf die Produktbildung inhibitorisch auswirken kann, z.B. durch eine verminderte Gen-

expression. In einer umfassenden Studie von Kawahata *et al.* (106) wurde die Einflussnahme von Milch- und Essigsäure auf die Genexpression bei *S. cerevisiae* untersucht. Die Expression einiger Gene, die für diverse Permeasen und Transporter kodieren, wurde herunterreguliert. Ein saures Milieu beeinflusst neben dem Zellwandaufbau u.a. auch den Metallmetabolismus der Hefe. Gendelektionen innerhalb verschiedener Funktionsgruppen, wie z.B. Metabolismus, Transport, Proteinmodifizierung, Interaktion mit der zellulären Umwelt, führten zu einer Sensitivität der Deletionsmutanten gegenüber den beiden Säuren. Die Ergebnisse zeigten ein breit gefächertes Spektrum an Interaktionen der Milchsäure. Die Untersuchung des Sekretoms der *P. norvegensis* WSYC 592 in Kapitel 3.5 zeigte bereits, dass bei der Kultivierung der Hefe in Gegenwart von Lactat deutlich weniger Proteine exprimiert werden, verglichen mit der Kultivierung der Hefe in Anwesenheit von Glucose (Abb. 14). Es ist demnach denkbar, dass das Lactat antagonistisch auf die Genexpression einiger Gene gewirkt haben könnte, die evtl. für einen Transporter oder eine Permease kodieren, welche für die Freisetzung der antilisteriellen Substanz(en) erforderlich wären. Durch die Einwirkung des Lactats könnte auch ein wichtiger Modifizierungsschritt gestört worden sein, der für die Aktivität der antilisteriellen Substanz unabdingbar ist. Mit der Untersuchung der Expressionsänderung bei *P. norvegensis* WSYC 592 in Gegenwart von Lactat eröffnet sich ein interessanter Versuchs- und Forschungsansatz, der jedoch über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausging.

Das Zusammenspiel von Glucose und Lactat

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *P. norvegensis* WSYC 592 in Gegenwart von 2 % (w/v) Glucose und bis zu 3 % (v/v) Lactat bereits nach acht Stunden Cokultivierung in Flüssigmedium eine vollständige Hemmung des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 herbeiführte (Abb. 8) - gleiches bei 1,5 % (w/v) Glucose und 0,5 % (v/v) Lactat. Die Feststellung, dass mit höher dosierten Glucosekonzentrationen im Nährmedium höhere Lactatkonzentrationen kompensiert werden konnten, fand durch Versuchsergebnisse von Goerges (78) Bestätigung. Hier war in Cokultivierungsversuchen auf Festmedium mit 1,5 % (w/v) Glucose für eine vollständige Hemmung der Listerien eine Zugabe bis zu 3 % (v/v) Lactat möglich. Waren jeweils 1 % (w/v) Glucose und Lactat vorhanden war keine Hemmung möglich (78). Obwohl die Konzentrationsangaben mit den Ergebnissen aus

dieser Arbeit aufgrund des unterschiedlichen Versuchsansatzes nicht direkt vergleichbar sind, so lassen beide die gleiche Tendenz erkennen. Ein gewisser Anteil an Glucose scheint im Nährmedium vorhanden sein zu müssen, damit *P. norvegensis* WSYC 592 fähig ist, eine Hemmung der Listerien herbeizuführen.

Die oben beschriebenen Ergebnisse der Cokultivierungen in Gegenwart von Glucose und Lactat ließen vermuten, die antilisterielle Aktivität bzw. die Produktion der antilisteriellen Substanz(en) sei an den Glucosestoffwechsel bzw. die Glykolyse gekoppelt. Gegebenenfalls könnte eine Art Kohlenstoff-Katabolitrepression (*carbon catabolite repression*) vorliegen. Diese ereignet sich, wenn leicht verwertbare C-Quellen, wie Glucose, Fructose oder Mannose verfügbar sind. Sie werden bevorzugt verstoffwechselt, sodass die Enzyme zur Verwertung alternativer C-Quellen nur minimal bzw. gar nicht synthetisiert werden. Nachfolgend wird ein Beispiel der Kohlenstoff-Katabolitrepression in *S. cerevisiae* näher erläutert:

In *S. cerevisiae* kodiert *JEN1* für einen Lactat/Pyruvat:H⁺ Symporter (Transport Classification (TC)-Nr. 2.A.1.12.2), der allein für den Transport von Lactat über die Plasmamembran verantwortlich ist (39). *JEN1* wird in Gegenwart der repressiven C-Quelle Glucose nicht abgelesen. Sind hingegen nicht-repressive C-Quellen, wie z.B. Lactat, Ethanol oder Glycerol vorhanden, ist der Promotor aktiv und die Transkription findet statt. Die Repression durch Glucose zeigt sich zur Induzierung durch Lactat epistatisch, wie folgende Studie von Lodi *et al.* (119) zeigt. Bei Expressionsanalysen von *JEN1* konnte in Gegenwart von jeweils 2 % (w/v) Lactat und Glucose kein Transkript vorgefunden werden, wogegen unter Einsatz von nur Lactat (2 % w/v) mittels Northern Blot mRNA nachweisbar war (119). Eine Parallele der Ergebnisse dieser Arbeit zu den Ergebnissen eben genannter Studie von Lodi *et al.* konnte festgestellt werden. Bei der Cokultivierung mit 2 % (w/v) Glucose und 3 % (v/v) Lactat war eine vollständige Hemmung der Listerien möglich (Abb. 8). Dies könnte bedeuten, dass die Glucosekonzentration ausgereicht hat, um die Expression eines Lactat-Transportergens zu reprimieren. Somit könnte ein Lactattransport in die Hefezellen unterbunden und die Hemmaktivität der *P. norvegensis* WSYC 592 aufrechterhalten worden sein. Chambers *et al.* (41) fanden einen Schwellenwert heraus, ab der eine Expression von *JEN1* in *S. cerevisiae* möglich ist. Bei Glucosekonzentrationen unter 3 g/L (Δ 0,3 % w/v) wurde die Promotoraktivität von *JEN1* induziert und war bei ca. 0,1 g/L (Δ 0,01 % w/v) Glucose am höchsten (41). Diese Glucosekonzentrationen wurden in dieser Arbeit mit

Einsatz von 20 g/L \pm 2 % (w/v) bzw. 15 g/L \pm 1,5 % (w/v) deutlich überschritten. Es muss aber nicht zwangsläufig bedeuten, dass es trotz der hohen Glucosekonzentration zu keiner Induzierung der Promotoraktivität eines Lactat-Transportergens in *P. norvegensis* WSYC 592 geführt haben könnte. Flores *et al.* (70) zeigten bereits, dass die mit *S. cerevisiae* gewonnenen Erkenntnisse prinzipiell nicht auf nicht-konventionelle Hefengattungen, wie z.B. *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia* und *Yarrowia*, übertragbar sind. Für eine detaillierte Klärung der Einflussnahme des Lactats auf die antilisterielle Aktivität der *P. norvegensis* WSYC 592 wäre u.a. die Untersuchung der Abhängigkeit der Hemmwirkung vom Lactatmetabolismus der Hefe ein interessanter Forschungsansatz, der jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinausging. Dafür wäre u.a. eine Unterbindung der Lactataufnahme nötig, die durch Deletion des *JEN1*-orthologen Gens in *P. norvegensis* erreicht werden würde. In den beiden Stämmen *P. stipitis* CBS 6054 und *P. pastoris* GS115 wurden mit *JEN11* (NCBI-GeneID: 4837334) bzw. *YKL217W* (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/bogas/annotation/Picpa/666666/chr3_0440) Orthologe von *JEN1* gefunden, die für den Carbonsäure- bzw. Lactat-Transport verantwortlich sind. Unter Anwendung dieser bekannten Gensequenzen sollte die Deletion des *JEN1*-orthologen Gens in *P. norvegensis* möglich sein.

4.3.2 Einfluss von Detergenzien auf die antilisterielle Aktivität

Nachdem im Kulturüberstand der Hefe *P. norvegensis* WSYC 592 keine aktive Substanz nachweisbar war (siehe 3.7), bestand die Vermutung, dass es sich bei der antilisteriell wirksamen Substanz um ein an die Hefenzellwand gebundenes oder in der Zellwand lokalisiertes Protein bzw. proteinartige Substanz handeln könnte. Es bestand die Absicht, ein evtl. vorhandenes antilisteriell wirkendes Protein mit einer Auswahl an nicht-ionischen und zwitterionischen Detergenzien von der Hefenzelloberfläche herunterzuwaschen oder aus der Hefenzellwand/-membran herauszulösen. Letztlich beschränkte sich der Einsatz der Detergenzien auf die Untersuchung ihrer Auswirkungen auf die Hemmwirkung der *P. norvegensis* WSYC 592, da weitere Untersuchungen mit Detergenzien über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgingen.

4.3.2.1 Nicht-ionische Detergenzien

Tween®

Zu den nicht-ionischen Detergenzien zählen u.a. die Detergenzien der Tween®-Familie bzw. der Gruppe der Polysorbate. Sie finden u.a. in der Lebensmittelindustrie als Netzmittel oder Emulgatoren ihren Einsatz (Tween® 20 = E432, Tween® 80 = E433). In der Biochemie werden sie in der Solubilisierung von Membranproteinen verwendet (23). Sie gelten als milde Detergenzien und wirken im Gegensatz zu Cetyltrimethylammonium-bromid (CTAB) oder SDS nicht denaturierend. In dieser Arbeit wurden Tween® 80 (Daten nicht gezeigt) oder Tween® 20 zur Kultur von *P. norvegensis* WSYC 592 bzw. der Cokultur der Hefe WSYC 592 mit *L. monocytogenes* WSLC 1364 hinzugegeben, mit der Absicht, wie bei Reese & Maguire (159), die Freisetzung einer inhibitorischen Substanz von/aus der Hefenzellwand zu ermöglichen. Reese & Maguire (159) erzielten durch den Einsatz von 0,1 % (v/v) Tween® 80 in Flüssigkulturen von Pilzen, wie z.B. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, eine wesentlich höhere Ausbeute an extrazellulären Enzymen und Pigmenten. Huot *et al.* (97) erzielten in ihren Versuchen eine vierfache Steigerung der Bakteriozinproduktion von *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46 unter Verwendung von 1 % (v/v) Tween® 80. Tween® 20 vermochte ebenfalls die Bakteriozinproduktion effektiv zu stimulieren. Der Effekt des Detergens lag hier direkt bei der Bakteriozinproduktion an sich. Durch Einsatz von Tween® 80 konnte einerseits die Bakteriozinproduktion (11) bzw. die Aktivität eines Bakteriozins (103) gesteigert werden; andererseits konnte es die Aktivität eines Bakteriozins auch inhibieren, wie das Beispiel des Enterotoxin B von *St. aureus* S6 zeigt (71). Die unsteife Wirkung des Tween® 80 hängt vom Organismus, wie auch vom jeweiligen Enzym innerhalb eines Organismus ab, mit dem es interagiert (159). Das Hervorrufen unterschiedlicher Effekte, wie im Falle des Tween®, kann möglicherweise auch für andere Detergenzien gelten.

In dieser Arbeit reichte eine minimale Konzentration von 0,001 % (v/v) ($\approx 9 \mu\text{M}$) Tween® 20 aus, um die Hemmung der Listerien partiell aufzuheben (Abb. 9). Bei dieser Konzentration war die kritische Mizellenkonzentration (CMC, *critical micelle concentration*) von ca. $60 \mu\text{M}$ ($\approx 0,007 \%$ v/v) bei weitem nicht erreicht. Die CMC ist die minimale Konzentration an Detergens, bei der noch Mizellen gebildet werden können. Die Konzentration des Detergens muss oberhalb der CMC liegen, um

Membranproteine solubilisieren zu können. Das Detergens lag bei dieser niedrigen Konzentration von 0,001 % (v/v) somit in einem monomeren Zustand vor, sodass sich die Monomere u.a. frei an der Hefenzelloberfläche positionieren konnten. Nicht-ionische Detergenzien können Proteine gegen eine oberflächeninduzierte Aggregation schützen, indem sie an hydrophobe Bereiche der Proteinoberfläche binden und dadurch intermolekulare Interaktionen reduzieren (13). Die hierfür erforderliche Konzentration korreliert nicht mit der CMC des Detergens (43). Eine solche Abschirmung einer Substanz bzw. Verhinderung einer Interaktion könnte eine Erklärung für die verminderte Listerienhemmung in der vorliegenden Arbeit bei Einsatz von 0,001 % (v/v) Tween[®] 20 sein. Ab einer Konzentration von 0,02 % (v/v) Tween[®] 20 ($\approx 0,18$ mM), die über der CMC lag, war keine Hemmung der Listerien mehr feststellbar (Abb. 9). Dies könnte bedeuten, dass die antilisteriell wirksame Substanz durch das Detergens aus der Hefenzellwand/-membran herausgelöst wurde und die Substanz somit für die Hemmung der Listerien nicht mehr zur Verfügung stand.

Obwohl Tween[®] ein geringes Maß an Peroxidrückständen enthalten kann, die die Stabilität oxidationsempfindlicher Proteine beeinträchtigen können (43), ist dies als Grund für den beobachteten Abfall der Hemmung eher unwahrscheinlich, da auch andere nicht-ionische Detergenzien eine Aufhebung der Hemmung verursachten.

Einfluss von Tween[®] 20 auf *P. norvegensis* WSYC 592 und *L. monocytogenes* WSLC 1364

Der Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364 wurde in Gegenwart von 0,05 % (v/v) Tween[®] 20 kultiviert und das Detergens nach mehrmaligem Waschen größtenteils entfernt. In einer anschließenden Cokultivierung mit der Hefe WSYC 592, die keinen Kontakt mit dem Detergens hatte, wurde eine Zellzahlreduktion bis auf wenige Listerienzellen registriert (Tab. 9). Die nicht vollständige Hemmung durch die Hefe WSYC 592 ließe sich durch eine noch minimal vorhandene Menge an Detergens erklären, welches aufgrund der sehr niedrigen CMC von 0,06 mM sehr schwer zu entfernen ist (89). In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass selbst eine minimale Konzentration von 0,001 % (v/v) Tween[®] 20 eine partielle Aufhebung der antilisteriellen Aktivität bewirkte. Da es nach der Kultivierung der inhibierenden Hefe WSYC 592 mit 0,05 % (v/v) Tween[®] 20 anscheinend nicht möglich war das Detergens vollständig zu entfernen, war die Hefekultur nicht mehr zu einer Hemmung

der Listerien befähigt. Dies spricht für eine irreversible, hydrophobe Bindung des Tween[®] 20 an die Hefenzellenoberfläche.

Brij[®] 35, Triton[®] X-100

Die Detergenzien Brij[®] 35 und Triton[®] X-100 gehören wie Tween[®] zu den Polyoxyethylenen und führten ebenfalls eine teils partielle, teils vollständige Aufhebung der Hemmwirkung herbei. Mit dem Einsatz der Konzentration von 0,01 % (w/v) Brij[®] 35 (= 0,083 mM) wurde die CMC von 0,09 mM fast erreicht. Der Einsatz dieser Konzentration führte zu einer partiellen Aufhebung der Hemmung (Abb. 9). Ab einer Konzentration von 0,05 % (w/v) (= 0,416 mM) Brij[®] 35 trat eine vollständige Aufhebung der Hemmung ein. Der Einsatz von 0,0125 % (v/v) Triton[®] X-100 (= 0,214 mM), was unter der CMC von 0,3 mM lag, hatte keinen Einfluss auf die Hemmung der Listerien (Abb. 10). Erst ab einer Konzentration von 0,0375 % (v/v) (= 0,643 mM), die über der CMC lag, konnte eine partielle Aufhebung der Hemmung beobachtet werden.

Bei den drei Detergenzien Tween[®] 20, Brij[®] 35 und Triton[®] X-100 aus der Gruppe der Polyoxyethylene war hinsichtlich ihrer CMC und ihrer Auswirkung auf die Hemmwirkung keine Gesetzmäßigkeit festzustellen. Anders als beim Tween[®] 20 konnte im Falle des Brij[®] 35 und Triton[®] X-100 eine partielle Aufhebung der Hemmung durch die *P. norvegensis* WSYC 592 verzeichnet werden, sobald die CMC erreicht bzw. nahezu erreicht worden war. Die Gemeinsamkeit der hier genutzten drei Detergenzien ist eine mehrfach vorkommende Ethoxygruppe (Abb. 1). Inwieweit diese Strukturähnlichkeit bei der Aufhebung der Hemmung eine Rolle spielt, ließ sich nicht eindeutig beantworten und wäre noch aufzuklären.

Vergleich zwischen Nonidet P-40 und Triton[®] X-100

Triton[®] X-100 besitzt nur zwei Ethoxygruppen mehr als NP-40 (Abb. 1), doch trotz der großen Strukturähnlichkeit wirkten die beiden Detergenzien unterschiedlich toxisch auf den Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364.

Bei Kultivierung von *L. monocytogenes* WSLC 1364 bzw. bei Cokultivierung des Indikatorstammes mit der nicht-hemmenden Hefe WSYC 623 in Gegenwart von 0,5 % (v/v) NP-40 - eine durchaus gängige Arbeitskonzentration (162) - über 24 Stunden, wurde die Listeriezellzahl um ca. eine halbe Zehnerpotenz (Tab. 8) bzw. um über zwei Zehnerpotenzen reduziert (Abb. 11). Die Zellzahlen der Kontrollhefe WSYC 623 und der inhibitorischen Hefe WSYC 592 wurden bei Einsatz einer

Konzentration von 0,5 % NP-40 nicht beeinflusst, obwohl in einer Studie von Hronska *et al.* (96) bei Verwendung einer Konzentration von 0,2 % NP-40 ein signifikant negativer Effekt auf die Physiologie und Vitalität von *S. cerevisiae* beobachtet wurde. Aufgrund der Toxizität des NP-40 gegenüber *L. monocytogenes* WSLC 1364 konnte keine Aussage über den Einfluss dieses Detergens auf das Hemmpotential der *P. norvegensis* WSYC 592 gegeben werden.

Im Gegensatz zu NP-40 hatte Triton[®] X-100 bei Cokultivierung mit der nicht-hemmenden Kontrollhefe WSYC 623 lediglich einen leicht negativen Einfluss auf das Listerienwachstum (Abb. 10). Bei Einsatz einer Konzentration von 0,0125 % (v/v) Triton[®] X-100 gab es unerwarteterweise einen stärkeren Rückgang des eingesetzten Listerientiters, als bei einer 10-fach höheren Konzentration von 0,125 % (v/v). Zeng *et al.* (199) stellten in ihren Versuchen bei der Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus subtilis* mit 900 mg/L Triton X-100[®] ($\approx 0,9$ %) keinen toxischen Effekt fest. Auch Willumsen *et al.* (198) konnten bei Wachstumsversuchen mit *Mycobacterium* sp. in Gegenwart von 0,48 mM ($\approx 0,03$ %) Triton[®] X-100 keinen bzw. nur einen minimalen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum feststellen. Der in dieser Arbeit beobachtete Effekt des Triton[®] X-100 könnte ebenfalls einer stammspezifischen Reaktion zugeschrieben werden.

Für die unterschiedliche toxische Wirkung der Detergenzien NP-40 und Triton[®] X-100 trotz großer Strukturähnlichkeit konnte keine Erklärung gefunden werden.

4.3.2.2 Zwitterionische Detergenzien

Neben nicht-ionischen werden auch zwitterionische Detergenzien bevorzugt zur Solubilisierung von Proteinen herangezogen, z.B. im Zuge der Probenvorbereitung für die 2D Gelelektrophorese (82).

Zwittergent[®]

Die zwitterionischen Sulfobetaine, z.B. Zwittergent[®], haben scheinbar mehr mit nicht-ionischen als mit ionischen Detergenzien gemeinsam. Sie haben den Vorteil, dass sie nicht denaturierend wirken und ihren zwitterionischen Charakter über den gesamten pH-Bereich erhalten (81). Durch ihren Einsatz steigerten Chevallet *et al.* (42) die Effizienz der Proteinsolubilisierung und es gelang das Auffinden zusätzlicher Membranproteine. Mit Hilfe von Zwittergent TM314 konnten Malpartida & Serrano (125) eine membranständige ATPase von *S. cerevisiae* solubilisieren, wohingegen klassische Detergenzien wie z.B. Deoxycholat, Digitonin, Triton[®]

X-100 und SDS versagten bzw. die Proteinausbeute nicht zufrieden stellend war. In Versuchen von Navarrete *et al.* (141) mit *S. cerevisiae* zeigte sich die größte Effektivität zur Solubilisierung von Proteinen aus der Plasma- und Mitochondrienmembran bei Verwendung von Zwittergent®-14 und -16. Konzentrationen von lediglich 3-5 mM reichten aus, um einen Großteil der Proteine zu solubilisieren. Aufgrund der hohen CMC erwiesen sich Zwittergent®-8 und -10 in ihren Experimenten als ungeeignet. Die Eignung zwitterionischer Detergenzien für die Solubilisierung von Membranproteinen sollte in dieser Arbeit zu Nutze gemacht werden, um eine evtl. vorhandene antilisteriell wirkende Substanz von/aus der Hefenzellwand/-membran zu lösen.

In dieser Arbeit war mit einer Konzentration von 1 % (= 35,8 mM) oder 2 % (= 71,6 mM) Zwittergent® 3-08 kein erwähnenswerter Einfluss auf das Hemmvermögen der *P. norvegensis* WSYC 592 zu beobachten, da die Listerien nach 24 Stunden Cokultivierung vollständig bzw. nahezu vollständig gehemmt werden konnten (Abb. 12). Die ausbleibende Hemmung könnte in der hohen CMC des Zwittergent® 3-08 von 330 mM begründet sein, die hier mit beiden Konzentrationen nicht erreicht wurde. Aufgrund des monomeren Zustandes des Detergens konnte möglicherweise kein antilisteriell wirkendes Protein aus der Zellwand/-membran gelöst werden, sodass es für eine Inhibierung der Listerien zur Verfügung stehen konnte.

CHAPS

Das zweite getestete zwitterionische Detergens CHAPS vereint die erwünschten Eigenschaften der Sulfobetaine und der Gallensalze in einem Detergens - die polare Kopfgruppe und den hydrophilen Schwanz (91). Zwar solubilisierten Navarrete *et al.* (141) mit Hilfe von CHAPS keine nennenswerte Proteinmenge, doch dafür waren Aeed *et al.* (8) bei der Solubilisierung der Inositol-Phosphorylceramid-Synthase (IPC Synthase) von *C. albicans* erfolgreich. Bei einer Konzentration von bis zu 4 % CHAPS war hier eine nahezu unveränderte Aktivität der IPC Synthase zu registrieren. Indes konnte in der gleichen Studie die IPC Synthase in Gegenwart von Zwittergent® 3-10 zwar solubilisiert, nicht aber in ihrer aktiven Form wiedergefunden werden. Dies verdeutlicht erneut die Problematik der unterschiedlichen Wirksamkeit der verschiedenen Detergenklassen und auch der Detergenzien einer Klasse. Neben der Solubilisierung der IPC Synthase (lokalisiert im Golgikomplex), war es mit Hilfe von CHAPS möglich, in den Studien von Mol *et al.*

(137) und Dotson *et al.* (60) zwei weitere integrale Membranproteine, eine Glucansynthase (Plasmamembran) (137) und eine Protein-Mannosyltransferase 1 (PMT1) (Endoplasmatisches Retikulum) (60), aus Hefen in ihrer aktiven Form zu solubilisieren.

In Anwesenheit einer Konzentration von 0,5 % (v/v) CHAPS (= 8,15 mM) bei Co-kultivierung des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 mit *P. norvegensis* WSYC 592 wurde die Hemmaktivität der Hefe vollständig aufgehoben (Abb. 12). Das Detergens selbst hatte keinen inhibitorischen Einfluss auf das Wachstum der Listerien und Hefen (Tab. 8). Die Aufhebung der Hemmung ist demnach auf das CHAPS zurückzuführen, das mit 0,5 % (v/v) (= 8,15 mM) bzw. 2 % (v/v) (= 32,5 mM) die CMC von 6 mM erreichte und somit in der Lage war, vorhandene Proteine bzw. Strukturen aus der Hefenzellwand/-membran herauszulösen.

4.4 Das Sekretom von *P. norvegensis* WSYC 592

Nach Fällung des Überstandes einer 24 Stunden alten Kultur von *P. norvegensis* ließen sich die Proteine im SDS-Gel nur in degradierter Form wiederfinden (Daten nicht gezeigt). Das Expressionssystem *P. pastoris* ist bekannt dafür sekretierte Proteine durch extrazelluläre Proteasen (40) oder auch Proteine während des Sekretierungsprozesses (187) bzw. der Expression (90) intrazellulär zu degradieren. Der proteolytische Effekt kann durch die Gegenwart von Hefeextrakt und Pepton im Kultivierungsmedium, durch die Zugabe freier Aminosäuren (44) oder auch durch das Ernten der Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (164) reduziert werden.

Aus diesem Grund wurden die Hefezellen bereits nach zehn Stunden Kultivierung geerntet und in Parallelansätzen der Proteasehemmer Pefabloc zugesetzt. Da Unterschiede im Bandenmuster des SDS-Gels (Abb. 13) bei An- oder Abwesenheit des Proteasehemmers nicht festgestellt wurden, kann dies bedeuten, dass der Proteasehemmer zu niedrig konzentriert zum Einsatz kam, obwohl die verwendeten Konzentrationen den Empfehlungen laut Herstellerangaben entsprachen. Oder es handelte sich nicht um Serinproteasen gegen die Pefabloc wirksam ist.

Unterschiede im Sekretom bei Kultivierung der Hefe WSYC 592 mit Glucose bzw. Lactat als C-Quelle, die sich in der eindimensionalen SDS-PAGE ergaben, konnten nach der zweidimensionalen Auftrennung nicht wiedergefunden werden. Die

mit weißen Rechtecken gekennzeichneten Spots waren zwar bei beiden C-Quellen zu erkennen (Abb. 14), doch kamen sie im Falle des Lactat als sog. *trains* oder *train spots* vor. Die *trains* entstehen durch eine pI-Heterogenität, die auf unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen oder auf unterschiedliche dreidimensionale Strukturen (Isoformen) eines Polypeptids (19) hindeuten. Auffällig war die Anzahl der exprimierten Proteine, wenn Glucose als C-Quelle diente. Die Anzahl der Spots fiel im Vergleich zu Lactat um ein Vielfaches höher aus. Es hat den Anschein, Lactat verhindere die Expression vieler Proteine. Darunter könnte(n) sich womöglich auch ein (oder mehrere) für die antilisterielle Aktivität verantwortliche(s) Protein(e) befinden, wie z.B. eines der Spots von G3 bis G8 oder möglicherweise ein Spot, der mit dem weißen Rechteck gekennzeichnet ist. Durch posttranslationale Modifikation könnte sich das Protein so verändert haben, dass es seine Funktion verloren oder verändert hat und unwirksam wurde. Für eine konkrete Aussage müssten die Spots ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF-MS sequenziert werden, doch dies ging über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinaus. Bei der Identifizierung der Proteine besteht das Problem, dass *P. norvegensis* noch nicht sequenziert ist. Behelfsweise müsste hierbei die nächstverwandten Spezies *P. angusta* (32) herangezogen werden, die eine Homologie in der 26S rDNS-Sequenz von 81 % aufweist und deren Genomsequenzierung bereits im Gange ist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>). Die beiden Spezies *P. stipitis* und *P. pastoris* sind bereits vollständig sequenziert, zeigen jedoch eine geringere Homologie von 62 % bzw. 28 % in der 26S rDNS-Sequenz und sind im phylogenetischen Baum entsprechen weit von *P. norvegensis* entfernt (109).

Lohnenswert erscheint auch die Untersuchung des Sekretoms von *L. monocytogenes* WSLC 1364, die aber über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausging. Zum einen wäre der Vergleich des Sekretoms des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 zwischen Cokultivierungen mit der aktiven Hefe WSYC 592 bzw. der Kontrollhefe WSYC 623 interessant, zum anderen der Vergleich zwischen Cokultivierungen mit Glucose und Lactat, so wie bei *P. norvegensis* WSYC 592 geschehen.

4.5 Kultivierung von Hefen und Listerien in getrennten Kompartimenten

Bei den Kultivierungsversuchen in getrennten Kompartimenten konnte trotz räumlicher Trennung der Hefen und Listerien eine deutliche Hemmung des Indikatorstammes *L. monocytogenes* WSLC 1364 registriert werden. Wurden die Transwells® der Firma Corning mit einer Porengröße von 0,4 µm verwendet, so konnte die Hefe WSYC 592, im Vergleich zur Kontrollhefe WSYC 623, den Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364 um ca. drei Zehnerpotenzen in ihrem Wachstum inhibieren, wenn ein Titer von 10² KbE/mL eingesetzt wurde (Tab. 10). Bei Verwendung des höheren Listerientiters (10⁴ KbE/mL) wurde bei Cokultivierung mit der hemmenden Hefe WSYC 592, im Vergleich zur nicht-hemmenden Kontrollhefe WSYC 623, eine um eineinhalb bzw. ca. drei Zehnerpotenzen niedrigere Listerienzellzahl festgestellt. Auffällig war die im Vergleich niedrigere Hemmung des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364, wenn sich *P. norvegensis* WSYC 592 im oberen Kompartiment befand. Die Hefen setzten sich während der Kultivierung im oberen Kompartiment trotz der Verwendung eines Schüttlers auf der Membran ab und bildeten einen Belag, der möglicherweise den Stoffaustausch zum unteren Kompartiment, in dem sich in diesem Fall die Listerien befanden, herabgesetzt haben könnte. Dies wäre eine Erklärung für die geringere Hemmung der Listerien in dieser Kompartimentaufteilung. Bei Verwendung der Zellkultureinsätze (Nunc) mit einem kleineren Porendurchmesser (0,2 µm) wurden die Listerien durch die aktive Hefe WSYC 592, im Vergleich zur Kontrollhefe WSYC 623, lediglich um ca. eine bis eineinhalb Zehnerpotenz in ihrem Wachstum inhibiert (Tab. 11). Dass das unterschiedliche Membranmaterial der beiden Hersteller die verminderte Hemmung der Listerien bei Verwendung der kleineren Porengröße verursacht haben könnte, ist nicht sehr wahrscheinlich, lässt sich aber nicht ganz ausschließen. Die Membran der Firma Corning besteht aus hydrophilem Polycarbonat mit einer niedrigen Bindungskapazität für Proteine und eignet sich mit der gewählten Porengröße laut Hersteller für Transportstudien. Ihre Porendichte liegt mit 10⁸ Poren pro cm² eine Zehnerpotenz unter der der Anopore™-Membran der Firma Nunc. Daneben ist die Oberflächenporosität der Polycarbonatmembran im Vergleich zur Anopore™-Membran niedriger, deren Oberflächenporosität 40-50 % beträgt. Die Keramik-ähnliche Anopore™-Membran weist ebenfalls eine sehr niedrige Bindungskapazität auf; hier stellt das Binden der aktiven Substanz an die Membran

eine zu vernachlässigende Fehlerquelle dar. Um den Faktor einer möglichen Bindung der antilisteriellen Substanz an das Membranmaterial auszuschließen, wurden die Membranen beider Hersteller im Vorfeld mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA, GE Healthcare) gesättigt. Bei einer „Co“kultivierung mit den vorher gesättigten Membranen konnte keine unterschiedliche Hemmung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Es entstand der Eindruck, die Hemmung der Listerien in den Transwells könnte durch eine einfache Nährstoffkonkurrenz begründet sein. Demnach würde der aktive Hefestamm WSYC 592 schneller als der Kontrollstamm WSYC 623 wachsen und den Listerien die Nährstoffe entziehen, was ein schlechteres Listerienwachstum zur Folge hätte. Zur Überprüfung des Hefenwachstums wurden die Stämme WSYC 592 und WSYC 623 in Abwesenheit des Listerienindikatorstammes WSLC 1364 in den Transwells kultiviert und die Zellzahlen bestimmt (Abb. 15). Die Zellzahlbestimmungen wurden stets mit separaten Transwells durchgeführt. Der sich auf der Membran oder dem Boden der Kavität gebildete Hefezellrasen wurde durch die Probenentnahme zerstört, sodass ein für die Zellzahlbestimmung verwendetes Transwell nicht erneut für eine Bestimmung der Zellzahl herangezogen wurde. Ein unterschiedliches Anwachsen der untersuchten Hefen war zu den oben erwähnten Zeitpunkten nicht festzustellen. Eine Nährstoffkonkurrenz als Grund für die Hemmung der Listerien konnte demnach ausgeschlossen werden.

Da der Durchmesser der Listerienzellen ca. 0,4 μm beträgt, ist nicht von der Hand zu weisen, dass evtl. Listerienzellen zum Teil durch die Membran schlüpfen oder hinausragen konnten. Die Möglichkeit, dass die aus der Polycarbonatmembran ragenden oder durch sie hindurchschlüpfenden Listerienzellen den Hemmmechanismus der Hefen aktiviert haben könnten scheint unwahrscheinlich, da die kontaktinduzierte Hemmung mit dem nachfolgend beschriebenen Experiment widerlegt werden konnte.

Die Inaktivierung einer Hefekultur von *P. norvegensis* WSYC 592 erfolgte zum einen mittels einer Zelmühle, zum anderen durch Autoklavieren, sodass im Falle der ribolysierten Hefezellen nur noch Zellbruchstücke zurückblieben. Die inaktivierten Hefezellen bzw. Zellbruchstücke riefen in Cokultivierungen auf Festmedium mit einem Listerientiter von 6 KbE/cm² keine Reduktion der Listerienzellzahlen

hervor. Dies spricht gegen eine Auslösung des Hemmmechanismus durch eine Oberflächenstruktur der Hefezellen oder direkten Zell-Zell-Kontakt. Vielmehr sind offenbar lebende, sich vermehrende Hefezellen nötig, die in der Lage sind fortwährend die antilisterielle(n) Substanz(en) nachzuproduzieren, um die Hemmung der Listerien zu ermöglichen.

4.6 Inaktivität des Kulturüberstandes

4.6.1 Killertoxin-Assay

Von Hefen sekretierte Proteine mit antimikrobieller Wirkung, sogenannte Killertoxine, sind in der Literatur mehrfach beschrieben worden (123). Einerseits wird ihnen lediglich eine Hefen-spezifische Wirkung nachgesagt (129), doch andererseits wiesen Polonelli *et al.* (153) den Killertoxinen eine antibakterielle Wirkung nach. Im Genus *Pichia* finden sich einige Killertoxin-Produzenten, wie z.B. die Spezies *P. acaciae*, deren aktive Stämme ein Plasmid-kodiertes, aus drei Untereinheiten bestehendes Toxin sekretieren, das ein Anhalten der Zellteilung in der G₁-Phase verursacht (133). Ein weiteres Toxin, welches bei *P. kluyveri* chromosomal kodiert ist, induziert die Bildung von Ionenkanälen, die u.a. zu einem Verlust von Kaliumionen und ATP führen (123). Dem in dieser Arbeit untersuchten Stamm *P. norvegensis* WSYC 592 konnte keine Killertoxinaktivität, wie in der Literatur mehrfach gezeigt (Abb. 36), nachgewiesen werden. Laut dem modifizierten Assay nach Provost *et al.* (156) war beim Stamm WSYC 592 weder gegen nahverwandte Hefenspezies (Abb. 16), noch gegen vier Listerienspezies eine Hemmaktivität beobachtet worden.

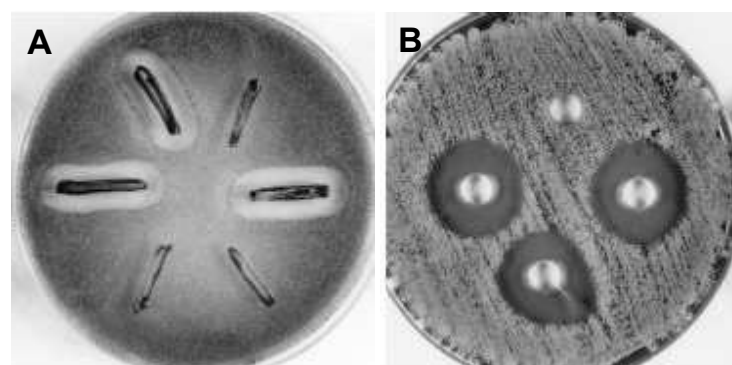


Abbildung 36. Killertoxin-Assay. A, B: Hemmung von *C. albicans* durch verschiedene „Killerhefen“. Abbildung entnommen aus Magliani *et al.* (123).

4.6.2 Diffusionsversuche in Soft-Agar

Der Theorie einer Bakteriozin-ähnlichen Substanz wurde ebenfalls nachgegangen. Bei den Bakteriozin-produzierenden Bakterienstämmen ist/sind die antibakterielle/n Substanz/en nicht nur in der Bakterienkultur, sondern auch im zellfreien Kulturüberstand zu finden (9, 64, 202). Verschiedene Versuche mit dem Kulturüberstand der Hefen zeigten keine antilisterielle Aktivität auf. Der Agar-Membran-Assay zeigte bei Einsatz der Hefekultur des aktiven Stammes WSYC 592 und bei Einsatz der Cokultur des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 mit der aktiven Hefe eine leichte Hemmung des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 im Soft-Agar (Abb. 18 A). Doch da u.a. die Hefekultur des nicht-hemmenden Stammes WSYC 623, die Einzelkultur des Indikatorstammes WSLC 1364 selbst - die in den Soft-Agar eingegossen und danach auf die erstarrte Oberfläche aufgetropft wurde - und eine 0,05 M HCl-Lösung ebenfalls eine Aufhellung im Soft-Agar verursachten, war hier von einer unspezifischen Hemmung durch den niedrigen pH-Wert der Kulturen auszugehen. Die aufgetropften Hefekulturen und Cokulturen wiesen pH-Werte zwischen pH 4 und pH 4,5 auf, die Listerien-Übernachtskultur einen pH-Wert von pH ~5, was die marginale Hemmung der Listerien im Soft-Agar verursacht haben könnte.

Davon ausgehend, dass das Agar-Netzwerk bei 0,8 % (w/v) Soft-Agar zu dicht für eine Diffusion der Substanz gewesen sein könnte, wurde die Agarkonzentration auf 0,4 % (w/v) herabgesetzt. Doch auch hier war keine antilisterielle Aktivität feststellbar.

Die aktive Substanz der *P. norvegensis* WSYC 592 scheint im Soft-Agar nicht diffundieren zu können, wohingegen die antilisterielle Substanz im Flüssigmedium anscheinend diffundieren konnte (siehe Kapitel 3.6). Es könnte sich um mehrere voneinander abhängige Substanzen handeln, die im Agar-Netzwerk nicht miteinander interagieren können, sodass keine Hemmwirkung hervorgerufen werden kann. Auf diese Hypothese wird in Kapitel 4.7 eingegangen.

4.6.3 *Geotrichum candidum* produziert zwei diffusible, antilisterielle Substanzen

Über antilisterielle Hefen ist bisher sehr wenig bekannt. Lediglich Dieuleveux *et al.* (55) konnten beim Milchschnitzschimmel *G. candidum* die beiden Substanzen D-3-Phenyllactat und D-3-Indollactat mit einer bakterioziden Wirkung gegen

L. monocytogenes identifizieren. In ihren Diffusionsversuchen mit dem zellfreien Kulturüberstand von *G. candidum* war eine vierfache Aufkonzentrierung des Überstandes nötig, um eine Hemmung von *L. monocytogenes* im 0,6 %igen Soft-Agar zu beobachten (57). In Kultivierungsversuchen mit 7 mg/mL von kommerziell erworbenem D-3-Phenyllactat waren nach 120 Stunden Kultivierung noch ca. $2,5 \times 10^2$ KbE/mL des mit ca. 10^5 KbE/mL eingesetzten Indikatorstammes *L. monocytogenes* UCMA L205 (Serovar 1/2a) wiederzufinden; in ihrem Kontrollansatz hingegen konnten die Listerien ohne hemmende Substanz bis auf ca. 10^{10} KbE/mL anwachsen (55). Mit dem Einsatz von ca. 10^3 KbE/mL des Indikatorstammes und ebenfalls 7 mg/mL D-3-Phenyllactat waren nach 27 Stunden Kultivierung keine Listerien mehr zu detektieren (55). Die Arbeitsgruppe wies nach, dass etwa ein Zehntel der Menge (mg/mL) an Nisin notwendig war, um einen vergleichbaren Hemmeffekt wie beim D-3-Phenyllactat hervorzurufen. Bezogen auf das Molekulargewicht war im Vergleich zu Nisin eine 210-fache Konzentration (mM) an D-3-Phenyllactat erforderlich. Die Substanz musste somit stark aufkonzentriert werden, um eine Hemmung der Listerien herbeizuführen (55). Genaue Mengenangaben über das von *G. candidum* produzierte D-3-Phenyllactat sind der Arbeit von Dieuleveux *et al.* (58) nicht zu entnehmen. Für eine bessere Vorstellung über die produzierten Mengen an Phenyllactat könnte die Studie von Lind *et al.* (118) herangezogen werden, die 3-Phenyllactat bei Propionsäurebakterien nachwies. Die von ihnen untersuchten Bakterienstämme produzierten zwischen 1 µg/mL (*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*) und 15,1 µg/mL (*P. jensenii*) 3-Phenyllactat. Werden die produzierten Mengen auf den Mikrogrammbereich hochgerechnet, so lässt sich erahnen, welche Volumina an 3-Phenyllactat produzierender Kultur es bedarf, um die im Milligrammbereich benötigten Mengen für die Inhibierung zu erhalten.

In dieser Arbeit wurde, anders als in den oben genannten Studien, nicht mit einer bereits aufgereinigten Substanz, sondern mit Hefekulturen (Flüssigkulturen) gearbeitet. Bei Cokultivierungen in Kulturen (5 mL) der aktiven Hefe WSYC 592 mit ca. 10^5 KbE/mL des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 wurde bereits nach zwei Stunden eine Zellzahlreduktion von anderthalb Zehnerpotenzen nachgewiesen (Abb. 4). Nach sechs Stunden Cokultivierung kam es teilweise zu einer Reduzierung der Listerien bis unter die Nachweisgrenze. Bei den Cokultivierungen auf Festmedium mit einem eingesetzten Titer von über 10^5 KbE/cm² des Indikator-

stammes WSLC 1364 waren nach 21 Stunden Cokultivierung keine Listerien mehr nachweisbar (Abb. 3). Aufgrund der unterschiedlichen Stärke und Schnelligkeit der bakteriziden Wirkung der von *P. norvegensis* WSYC 592 produzierten Substanz(en) gegenüber *L. monocytogenes* WSLC 1364, im Vergleich zu den Versuchen von Dieuleveux *et al.* (55), ist bei *P. norvegensis* WSYC 592 von einem anderen Hemmprinzip als bei *G. candidum* auszugehen. Von 3-Phenyllactat als inhibierende Substanz ist in der vorliegenden Arbeit nicht auszugehen.

4.6.4 Wachstum von *L. monocytogenes* WSLC 1364 in Hefe- und Cokulturüberständen

Die Kulturüberstände bei den bisher dargestellten Versuchen waren durchweg sterilfiltriert, um sie von den Hefezellen zu separieren. Um die Gefahr auszuschließen, die aktive Substanz könnte im Filtermaterial verbleiben, wurden die Hefekulturen bzw. Cokulturen mehrfach abzentrifugiert und die Überstände anschließend in den Cokultivierungen verwendet. Auch diese Überstände konnten keine Hemmung der Listerien herbeiführen. Bei der Cokultivierung wurde durch den Kontakt der aktiven Hefe WSYC 592 mit den Listerien scheinbar keine Substanz freigesetzt, die bei der anschließenden Cokultivierung mit dem Cokulturüberstand eine Induzierung der Hemmung hätte auslösen können. Das Abzentrifugieren der Cokultur erfolgte bei 2.500 x g schonend, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine evtl. freigesetzte antilisterielle Substanz hierbei nicht mit abzentrifugiert wurde, falls sie im Überstand gewesen wäre. Ghalfi *et al.* (75) zentrifugierten in ihren Versuchen die Bakterienkultur vor erfolgreicher Gewinnung des Bacteriozins sogar bei 10.000 x g ab.

Wäre anzunehmen, dass die gesuchte antilisterielle Substanz nicht freigesetzt wird, sondern an die Hefenzelloberfläche gekoppelt ist, so müsste trotz des Abzentrifugierens der Hefezellen mit der evtl. gekoppelten Substanz ein geringer Teil der Substanz im Überstand nachzuweisen sein.

4.7 Untersuchung eines Komplementsystem bei Hefen

Aufgrund der bisherigen Untersuchungsergebnisse, der Inaktivität des Kulturüberstandes und der signifikanten Hemmung der Listerien trotz räumlicher Trennung, drängte sich die Überlegung auf, dass es sich nicht nur um eine, sondern um mehrere, evtl. voneinander abhängige Substanzen handeln könnte, die für den

Hemmmechanismus nötig bzw. verantwortlich sind. Dies ergäbe eine in Betracht zu ziehende Erklärung für das Ausbleiben der antilisteriellen Aktivität der Kulturüberstände in den Soft-Agar-Assays. Denkbar wäre, dass die Substanzen im 0,8 bzw. 0,4 %igen (w/v) Soft-Agar nicht frei diffundieren konnten und deshalb nicht zur nächsten Substanz gelangten, um eine evtl. nötige Signalkaskade auszulösen. Ein solcher Abwehrmechanismus ist u.a. im menschlichen Organismus vorzufinden. Das sogenannte Komplementsystem, ein hoch entwickelter Teil des angeborenen Immunsystems, trägt zur Verstärkung der körpereigenen Immunabwehr bei (100). Es besteht aus über 30 im Blutplasma enthaltenen Proteinen, die miteinander interagieren können und über mehrere proteolytische Zwischenschritte zu einer entzündlichen Immunantwort, einer Opsonierung (Markierung) von Pathogenen oder ihrer Lyse führen (100). An diesem Punkt stellte sich die Frage, ob Hefen und/oder Pilze über ein, dem Komplementsystem ähnliches, Abwehrsystem verfügen.

Nonaka *et al.* (143-146) befassten sich in ihren Studien u.a. mit der Aufklärung des Ursprungs des Komplementsystems. Nonaka & Yoshizaki (146) gliederten die Entwicklung des Komplementsystems in drei Stadien. Im frühen Stadium des Komplementsystems, vom Auftreten der Metazoa bis zum Auftreten der Deuterostomier, entstanden die meisten Domänstrukturen, doch eindeutige Domänenkombinationen bzw. Funktionen fehlten. Im Laufe des primitiven Stadiums, vom Auftreten der Deuterostomier bis zum Auftreten der Gnathostomata, etablierten sich die meisten Komplement-spezifischen Domänenkombinationen. Im anschließenden modernen Stadium erfolgte die Aneignung neuer Komponenten und die Entwicklung eines, wie nachfolgend beschrieben, hoch entwickelten Systems.

Einige Komponenten des Komplementsystems, wie z.B. C3 und Faktor B, wurden in Spezies der Invertebraten, wie Seeigeln (Echinodermata) und Seescheiden (Tunicata), gefunden. Beide gehören den Deuterostomiern an, den Vorfahren aller Wirbeltierarten, und deuten somit auf einen sehr alten Ursprung des Komplementsystems hin (145, 179). Zudem deutet die Abwesenheit der Gene der Komponenten C3 und Faktor B in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* auf ein alleiniges Vorhandensein dieses Systems bei den Deuterostomiern hin (145). Die bisherigen Fakten deuten auf ein Fehlen eines Komplement- oder Komplement-ähnlichen Systems bei Hefen und Pilze hin.

Davon ausgehend, dass C3, die wichtigste Komponente des humanen Komplementsystems, als Indikator für das Vorhandensein eines möglichen Komplementsystems diene, blieb die Suche nach homologen Strukturen bei Hefen und Pilzen weitestgehend erfolglos. Eine Datenbankrecherche bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ergab eine Homologie des humanen C3 zu einer 34 Aminosäure langen Sequenz des Ncr1-Proteins von *S. cerevisiae* von 32 %. Auch in den Hefen *K. thermotolerans*, *P. guilliermondii* und *Yarrowia lipolytica* konnte eine Homologie zu diesem Protein gefunden werden, welches in der Vakuolenmembran lokalisiert und am Sphingolipid-Metabolismus involviert ist. Zhang *et al.* (200) zeigten, dass das Ncr1p bei endozytischen Transportwegen in Hefen nicht essentiell ist. Das Ncr1p ist ein Ortholog zum Niemann Pick C1 (NPC1)-Protein in Säugetierzellen (intrazellulärer Transport von Cholesterol), zu dem es über 35 % Homologie in der Aminosäuresequenz aufweist; außerdem besitzen die beiden Proteine nahezu gleiche Hydrophobizitäts Plots (200). Mam33p stellt ein weiteres Beispiel für das Fehlen eines Komplementsystems in Hefen dar. Die Sequenz des Mam33p zeigte eine Ähnlichkeit zu gC1q-R, einem Rezeptor der Komponente C1q des humanen Komplements, doch das lösliche Protein Mam33p ist in Mitochondrien von *S. cerevisiae* lokalisiert und an der Sortierung des Cytochrom b₂ beteiligt (176). Auch wenn vereinzelt Ähnlichkeiten der Komplementkomponenten zu Proteinen bei Hefen gefunden wurden, so wiesen sie keine Funktion auf, die mit einem Abwehrmechanismus in Verbindung gebracht werden konnten.

Weiterhin ist anzumerken, dass der Membranangriffskomplex (*membrane attack complex*, MAC), einer der wichtigsten Effekte der Komplementaktivierung, nur gegen gramnegative Bakterien wirksam ist (165). Dem MAC, der zur Porenbildung und schließlich zur Zerstörung der Zielzelle führt (100), ist es nicht möglich die Peptidoglycanschicht grampositiver Bakterien, z.B. von *L. monocytogenes*, zu durchdringen. Ein MAC ist demnach als antilisteriell wirkender Mechanismus der *P. norvegensis* auszuschließen.

Neben Nonaka & Yoshizaki (146), die bereits über die Abwesenheit Komplementspezifischer Domänstrukturen bzw. Domänkombinationen innerhalb der Hefe *S. cerevisiae* berichteten, bestätigte auch Lambris (111) die Abwesenheit eines Komplement- oder Komplement-ähnliches Systems bei Pilzen und Hefen. Die beobachtete Hemmung der Listerien bei der Kultivierung der Organismen in getrenn-

ten Kompartimenten und das Ausbleiben einer Hemmung in den Soft-Agar-Diffusionsversuchen ist nicht durch eine Art Komplementsystem zu erklären. Der Hemmwirkung der *P. norvegensis* WSYC 592 liegt demzufolge ein anderes Wirkprinzip zugrunde.

4.8 Interpretation der REM-Aufnahmen und ihre Bedeutung für das Hemmprinzip der *P. norvegensis* WSYC 592

Durch REM-Aufnahmen von Cokultivierungen auf Festmedium sollte dem Wirkprinzip der *P. norvegensis* WSYC 592 näher gekommen werden. Bei näherer Betrachtung der REM-Aufnahmen in Abbildung 19 war den Zellen des Listerien-Indikatorstammes WSLC 1364 scheinbar keine veränderte Zellmorphologie anzumerken. Unübersehbar waren die sehr langen Listerienzellen nach 24 Stunden Cokultivierung mit der aktiven Hefe WSYC 592, wie z.B. in Abbildung 19 h, k. Doch sowohl in Anwesenheit der nicht-hemmenden Kontrollhefe *Pichia* sp. WSYC 623 (Abb. 19 e), als auch im Listerien-Kontrollansatz bei Abwesenheit der Hefen (Abb. 19 a), waren solche sehr langen Listerienzellen zu beobachten. Der Anteil dieser „über“langen Listerienzellen betrug jedoch weniger als 1 % der gesamten Listerienzellen, sodass ausgeschlossen werden konnte, dass nicht-teilungsfähige Listerienzellen die ausschlaggebende Ursache für das Zellsterben war. Mit Ausnahme der Zellreste in Abbildung 20, die möglicherweise vom Listerien-Indikatorstamm WSLC 1364 stammten und die keine allgemeine Tendenz wiedergaben, waren keine Hinweise auf lysierte Listerienzellen zu finden. Die Listerienzellen sahen nach Cokultivierungen über 24 Stunden mit der hemmenden oder auch der nicht-hemmenden Hefe immer noch vital aus (Abb. 19); im Gegensatz zu den *Scanning Electron Microscope* (SEM)-Aufnahmen von Dieuleveux *et al.* (56). In ihrer Studie inkubierten Dieuleveux *et al.* *L. monocytogenes* über 14 Stunden mit 1 mg/mL D-3-Phenyllactat, was zu einer deutlichen bis vollständigen Beschädigung und/oder Verformung der Listerienzellwand führte (Abb. 37 a, b). Bei der Kultivierung von *L. monocytogenes* mit 7 mg/mL D-3-Phenyllactat über 27 Stunden wurde die Zellwand aufgebrochen, sodass der Zellinhalt austrat und nur noch die Zellhülle übrig blieb (Abb. 37 c) (56). Die antilisterielle Substanz der *P. norvegensis* WSYC 592 veränderte anscheinend nicht die Zellmorphologie der Listerien. Mit Hilfe der REM-Aufnahmen konnte Zellyse als Ursache für das Zell-

sterben ausgeschlossen werden. Dieser Befund fand durch das Ergebnis des nachfolgend beschriebenen Experiments Bestätigung.

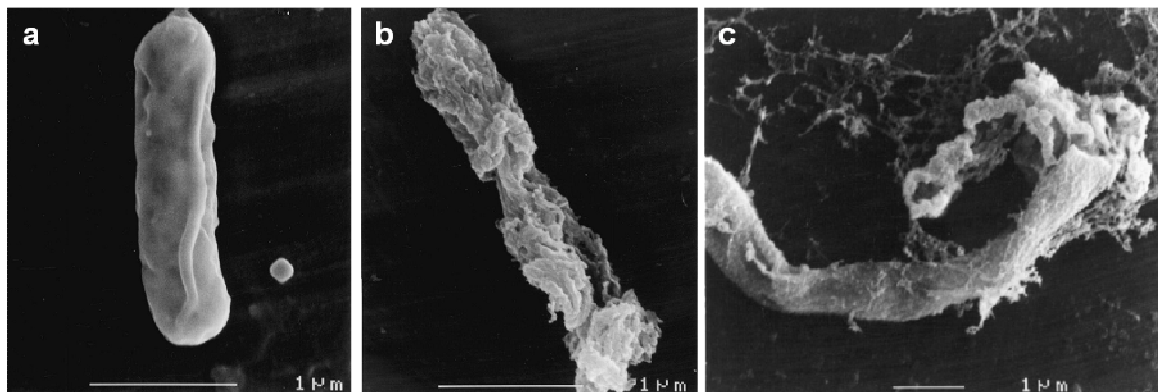


Abbildung 37. *L. monocytogenes* nach Inkubation mit 1 mg/mL D-3-Phenyllactat über 14 h (a, b) bzw. mit 7 mg/mL D-3-Phenyllactat über 27 h (c). (Abb. entnommen aus Dieuleveux *et al.* (56)).

Bei der Cokultivierung von *L. monocytogenes* WSLC 1364 in einer Flüssigkultur von *P. norvegensis* WSYC 592 über 24 Stunden wurde die Listerien-Gesamtkeimzahl mit Hilfe einer Zählkammer und die Lebendkeimzahl der Listerien durch Plattieren auf Oxford-*Listeria*-Selektivagar (Sifin) bestimmt. Während die Lebendkeimzahl des Listerien-Indikatorstammes innerhalb von 24 Stunden bis auf Null sank, konnte der eingesetzte Listerientiter mit Hilfe der Zählkammer wiedergefunden werden (Abb. 22). Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtungen der REM-Analyse, sodass eine Zelllyse als Ursache für das Absterben der Listerienzellen ausgeschlossen werden konnte.

Bei den globulären Vesikeln, die sich in einigen Präparaten u.a. auf der Hefenzelloberfläche befanden (Abb. 21 c-e), handelte es sich nicht um Knospen oder Knospungsnarben, die in Abbildung 22 a, b dargestellt sind. Das Genus *Pichia* ist fähig terminale als auch periphere Knospen zu bilden (173), doch auch die peripheren Knospen sollten Narben hinterlassen, was die Aufnahmen der Präparate in den Abbildungen 19 und 21 nicht belegten. Um Ascosporen, die *Pichia* ssp. bei geschlechtlicher Fortpflanzung bilden kann, handelt es sich hier ebenfalls nicht, da die Ascosporen unverwechselbar hutförmig, halbkugelig oder saturnförmig auftreten (161). Die Vesikel konnten auch auf den Listerienzellen und der Agaroberfläche wiedergefunden werden. Im Hinblick auf die Konsortien aus Hefen- und Listerienzellen (Abb. 19) könnte es sich bei diesen Vesikeln evtl. um lysierte Listerienzellen handeln, was aber wiederum im Gegensatz zu den vorangegangenen Beobachtungen steht.

bachtungen stünde. Möglich wäre, dass es sich um sekretorische Vesikel der Hefen handelt, in denen *P. norvegensis* WSYC 592 die antilisteriell wirksame(n) Substanz(en) nach außen transportiert.

In einem Anschlussprojekt könnte der interessante Aspekt der sekretorischen Vesikel genauer untersucht werden. Sollte es sich bei diesen Strukturen tatsächlich um sekretorische Vesikel handeln, so könnte ihr Transport zur Plasmamembran gestoppt werden. Beim Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran sind Hefenhomologe SNARE-Proteine involviert (87), wobei Sso1p und Sso2p Syntaxin-Homologe (5) und Snc1p und Snc2p Synaptobrevin-Homologe (155) darstellen. Da die entsprechenden Gene, die für die genannten Proteine codieren, in *P. pastoris* bereits identifiziert sind (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/genomes/>), könnten mit Hilfe der Gensequenzen Deletionsmutanten des aktiven *P. norvegensis*-Stammes WSYC 592 aus dieser Arbeit erstellt werden. Weiterhin erschließt sich die Möglichkeit andere Gene zu deletieren, codierend für Proteine, die am vesikulären Transport in Hefen verantwortlich sind, wie z.B. die lange Reihe der Sec- oder Vps-Proteine (157). In Betracht kommt auch eine Behandlung des aktiven Hefestammes WSYC 592 mit dem Lacton-Antibiotikum Brefeldin A (BFA), das den Transport vieler Proteine blockiert (128). Nach erfolgreicher Deletion der betreffenden Gene könnten die Transport-defizienten Mutanten des Stammes WSYC 592 auf ihre antilisterielle Aktivität überprüft werden. Eine Verminderung oder ein Ausbleiben der Hemmaktivität könnte bedeuten, dass eine antilisterielle Substanz über sekretorische Vesikel aus der Hefezelle transportiert wird.

Bei den globulären Vesikeln auf und um die Zellen in Abbildung 21 c-f könnte es sich auch lediglich um ein von den Hefen sekretiertes Polysaccharid (173) handeln. Viele Mikroorganismen, darunter auch Pilze und Hefen, synthetisieren Exopolysaccharide (EPS), die aufgrund ihrer verschiedensten Eigenschaften in der Lebensmittel-, pharmazeutischen und Erdölindustrie, sowie im medizinischen Bereich ihren Einsatz finden (180). Das von der *P. norvegensis* WSYC 592 produzierte und extrahierte EPS wurde mittels Soft-Agar-Assay mit ausbleibendem Erfolg auf seine antilisterielle Aktivität überprüft.

4.9 Zusammenfassung der Erkenntnisse über *P. norvegensis* WSYC 592

Zum antilisteriellen Wirkmechanismus der Hefe *P. norvegensis* WSYC 592 lässt sich zusammenfassend sagen, dass die antilisterielle Aktivität nicht im Kulturüberstand vorzufinden war. Eine Hemmung trat nur bei Cokultivierung der Hefe mit *L. monocytogenes* WSLC 1364 auf Fest- oder in Flüssigmedium auf, bei denen die Organismen direkten Zellkontakt hatten. Die Tatsachen, dass sich eine signifikante Hemmung der Listerien auch ohne direkten Zell-Zell-Kontakt ergab, als die Organismen in getrennten Kompartimenten kultiviert wurden, und dass die inhibitorische Wirkung durch die Zufuhr von Glucose, Fructose oder Mannose wieder auftrat, lassen auf eine oder mehrere instabile und diffundierbare Substanz(en) schließen, die zur Inhibierung der Listerien fortwährend produziert werden muss/müssen.

***Staphylococcus equorum* WS 4524**

4.10 Molekularbiologische Untersuchungen

4.10.1 Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA)

Mit der Analyse der kompletten Sequenz der 16S rDNS können in der Regel viele Bakterien klassifiziert werden (115, 131). Bei der Gattung *Staphylococcus* zeigt die 16S rDNS-Sequenzen verschiedener Spezies allerdings eine hohe Ähnlichkeit, sodass eine Identifizierung mit dieser Methode nicht möglich ist (95). Hier eignet sich eine Restriktionsanalyse der rDNS, die für Identifizierungen auf Speziesebene genutzt werden kann. Mit der ARDRA-Methode werden ungefähr 50 % des rDNS-Operons amplifiziert, wobei ein Teil der 16S rDNS, die 16S-23S rDNS Interspacer Region und ein Teil der 23S rDNS enthalten sind (193). Diese zuverlässige und schnelle Methode ermöglicht es Isolate auf Speziesebene zu differenzieren und zu identifizieren (94, 192). Die Resultate der ARDRA stimmen mit partiellen Sequenzierungen der 16S rDNS gut überein (93).

Die Zugehörigkeit der vier Stämme WS 4523, WS 4524 und WS 4525 zur Spezies *St. equorum* fand mit dieser Methode Bestätigung.

4.10.2 Nachweis eines Peptidsynthetasegens

Das Genus *Staphylococcus* ist bekannt dafür antibakterielle Substanzen zu produzieren (38, 171), wie z.B. das makrocyclische Peptidantibiotikum Micrococcin P₁ (37), welches auch aus *Micrococcus* sp. (88) und *Bacillus pumilus* (7) isoliert werden konnte. Das Micrococcin bindet an einen Komplex, geformt durch das Protein L11 und die 23S rRNS der 50S ribosomalen Untereinheit (166), und verhindert den Elongationsfaktor G-abhängigen Translokationsschritt bei der wachsenden Peptidkette (38). Das Micrococcin wird durch eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS) synthetisiert, deren Gen mittels PCR nachgewiesen werden kann.

Ein ca. 740 bp langes Fragment wurde mit Hilfe degenerierter Primer amplifiziert (Abb. 24). Die anschließende Sequenzierung ergab eine Sequenz von 655 bp (Anhang A). Der Sequenzvergleich ergab eine 98%ige Homologie auf Nukleotid- und Aminosäureebene zur hinterlegten Sequenz der NRPS des Micrococcin-Produzenten *St. equorum* WS 2733 (Anhang B). Dies legt nahe, dass es sich bei der vom Stamm *St. equorum* WS 4524 produzierten antilisteriellen Substanz ebenfalls um das Micrococcin handeln könnte. Zur gänzlichen Absicherung müsste das komplette Peptidsynthetasegen des Stammes WS 4524 amplifiziert und mit der bekannten Gensequenz der Peptidsynthetase des Stammes WS 2733 verglichen werden, doch dies ging über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinaus.

4.10.3 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Pulsfeldgelelektrophorese wird oft als „goldener Standard“ der molekularen Typisierung angesehen. Obwohl die Methode sehr zeitaufwendig ist, ermöglicht sie eine zuverlässige Differenzierung auf Stammebene (149). Durch den enzymatischen Verdau der chromosomalen DNS entstehen Fragmente mit Größen zwischen 30 und 2.000 kb, die ein stammspezifisches Bandenmuster ergeben (172). Die Unterschiede im Bandenmuster können nach Tenover *et al.* (183) interpretiert werden. Demnach sind Isolate mit einem identischen Bandenmuster als derselbe Stamm anzusehen. Als nahverwandt gelten die Isolate, die sich um ein bis drei Banden unterscheiden. Unterschiede von vier bis sechs Banden deuten auf eine mögliche Verwandtschaft hin. Bandenmuster die sich in sieben oder mehr Banden unterscheiden, wie bei den Stämmen *St. equorum* WS 4524 und *St. equorum* WS 2733 in dieser Arbeit (Abb. 25), gelten als unterschiedliche und nicht miteinander verwandte Isolate.

4.11 Antilisterielle Aktivität, Stabilität des unaufgereinigten Hemmstoffes von *St. equorum* WS 4524 und die Sensitivität der Listerien-Indikatorstämme

Durch den Nachweis eines Peptidsynthetasegens in *St. equorum* WS 4524 kam die Vermutung auf, der Stamm könnte ebenfalls das antimikrobielle Peptid Micrococcin P₁ produzieren. Aus diesem Grunde wurden einige Versuche zur Ermittlung der Eigenschaften der antilisteriellen Substanz des Stammes WS 4524 parallel mit dem Micrococcin-Produzenten WS 2733 bzw. mit dessen unaufgereinigten Hemmstoff durchgeführt.

Hinsichtlich der unbeeinträchtigten Aktivität der Substanz nach Hitzebeanspruchung und nach enzymatischer Behandlung durch Proteinase K und Trypsin, stimmten die Substanzen der beiden *St. equorum*-Stämme in diesen Eigenschaften überein (35). Der Substanz von *St. equorum* WS 4524 konnte ein bakteriostatisches Hemmprinzip nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was auch das Wirkprinzip von Micrococcin P₁ ist (37). Lediglich die Sensitivität der Listerien-Indikatorstämme gegenüber den unaufgereinigten Hemmstoffen der beiden *St. equorum*-Stämme unterschied sich etwas. War die Substanz von WS 4524 am wirksamsten bei *L. ivanovii* WSLC 3061, gefolgt von den beiden *L. innocua*-Stämmen WSLC 2339 und WSLC 2394, so war sie gegenüber *L. monocytogenes* WSLC 1364 am unwirksamsten (Abb. 27). Beim Hemmstoff des Stammes WS 2733 reagierten der *L. monocytogenes*-Stamm und die beiden *L. innocua*-Stämme am stärksten, der *L. ivanovii*-Stamm reagierte am schwächsten auf den Hemmstoff (Abb. 38). Zwar war die Hemmzone mit 21 mm beim Indikatorstamm WSLC 3061, im Vergleich zu den anderen Indikatorstämmen, doch war hier die Hemm-

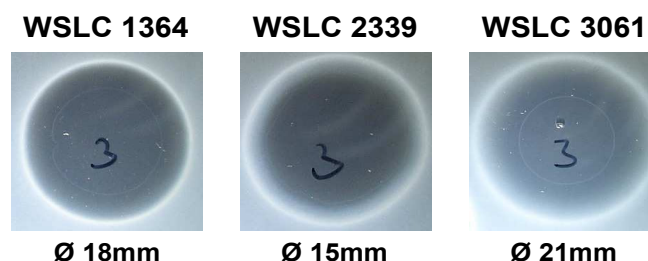


Abbildung 38. Sensitivität der Indikatorstämme *L. monocytogenes* WSLC 1364, *L. innocua* WSLC 2339 und *L. ivanovii* WSLC 3061 gegenüber des unaufgereinigten Hemmstoffes von *St. equorum* WS 2733. Nach dem Auftropfen des Hemmstoffes (je 1 % w/v) wurden die Soft-Agarplatten für 24 h bei 30°C bebrütet und anschließend mittels Schräglicht ausgewertet. Der Durchmesser der Hemmzonen ist unterhalb der Teilabbildungen in mm angegeben. Die handgeschriebenen Ziffern dienen der Codierung und haben hier keinerlei Bedeutung.

stärke im Vergleich zu den beiden anderen Indikatorstämmen deutlich vermindert, erkennbar an der Trübung innerhalb der Hemmzonen.

4.12 Flüssigchromatographie

Bei der antilisteriell wirksamen Substanz von *St. equorum* WS 4524 handelte es sich um ein über 5 kDa großes Molekül oder um ein Molekülaggregat, welches sich durch 6 M Harnstoff nicht dissoziieren ließ. Das Micrococcin P₁ von *St. equorum* WS 2733 kann im Kulturüberstand in unterschiedlich großen Aggregaten vorliegen (35). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Aggregate mit Hilfe von 6 M Harnstoff dissoziiert werden, sodass die aktive Substanz aufgrund ihrer Größe in die Poren der Säulenmatrix eindringen konnte und erst gegen Ende des Chromatographielaufes nach einem Volumen von 4 mL eluiert wurde (Abb. 39) Die unterschiedliche dissoziierende Wirkung oder auch die Zugänglichkeit des Harnstoffes auf die beiden Hemmstoffe ist möglicherweise mit dem unaufgereinigten Zustand zu erklären. Es ist anzunehmen, dass der aufkonzentrierte und gefriergetrocknete Kulturüberstand, mit dem die Versuche durchgeführt wurden, viele störende Komponenten enthielt, die mit dem Hemmstoff interagierten und ihn für den Harnstoff unzugänglich machten bzw. seine Eigenschaften verändern könnten.

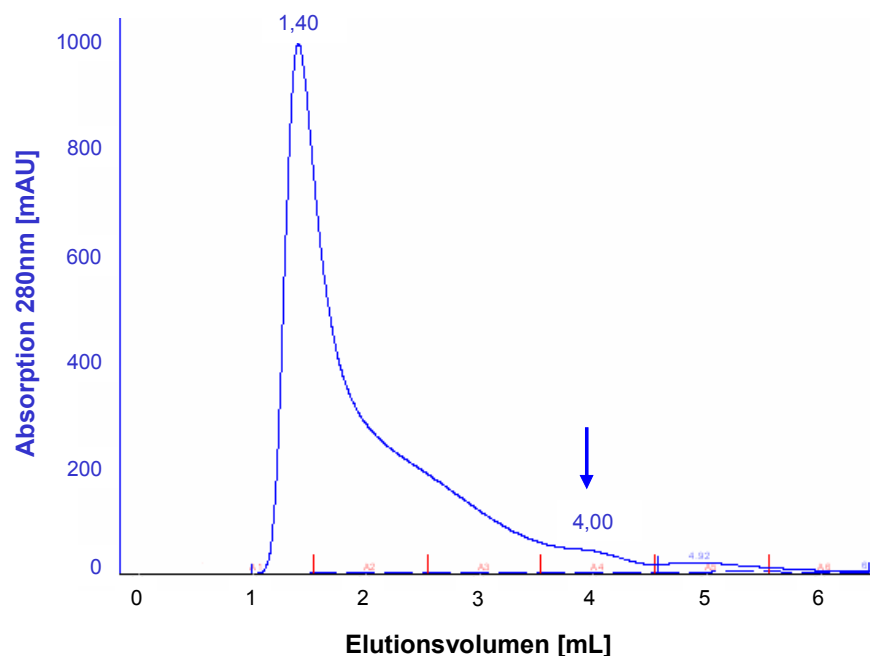


Abbildung 39. Elutionsprofil des unaufgereinigten Hemmstoffes von *St. equorum* WS 2733 unter Verwendung einer HiTrap Desalting Säule (GE Healthcare). Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm in Gegenwart von 6 M Harnstoff. Die Peaks wurden bei den angegebenen Volumina eluiert. Der Pfeil markiert die antilisteriell wirksame Fraktion.

Der unaufgereinigte Zustand des Hemmstoffes von *St. equorum* WS 4524 könnte erklären, dass der Chromatographielauf mit der Superose 6 10/300 GL Gelfiltrationssäule fehlschlug. Mit dieser Säule wurde versucht die Größe der aktiven Substanz zu bestimmen und das Material aufzureinigen. Beim Chromatographielauf waren zwar mehrere Peaks sichtbar (Abb. 33), doch konnte in keiner der Fraktionen eine antilisterielle Aktivität mittels Agar-Spot-Assay festgestellt werden. Eine zu große Verdünnung der aktiven Substanz durch den chromatographischen Lauf konnte als Grund für die fehlende Aktivität ausgeschlossen werden. Bei einer gleichmäßigen Verteilung des Hemmstoffes auf alle aufgefangenen Fraktionen des Chromatographielaufes würde dessen Konzentration mind. 0,008 % je Fraktion betragen. Bei dieser Konzentration war jedoch eine deutliche Hemmzone im Soft-Agar, angeimpft mit dem Indikatorstamm *L. ivanovii* WSLC 3061, sichtbar (Abb. 26). Aufgrund des großen zeitlichen Aufwandes beim Arbeiten mit der Superose 6 10/300 GL Gelfiltrationssäule wurden andere Säulen eingesetzt, um die Substanz näher zu charakterisieren.

Da es sich bei der aktiven Substanz des *St. equorum* WS 4524 ebenfalls um ein Micrococcin mit hydrophobem Charakter (37) handeln könnte, wurden HIC-Säulen mit unterschiedlichen Hydrophobizitätsstärken eingesetzt. Beim Chromatographielauf mit der HiTrap Phenyl-Sepharose 6 FF high sub-Säule wurde in der letzten Fraktion des linearen Gradienten zwischen 11,5 mL und 12,5 mL (Abb. 34) eine starke antilisterielle Aktivität festgestellt, was auf eine hohe Hydrophobizität der aktiven Substanz des *St. equorum*-Stammes WS 4524 hindeutete. Bei den Chromatographieläufen mit den Säulen HiTrap Phenyl-Sepharose 6 FF low sub und Butyl-Sepharose FF, die eine niedrigere Hydrophobizität aufwiesen, wurden Fraktionen mit einer sehr schwachen bzw. keiner antilisteriellen Aktivität aufgefunden.

4.13 Zusammenfassung der Erkenntnisse über *St. equorum* WS 4524

Beim antilisteriell wirkenden *St. equorum*-Stamm WS 4524 wurde ein 655 bp langes Fragment eines Peptidsynthetasegens nachgewiesen, dass eine 98 %ige Homologie zu der NRPS-Sequenz des Micrococcin-Produzenten *St. equorum* WS 2733 aufwies. Der antilisterielle Hemmstoff von *St. equorum* WS 4524 war gegenüber Hitze und proteolytischen Enzymen stabil. Mittels Flüssigchromatographie konnte ein hydrophober Charakter des Hemmstoffes nachgewiesen werden. Diese

Befunde deuten darauf hin, dass es sich bei der von *St. equorum* WS 4524 um das bereits bekannte Micrococcin handeln könnte.

4.14 Ausblick

P. norvegensis

Aufgrund der sehr labilen antilisteriell wirksamen Substanz(en) von *Pichia norvegensis* WSYC 592, die sehr schwer zu lokalisieren ist(sind), sollten noch einige Versuche zum Verständnis des Wirkmechanismus und zur Identifizierung der Substanz(en) durchgeführt werden.

Ein Austausch der Glucose durch Lactat als Kohlenstoffquelle bewirkte ein völliges Ausbleiben der inhibitorischen Wirkung. Diese bemerkenswerte Beobachtung bietet einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Zur genaueren Eingrenzung des Lactateinflusses auf die antilisterielle Aktivität ist die Verwendung von Minimalmedium unumgänglich, womit die Einflüsse der Medienkomponenten gänzlich ausgeschlossen werden könnten.

Eine weitere Möglichkeit ist die Konstruktion von Deletionsmutanten, deren Geneprodukte für den Glucose-/Lactatstoffwechsel verantwortlich sind. Da *P. norvegensis* noch nicht sequenziert ist besteht die Möglichkeit, sich der bereits vollständig sequenzierten Spezies *P. pastoris* oder der zum Teil sequenzierten Spezies *P. angusta* zu bedienen, mit deren Hilfe geeignete Primer designt werden könnten. Auf diese Weise ließe sich eine mögliche Kopplung der antilisteriellen Aktivität an den Glucose-/Lactatstoffwechsel feststellen.

Ein vielversprechender Ansatz sind die Unterschiede im Sekretom der *P. norvegensis* WSYC 592, die während der Cokultivierung mit den Kohlenstoffquellen Glucose oder Lactat auftraten.

Eine gezielte Suche nach dem für die inhibitorische Wirkung verantwortlichen Gens bzw. Operons wäre ein interessanter Lösungsansatz. Genomfragmente von *P. norvegensis* WSYC 592 könnten in das Genom eines nicht-inhibitorischen *P. pastoris*-Stammes kloniert und ein Screening durchgeführt werden, bis eine antilisterielle Aktivität auftreten würde. Mit Hilfe des Cokultivierungsassays in seiner jetzigen Form wäre die Suche nach dem gewünschten Phänotyp sehr arbeits- und zeitintensiv und wäre erst nach Entwicklung einer schnelleren Screening-Methode durchführbar.

Die Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen zeigten globuläre Vesikel an der Oberfläche der Hefezellen, die evtl. von ihnen ausgeschieden werden. Durch differenzierte Zentrifugation könnten sekretorische Vesikel isoliert (87) und auf ihr Vorhandensein einer antilisteriellen Aktivität getestet werden.

Nach der Isolation und Charakterisierung der antilisteriellen Substanz(en) der Hefe *P. norvegensis* könnte(n) sie ihren Einsatz in der Lebensmittelindustrie finden, z.B. bei der Herstellung und/oder Haltbarmachung von Käse, Wurstwaren und *ready-to-eat food*.

L. monocytogenes

Auf Seiten von *L. monocytogenes* könnte die Messung des Membranpotential bzw. des pH-Gradienten (74, 104, 122) der mit *P. norvegensis* kokultivierten Listerien Aufschluss darüber geben, ob die inhibitorische(n) Substanz(en) die Listerienmembran angreifen. Analog zum LiaR/S-Zweikomponentensystem in *Bacillus subtilis*, das zur Detektion von Wirkstoffen dient, die einen Zellwandstress auslösen (130), ließe sich auch mit den analogen Genen Imo1021/1022 in *L. monocytogenes* EGD-e (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList/>) ein ähnliches System entwickeln.

St. equorum

Zur gänzlichen Absicherung, ob es sich bei der von *St. equorum* WS 4524 produzierten antilisteriellen Substanz tatsächlich um ein Micrococцин handelt, sollten weitere Versuche durchgeführt werden. Das Peptidsynthetasegen des *St. equorum* WS 4524 sollte vollständig amplifiziert und die Sequenz mit der NRPS-Sequenz des *St. equorum*-Stammes WS 2733 verglichen werden. Zur weiteren Aufreinigung der aktiven Substanz von *St. equorum* WS 4524 in einem Anschlussprojekt bietet sich die Reversed-Phase (RP)-FPLC bzw. RP-HPLC an, die sich zur Aufreinigung niedermolekularer Substanzen eignet. Für eine eindeutige Identifizierung der Substanz bietet es sich an, die Struktur des antilisteriellen Hemmstoffes des Stammes WS 4524 z.B. per NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie aufzuklären.

Literatur

1. Epidemiologisches Bulletin Nr. 08/2010, 01. März 2010. Robert Koch-Institut.
2. Epidemiologisches Bulletin Nr. 24/2010, 21. Juni 2010. Robert Koch-Institut.
3. Epidemiologisches Bulletin Nr. 49/2006, 08. Dezember 2006. Robert Koch-Institut.
4. 2009. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2008. Robert Koch-Institut.
5. **Aalto, M. K., H. Ronne, and S. Keranen.** 1993. Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *Embo J* **12**:4095-104.
6. **Abbott, D. A., E. Suir, A. J. van Maris, and J. T. Pronk.** 2008. Physiological and transcriptional responses to high concentrations of lactic acid in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **74**:5759-68.
7. **Abraham, E. P., N. G. Heatley, P. Brookes, A. T. Fuller, and J. Walker.** 1956. Probable identity of an antibiotic produced by a spore-bearing bacillus of the *B. pumilus* group with micrococcin. *Nature* **178**:44-5.
8. **Aeed, P. A., A. E. Sperry, C. L. Young, M. M. Nagiec, and A. P. Elhammer.** 2004. Effect of membrane perturbants on the activity and phase distribution of inositol phosphorylceramide synthase; development of a novel assay. *Biochemistry* **43**:8483-93.
9. **Akcelik, O., C. Tukul, G. Ozcengiz, and M. Akcelik.** 2006. Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates, p. 306-13, *Mol Nutr Food Res*, vol. 50.
10. **Allerberger, F., and M. Wagner.** 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect* **16**:16-23.
11. **Aymerich, T., M. G. Artigas, M. Garriga, J. M. Monfort, and M. Hugas.** 2000. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocin A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *J Appl Microbiol* **88**:686-94.
12. **Balows, A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer.** 1992. *The Prokaryotes* 4 Bd, 2 ed, vol. 2. Springer - Verlag, New York.
13. **Bam, N. B., T. W. Randolph, and J. L. Cleland.** 1995. Stability of protein formulations: investigation of surfactant effects by a novel EPR spectroscopic technique. *Pharm Res* **12**:2-11.

14. **Barefoot, S. F., and T. R. Klaenhammer.** 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* **45**:1808-15.
15. **Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow.** 2000. *Yeasts: Characteristics and identification*, 3. ed. Cambridge University Press, Cambridge.
16. **Beaulieu, L., D. Groleau, C. B. Miguez, J. F. Jette, H. Aomari, and M. Subirade.** 2005. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material, p. 111-25, *Protein Expr Purif*, vol. 43.
17. **Bennik, M. H. J., E. J. Smid, and L. Gorris.** 2000. Chapter 15: Use of biopreservation in minimal processing of vegetables. *In* S. M. Alzamora, M. S. Tapia, and A. López-Malo (ed.), *Minimally processed fruits and vegetables - Fundamental aspects and applications*. Aspen Publishers, Inc.
18. **Bereksi, N., F. Gavini, T. Benezech, and C. Faille.** 2002. Growth, morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* Scott A and LO28 under saline and acid environments. *J. Appl. Microbiol.* **92**:556-565.
19. **Berven, F. S., O. A. Karlsen, J. C. Murrell, and H. B. Jensen.** 2003. Multiple polypeptide forms observed in two-dimensional gels of *Methylococcus capsulatus* (Bath) polypeptides are generated during the separation procedure. *Electrophoresis* **24**:757-61.
20. **Bevan, E. A., and M. Makower.** 1963. The physiological basis of the killer character in yeast, p. 202-203, *21st Int. Congr. Genetics*, vol. 1.
21. **Bilinski, C. A., G. Innamorato, and G. G. Stewart.** 1985. Identification and characterization of antimicrobial activity in two yeast genera. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1330-1332.
22. **Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, R. Westermeier, and W. Postel.** 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* **6**:317-39.
23. **Black, P. N., B. Said, C. R. Ghosn, J. V. Beach, and W. D. Nunn.** 1987. Purification and characterization of an outer membrane-bound protein involved in long-chain fatty acid transport in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**:1412-9.
24. **Bleicher, A., T. Stark, T. Hofmann, B. Bogovic Matijasic, I. Rogelj, S. Scherer, and K. Neuhaus.** 2010. Potent antilisterial cell-free supernatants produced by complex red-smear cheese microbial consortia. *J Dairy Sci* **93**:4497-505.
25. **Bockelmann, W.** 2002. Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal.* **12**:123-131.

26. **Bockelmann, W.** 1997. Surface-Ripened Cheeses, p. 121-30, 5th Cheese Symposium, University College Cork, Ireland.
27. **Bockelmann, W., and T. Hoppe-Seyler.** 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* **11**:307-314.
28. **Bockelmann, W., T. Hoppe-Seyler, U. Krusch, W. Hoffmann, and K. J. Heller.** 1997. The microflora of Tilsit cheese. Part 2. Development of a surface smear starter culture. *Nahrung* **41**:213-218.
29. **Bogovic-Matijasic, B., I. Rogelj, I. F. Nes, and H. Holo.** 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221, p. 606-12, *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 49.
30. **Borst, N.** 2007. Untersuchung der Hemmwirkung der *Pichia norvegensis* WSYC 592 auf *Listeria monocytogenes* – Biotische und abiotische Aspekte. Masterarbeit. TU München, Freising, Weihenstephan.
31. **Brennan, N. M., T. M. Cogan, M. Loessner, and S. Scherer.** 2004. Bacterial surface-ripened cheeses, p. 199-225. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee (ed.), *Cheese - chemistry, physics and microbiology*, Third ed, vol. 2: Major cheese groups. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
32. **Buchl, N. R., M. Wenning, H. Seiler, H. Mietke-Hofmann, and S. Scherer.** 2008. Reliable identification of closely related *Issatchenkia* and *Pichia* species using artificial neural network analysis of Fourier-transform infrared spectra. *Yeast* **25**:787-98.
33. **Busse, M.** 1989. Die Oberflächenflora von geschmiertem Käse. *Milchwirt. Berichte* **99**:137-141.
34. **Cairns, B. J., and R. J. Payne.** 2009. Sudden increases in listeriosis rates in England and Wales, 2001 and 2003. *Emerg Infect Dis* **15**:465-8.
35. **Carnio, M.** 1999. Isolation, purification and characterization of the macrocyclic peptide antibiotic Micrococcin P1 produced by *Staphylococcus equorum* WS 2733 and elucidation of its biosynthesis. Dissertation. Technische Universität München, Freising - Weihenstephan.
36. **Carnio, M. C., I. Eppert, and S. Scherer.** 1999. Analysis of the bacterial surface ripening flora of German and French smeared cheeses with respect to their anti-listerial potential. *International Journal of Food Microbiology* **47**:89-97.
37. **Carnio, M. C., A. Höltzel, M. Rudolf, T. Henle, G. Jung, and S. Scherer.** 2000. The macrocyclic peptide antibiotic micrococcin P₁ is secreted by the food-borne bacterium *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2378-84.

38. **Carnio, M. C., T. Stachelhaus, K. P. Francis, and S. Scherer.** 2001. Pyridinyl polythiazole class peptide antibiotic micrococcin P1, secreted by food-borne *Staphylococcus equorum* WS2733, is biosynthesized nonribosomally. *Eur. J. Biochem.* **268**:6390-401.
39. **Casal, M., S. Paiva, R. P. Andrade, C. Gancedo, and C. Leao.** 1999. The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J Bacteriol* **181**:2620-3.
40. **Celik, E., P. Calik, and S. G. Oliver.** 2009. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. *Yeast* **26**:473-84.
41. **Chambers, P., A. Issaka, and S. P. Palecek.** 2004. *Saccharomyces cerevisiae* JEN1 promoter activity is inversely related to concentration of repressing sugar. *Appl Environ Microbiol* **70**:8-17.
42. **Chevallet, M., V. Santoni, A. Poinas, D. Rouquie, A. Fuchs, S. Kieffer, M. Rossignol, J. Lunardi, J. Garin, and T. Rabilloud.** 1998. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**:1901-9.
43. **Chou, D. K., R. Krishnamurthy, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, and M. C. Manning.** 2005. Effects of Tween 20 and Tween 80 on the stability of Albutropin during agitation. *J Pharm Sci* **94**:1368-81.
44. **Clare, J. J., M. A. Romanos, F. B. Rayment, J. E. Rowedder, M. A. Smith, M. M. Payne, K. Sreekrishna, and C. A. Henwood.** 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* **105**:205-12.
45. **Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* **71**:1-20.
46. **Cole, M. B., M. V. Jones, and C. Holyoak.** 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol* **69**:63-72.
47. **Corsetti, A., J. Rossi, and M. Gobbetti.** 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **69**:1-10.
48. **Cossart, P., and M. Lecuit.** 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling, p. 3797-806, *Embo J*, vol. 17.
49. **Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food, p. 777-88, *Nat Rev Microbiol*, vol. 3.
50. **Cummins, A. J., A. K. Fielding, and J. McLauchlin.** 1994. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J Infect* **28**:89-91.

51. **Cundliffe, E., and J. Thompson.** 1981. Concerning the mode of action of micrococcin upon bacterial protein synthesis. *Eur J Biochem* **118**:47-52.
52. **de Vuyst, L.** 1995. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *Journal of Applied Bacteriology* **78**:28-33.
53. **Deák, T.** 2008. Chapter 7: Yeasts in specific types of foods, p. 117-173, *Handbook of food spoilage yeasts*, 2nd ed. CRC press, Boca Raton, FL, USA.
54. **Denny, J., and J. McLauchlin.** 2008. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe--an opportunity for improved European surveillance. *Euro Surveill* **13**.
55. **Dieuleveux, V., and M. Gueguen.** 1998. Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese. *J. Food Prot.* **61**:1281-5.
56. **Dieuleveux, V., S. Lemarinier, and M. Gueguen.** 1998. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *Int. J. Food Microbiol.* **40**:177-83.
57. **Dieuleveux, V., R. A. M. Rarah, J. Chataud, and M. Gueguen.** 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Geotrichum candidum*. *Microbiol. Aliment. Nutrit.* **15**:147-156.
58. **Dieuleveux, V., D. Van Der Pyl, J. Chataud, and M. Gueguen.** 1998. Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:800-3.
59. **Disson, O., S. Grayo, E. Huillet, G. Nikitas, F. Langa-Vives, O. Dussurget, M. Ragon, A. Le Monnier, C. Babinet, P. Cossart, and M. Lecuit.** 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* **455**:1114-8.
60. **Dotson, S. B., J. S. Rush, A. D. Ricketts, and C. J. Waechter.** 1995. Mannosylphosphoryldolichol-mediated O-mannosylation of yeast glycoproteins: stereospecificity and recognition of the alpha-isoprene unit by a purified mannosyltransferase. *Arch Biochem Biophys* **316**:773-9.
61. **Drider, D., G. Fimland, Y. Hechard, L. M. McMullen, and H. Prevost.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins, p. 564-82, *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 70.
62. **Eisenreich, W., J. Slaghuis, R. Laupitz, J. Bussemer, J. Stritzker, C. Schwarz, R. Schwarz, T. Dandekar, W. Goebel, and A. Bacher.** 2006. ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:2040-5.

63. **Eliskases-Lechner, F., and W. Ginzinger.** 1995. The yeast flora of surface-ripened cheeses. *Milchwissenschaft* **50**:458-462.
64. **Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Assobhei, and C. Hasselmann.** 1998. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *J. Appl. Microbiol.* **85**:521-6.
65. **Ennahar, S., O. Assobhel, and C. Hasselmann.** 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *J. Food Prot.* **61**:186-91.
66. **Eppert, I., N. Valdes-Stauber, H. Götz, M. Busse, and S. Scherer.** 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:4812-7.
67. **Eylert, E., J. Schar, S. Mertins, R. Stoll, A. Bacher, W. Goebel, and W. Eisenreich.** 2008. Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Mol Microbiol* **69**:1008-17.
68. **Faleiro, M. L., P. W. Andrew, and D. Power.** 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* **84**:207-216.
69. **Farber, J. M., and P. I. Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* **55**:476-511.
70. **Flores, C. L., C. Rodriguez, T. Petit, and C. Gancedo.** 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **24**:507-29.
71. **Friedman, M. E.** 1968. Inhibition of staphylococcal enterotoxin B formation by cell wall blocking agents and other compounds. *J Bacteriol* **95**:1051-5.
72. **Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López, and N. B. Omar.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* **120**:51.
73. **Gancedo, J. M.** 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:334-61.
74. **Gao, F. H., T. Abee, and W. N. Konings.** 1991. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Appl Environ Microbiol* **57**:2164-70.
75. **Ghalfi, H., N. Benkerroum, M. Ongena, J. Van Beeumen, B. Wathelet, I. Vandenberghe, M. Bensaid, and P. Thonart.** 2006. Purification and characterization of three novel plasmid-born bacteriocins (curvalicins 28) produced by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28, Antonie Van Leeuwenhoek.

76. **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. D. Entian, H. Fsihi, F. Garcia-del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L. M. 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, and P. Cossart.** 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**:849-52.
77. **Gobbetti, M.** 1998. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology* **9**:267.
78. **Goerges, S.** 2008. Persönliche Mitteilung.
79. **Goerges, S., U. Aigner, B. Silakowski, and S. Scherer.** 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:313-318.
80. **Goerges, S., M. Koslowsky, S. Velagic, N. Borst, W. Bockelmann, K. J. Heller, and S. Scherer.** 2011. Anti-listerial potential of food-borne yeasts in red smear cheese. *International Dairy Journal*. **21**:83-89.
81. **Gonenne, A., and R. Ernst.** 1978. Solubilization of membrane proteins by sulfobetaines, novel zwitterionic surfactants. *Anal Biochem* **87**:28-38.
82. **Görg, A., A. Klaus, C. Lück, F. Weiland, and W. Weiss.** 2007. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis, A laboratory manual. TU München.
83. **Goulet, V., H. de Valk, O. Pierre, F. Stainer, J. Rocourt, V. Vaillant, C. Jacquet, and J. C. Desenclos.** 2001. Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997. *Emerg Infect Dis* **7**:983-9.
84. **Goulet, V., C. Hedberg, A. Le Monnier, and H. de Valk.** 2008. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis* **14**:734-40.
85. **Graves, L. M., L. O. Helsel, A. G. Steigerwalt, R. E. Morey, M. I. Daneshvar, S. E. Roof, R. H. Orsi, E. D. Fortes, S. R. Milillo, H. C. den Bakker, M. Wiedmann, B. Swaminathan, and B. D. Saunders.** 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**:1280-8.
86. **Hain, T., S. S. Chatterjee, R. Ghai, C. T. Kuenne, A. Billion, C. Steinweg, E. Domann, U. Karst, L. Jansch, J. Wehland, W. Eisenreich, A. Bacher, B. Joseph, J. Schar, J. Kreft, J. Klumpp, M. J. Loessner, J. Dorscht, K. Neuhaus, T. M. Fuchs, S. Scherer, M. Doumith, C. Jacquet, P. Martin, P. Cossart, C. Rusniok, P. Glaser, C. Buchrieser, W. Goe-**

- Goebel, and T. Chakraborty.** 2007. Pathogenomics of *Listeria* spp. *Int J Med Microbiol* **297**:541-57.
87. **Harsay, E., and A. Bretscher.** 1995. Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J Cell Biol* **131**:297-310.
88. **Heatley, N. G., and H. M. Doery.** 1951. The preparation and some properties of purified micrococcin. *Biochem J* **50**:247-53.
89. **Helenius, A., and K. Simons.** 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* **415**:29-79.
90. **Hellwig, S.** 2000. Entwicklung von Fermentationsprozessen zur Produktion rekombinanter Antikörperfragmente in *Pichia pastoris* und *Nicotiana tabacum*. Dissertation. Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, Aachen.
91. **Hjelmeland, L. M.** 1980. A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:6368-70.
92. **Hof, H.** 2003. History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **35**:199.
93. **Hoppe-Seyler, T., B. Jaeger, W. Bockelmann, and K. J. Heller.** 2000. Quantification and identification of microorganisms from the surface of smear cheeses *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **52**:294-305.
94. **Hoppe-Seyler, T. S., B. Jaeger, W. Bockelmann, W. H. Noordman, A. Geis, and K. J. Heller.** 2003. Identification and differentiation of species and strains of *Arthrobacter* and *Microbacterium barkeri* isolated from smear cheeses with amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). *Syst. Appl. Microbiol.* **26**:438-444.
95. **Hoppe-Seyler, T. S., B. Jaeger, W. Bockelmann, W. H. Noordman, A. Geis, and K. J. Heller.** 2004. Molecular identification and differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**:211-218.
96. **Hronska, L., Z. Mrozova, M. Valachovic, and I. Hapala.** 2004. Low concentrations of the non-ionic detergent Nonidet P-40 interfere with sterol biogenesis and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **238**:241-8.
97. **Huot, E., C. Barrena-Gonzalez, and H. Petitdemange.** 1996. Tween 80 effect on bacteriocin synthesis by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46. *Lett Appl Microbiol* **22**:307-10.
98. **Ibarburu, I., M. E. Soria-Diaz, M. A. Rodriguez-Carvajal, S. E. Velasco, P. Tejero-Mateo, A. M. Gil-Serrano, A. Irastorza, and M. T. Duenas.** 2007. Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus o-*

- oeni* 14 and structural characterization of their EPSs. J Appl Microbiol **103**:477-86.
99. **Ichiyama, S., M. Ohta, K. Shimokata, N. Kato, and J. Takeuchi.** 1991. Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol **29**:2690-5.
 100. **Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik.** 2002. Immunologie, 5. Auflage ed. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
 101. **Jaradat, Z. W., and A. K. Bhunia.** 2002. Glucose and nutrient concentrations affect the expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol **68**:4876-83.
 102. **Jones, B. D., H. F. Paterson, A. Hall, and S. Falkow.** 1993. *Salmonella typhimurium* induces membrane ruffling by a growth factor-receptor-independent mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A **90**:10390-4.
 103. **Jung, D. S., F. W. Bodyfelt, and M. A. Daeschel.** 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. J Dairy Sci **75**:387-93.
 104. **Kalyuzhnaya, M. G., M. E. Lidstrom, and L. Chistoserdova.** 2008. Real-time detection of actively metabolizing microbes by redox sensing as applied to methylotroph populations in Lake Washington. Isme J **2**:696-706.
 105. **Kammerlehner, J.** 2003. Käsetechnologie. Freisinger Künstlerpresse W. Bode, Freising, Germany.
 106. **Kawahata, M., K. Masaki, T. Fujii, and H. Iefuji.** 2006. Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1p. FEMS Yeast Res **6**:924-36.
 107. **Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev **12**:39-85.
 108. **Krämer, J.** 1992. Lebensmittelmikrobiologie, 2. Auflage. Ulmer, Stuttgart.
 109. **Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett.** 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek **73**:331-71.
 110. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-5.
 111. **Lambris, J. D.** 2010. 3rd Joint Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology and the Association for General and Applied Microbiology, Hannover, March 2010. Personal Communication.

112. **Laurencík, M., P. Sulo, E. Sláviková, E. Piecková, M. Seman, and L. Ebringer.** 2008. The diversity of eukaryotic microbiota in the traditional Slovak sheep cheese -- Bryndza. *International Journal of Food Microbiology* **127**:176.
113. **Leclercq, A., D. Clermont, C. Bizet, P. A. Grimont, A. Le Fleche-Mateos, S. M. Roche, C. Buchrieser, V. Cadet-Daniel, A. Le Monnier, M. Lecuit, and F. Allerberger.** 2009. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*
114. **Lecuit, M., H. Ohayon, L. Braun, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1997. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* **65**:5309-19.
115. **Lee, I. M., I. M. Bartoszyk, D. E. Gundersen-Rindal, and R. E. Davis.** 1997. Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16s rRNA gene sequence analyses. *Appl Environ Microbiol* **63**:2631-6.
116. **Li, S. C., and P. M. Kane.** 2009. The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim Biophys Acta* **1793**:650-63.
117. **Lin, E. S., and S. C. Sung.** 2006. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Int J Food Microbiol* **108**:182-7.
118. **Lind, H., J. Sjogren, S. Gohil, L. Kenne, J. Schnurer, and A. Broberg.** 2007. Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains. *FEMS Microbiol Lett* **271**:310-5.
119. **Lodi, T., F. Fontanesi, and B. Guiard.** 2002. Co-ordinate regulation of lactate metabolism genes in yeast: the role of the lactate permease gene JEN1. *Mol Genet Genomics* **266**:838-47.
120. **Loessner, M., S. Guenther, S. Steffan, and S. Scherer.** 2003. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:1854-7.
121. **Lungu, B., S. C. Ricke, and M. G. Johnson.** 2009. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: a review. *Anaerobe* **15**:7-17.
122. **Lyon, D. Y., and P. J. Alvarez.** 2008. Fullerene water suspension (nC₆₀) exerts antibacterial effects via ROS-independent protein oxidation. *Environ Sci Technol* **42**:8127-32.
123. **Magliani, W., S. Conti, M. Gerloni, D. Bertolotti, and L. Polonelli.** 1997. Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews* **10**:369-400.
124. **Maisnier-Patin, S., and J. Richard.** 1995. Activity and purification of linen-scin OC2, an antibacterial substance produced by *Brevibacterium linens*

- OC2, an orange cheese coryneform bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1847-52.
125. **Malpartida, F., and R. Serrano.** 1980. Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent. *FEBS Lett* **111**:69-72.
126. **Maoz, A., R. Mayr, and S. Scherer.** 2003. Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4012-8.
127. **Marahiel, M. A., T. Stachelhaus, and H. D. Mootz.** 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev* **97**:2651-2674.
128. **Marie, M., R. Sannerud, H. Avsnes Dale, and J. Saraste.** 2008. Take the 'A' train: on fast tracks to the cell surface. *Cell Mol Life Sci* **65**:2859-74.
129. **Marquina, D., A. Santos, and J. M. Peinado.** 2002. Biology of killer yeasts. *Int Microbiol* **5**:65-71.
130. **Mascher, T., S. L. Zimmer, T. A. Smith, and J. D. Helmann.** 2004. Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2888-96.
131. **Matar, G. M., J. E. Koehler, G. Malcolm, M. A. Lambert-Fair, J. Tappero, S. B. Hunter, and B. Swaminathan.** 1999. Identification of *Bartonella* species directly in clinical specimens by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment. *J Clin Microbiol* **37**:4045-7.
132. **Mauriello, G., D. Ercolini, A. La Stora, A. Casaburi, and F. Villani.** 2004. Development of polythene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. *J Appl Microbiol* **97**:314-22.
133. **McCracken, D. A., V. J. Martin, M. J. Stark, and P. L. Bolen.** 1994. The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia acaciae*: characterization and comparison with the toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* **140 (Pt 2)**:425-31.
134. **McKay, L. L., and K. A. Baldwin.** 1990. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **7**:3-14.
135. **McLauchlin, J.** 1997. The identification of *Listeria* species. *Int J Food Microbiol* **38**:77-81.
136. **McLauchlin, J., R. T. Mitchell, W. J. Smerdon, and K. Jewell.** 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for

- use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology* **92**:15.
137. **Mol, P. C., H. M. Park, J. T. Mullins, and E. Cabib.** 1994. A GTP-binding protein regulates the activity of (1 \rightarrow 3)-beta-glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *J Biol Chem* **269**:31267-74.
 138. **Mounier, S. Goerges, R. Gelsomino, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, N. M. Brennan, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, and T. M. Cogan.** 2006. Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* **101**:668-681.
 139. **Mounier, J., R. Gelsomino, S. Goerges, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, and T. M. Cogan.** 2005. Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6489-6500.
 140. **Narendranath, N. V., K. C. Thomas, and W. M. Ingledew.** 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J Ind Microbiol Biotechnol* **26**:171-7.
 141. **Navarrete, R., and R. Serrano.** 1983. Solubilization of yeast plasma membranes and mitochondria by different types of non-denaturing detergents. *Biochim Biophys Acta* **728**:403-8.
 142. **Nelson, K. E., D. E. Fouts, E. F. Mongodin, J. Ravel, R. T. DeBoy, J. F. Kolonay, D. A. Rasko, S. V. Angiuoli, S. R. Gill, I. T. Paulsen, J. Peterson, O. White, W. C. Nelson, W. Nierman, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. J. Dodson, A. S. Durkin, R. Madupu, D. H. Haft, J. Selengut, S. Van Aken, H. Khouri, N. Fedorova, H. Forberger, B. Tran, S. Kathariou, L. D. Wonderling, G. A. Uhlisch, D. O. Bayles, J. B. Luchansky, and C. M. Fraser.** 2004. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res* **32**:2386-95.
 143. **Nonaka, M.** 2001. Evolution of the complement system. *Curr Opin Immunol* **13**:69-73.
 144. **Nonaka, M., and A. Kimura.** 2006. Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics* **58**:701-13.
 145. **Nonaka, M., and F. Yoshizaki.** 2004. Evolution of the complement system. *Mol Immunol* **40**:897-902.
 146. **Nonaka, M., and F. Yoshizaki.** 2004. Primitive complement system of invertebrates. *Immunol Rev* **198**:203-15.
 147. **Nout, M.** 2003. Chapter 17: Traditional fermented products from Africa, Latin America and Asia, p. 451-473. *In* T. Boekhout and V. Robert (ed.),

- Yeasts in Food - Beneficial and Detrimental Aspects, 1st ed. B. Behr's Verlag, Hamburg.
148. **O'Farrell, P. H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**:4007-21.
 149. **Olive, D. M., and P. Bean.** 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* **37**:1661-9.
 150. **Painter, J., and L. Slutsker.** 2007. Chapter 4. Listeriosis in humans, In: Ryser, E.T., Marth, E.H.: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
 151. **Phan-Thanh, L., F. Mahouin, and S. Alige.** 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **55**:121-126.
 152. **Pine, L., G. B. Malcolm, J. B. Brooks, and M. I. Daneshvar.** 1989. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can J Microbiol* **35**:245-54.
 153. **Polonelli, L., and G. Morace.** 1986. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol* **24**:866-9.
 154. **Premaratne, R. J., W. J. Lin, and E. A. Johnson.** 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **57**:3046-8.
 155. **Protopopov, V., B. Govindan, P. Novick, and J. E. Gerst.** 1993. Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* **74**:855-61.
 156. **Provost, F., L. Polonelli, S. Conti, P. Fiscicaro, M. Gerloni, and P. Boiron.** 1995. Use of yeast killer system to identify species of the *Nocardia asteroides* complex. *J Clin Microbiol* **33**:8-10.
 157. **Pryer, N. K., L. J. Wuestehube, and R. Schekman.** 1992. Vesicle-mediated protein sorting. *Annu Rev Biochem* **61**:471-516.
 158. **Rantsiou, K., R. Urso, P. Dolci, G. Comi, and L. Cocolin.** 2008. Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology* **126**:36.
 159. **Reese, E. T., and A. Maguire.** 1969. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Appl Microbiol* **17**:242-5.
 160. **Reps, A.** 1987. Bacterial surface-ripened cheeses, p. 151-184. In P. F. Fox (ed.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol. 2: Major cheese groups. Elsevier Applied Science, London.
 161. **Riemelt, I., B. Bartel, and M. Malczan.** 2003. *Milchwirtschaftliche Mikrobiologie*. 2. Auflage. B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg.

162. **Roche.** 2004. Produktbeschreibung Nonidet P40. <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1754599b.pdf>.
163. **Rohm, H., F. Eliskases-Lechner, and M. Bräuer.** 1992. Diversity of yeasts in selected dairy products. *The Journal of Applied Bacteriology* **72**:370-376.
164. **Romanos, M. A., C. A. Scorer, and J. J. Clare.** 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**:423-88.
165. **Rooijackers, S. H., and J. A. van Strijp.** 2007. Bacterial complement evasion. *Mol Immunol* **44**:23-32.
166. **Rosendahl, G., and S. Douthwaite.** 1994. The antibiotics micrococcin and thiostrepton interact directly with 23S rRNA nucleotides 1067A and 1095A. *Nucleic Acids Res* **22**:357-63.
167. **Roth, E., S. Miescher Schwenninger, M. Hasler, E. Eugster-Meier, and C. Lacroix.** 2010. Population dynamics of two antilisterial cheese surface consortia revealed by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *BMC Microbiol* **10**:74.
168. **Rudolf, M., and S. Scherer.** 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* **63**:91-98.
169. **Rudolf, M., and S. Scherer.** 2000. Incidence of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in acid curd cheese. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **51**:81-120.
170. **Saheki, T., and H. Holzer.** 1975. Proteolytic activities in yeast. *Biochim Biophys Acta* **384**:203-14.
171. **Sahl, H. G.** 1994. Staphylococcin 1580 is identical to the lantibiotic epidermin: implications for the nature of bacteriocins from gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **60**:752-5.
172. **Schwartz, D. C., and C. R. Cantor.** 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**:67-75.
173. **Seiler, H.** 2009. Persönliche Mitteilung.
174. **Seiler, H.** 1991. Some additional physiological characteristics for the identification of foodborne yeasts. *Neth. Milk Dairy J* **45**:253-258.
175. **Settanni, L., and A. Corsetti.** 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol* **121**:123-38.
176. **Seytter, T., F. Lottspeich, W. Neupert, and E. Schwarz.** 1998. Mam33p, an oligomeric, acidic protein in the mitochondrial matrix of *Saccharomyces cerevisiae* is related to the human complement receptor gC1q-R. *Yeast* **14**:303-10.

177. **Spencer, J. F. T., Ragout de Spencer, A.L. (ed.).** 2004. Methods in Molecular Biology, vol. 268. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA.
178. **Stoll, R., and W. Goebel.** 2010. The major PEP-phosphotransferase systems (PTs) for glucose, mannose and cellobiose of *Listeria monocytogenes*, and their significance for extra- and intracellular growth. *Microbiology* **156**:1069-83.
179. **Sunyer, J. O., I. K. Zarkadis, and J. D. Lambris.** 1998. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunol Today* **19**:519-23.
180. **Sutherland, I. W.** 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol* **16**:41-6.
181. **Tagg, J. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamaker.** 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* **40**:722-56.
182. **Taormina, P. J.** 2010. Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. *Crit Rev Food Sci Nutr* **50**:209-27.
183. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**:2233-9.
184. **Terplan, G., R. Schoen, W. Springmeyer, I. Degle, and H. Becker.** 1986. Vorkommen, Verhalten und Bedeutung von Listerien in Milch und Milchprodukten. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **37**:131-137.
185. **Tompkin, R. B.** 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J. Food Prot.* **65**:709-725.
186. **Trivett, T. L., and E. A. Meyer.** 1971. Citrate cycle and related metabolism of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **107**:770-9.
187. **Tsujikawa, M., K. Okabayashi, M. Morita, and T. Tanabe.** 1996. Secretion of a variant of human single-chain urokinase-type plasminogen activator without an N-glycosylation site in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* and characterization of the secreted product. *Yeast* **12**:541-53.
188. **Upadhyay, V. K., and P. L. H. McSweeney.** 2003. Acceleration of cheese ripening. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, GB.
189. **Valdés-Stauber, N., H. Götz, and M. Busse.** 1991. Antagonistic effect of coryneform bacteria from red smear cheese against *Listeria* species. *International Journal of Food Microbiology* **13**:119-30.
190. **Valdés-Stauber, N., and S. Scherer.** 1994. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol* **60**:3809-14.

191. **Valdés-Stauber, N., S. Scherer, and H. Seiler.** 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **34**:115-129.
192. **Vaneechoutte, M., P. Riegel, D. de Briel, H. Monteil, G. Verschraegen, A. De Rouck, and G. Claeys.** 1995. Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. *Res Microbiol* **146**:633-41.
193. **Vaneechoutte, M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys, and K. Kersters.** 1992. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Lett* **72**:227-33.
194. **Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft.** 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:584-640.
195. **Verbraucherzentrale_Schleswig-Holstein.** 30.11.2006, posting date. <http://www.verbraucherzentrale-sh.de/UNIQ127913630226173/link304412A>. [Online.]
196. **Wagner, M., B. Auer, C. Trittremmel, I. Hein, and D. Schoder.** 2007. Survey on the *Listeria* contamination of ready-to-eat food products and household environments in Vienna, Austria. *Zoonoses Public Health* **54**:16-22.
197. **Wesley, I. V.** 2007. Chapter 3. Listeriosis in animals, In: Ryser, E.T., Marth, E.H.: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
198. **Willumsen, P. A., U. Karlson, and P. H. Pritchard.** 1998. Response of furan-thene-degrading bacteria to surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**:475-483.
199. **Zeng, G., H. Fu, H. Zhong, X. Yuan, M. Fu, W. Wang, and G. Huang.** 2007. Co-degradation with glucose of four surfactants, CTAB, Triton X-100, SDS and Rhamnolipid, in liquid culture media and compost matrix. *Biodegradation* **18**:303-10.
200. **Zhang, S., J. Ren, H. Li, Q. Zhang, J. S. Armstrong, A. L. Munn, and H. Yang.** 2004. Ncr1p, the yeast ortholog of mammalian Niemann Pick C1 protein, is dispensable for endocytic transport. *Traffic* **5**:1017-30.
201. **Zhao, T., M. P. Doyle, and P. Zhao.** 2004. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3996-4003.
202. **Zheng, G., and M. F. Slavik.** 1999. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Lett Appl Microbiol* **28**:363-7.

Anhang A

Sequenz eines 655 bp langen Amplifikats eines Peptidynthetasegenfragments im Genom von *St. equorum* WS 4524

1	ACTGGGTGAT	AAATAAATAT	AATGTCGATG	ATGAAGATAC
41	AATATATTTA	AAACGCCTTA	TACCTTCGAT	GTTTCAGTAT
81	GGGAAATCTT	TGGCTGGGCA	ATGCTCGGTA	GTCAAATTGT
121	TTTACTACCT	TCTGGAGAAG	AAGGGAACCC	TGAAAAAATA
161	ACTGAATTAT	TAGAAGGTTA	CTCAGTAGCG	ATGGTTCACT
201	TCGTGCCGTC	GATGTTAAAT	ATGTTTGTTA	ATTTTATTAA
241	ATCTACAAAC	AACGTACAAG	CCATTTCGAA	ACTAAAATAT
281	GTTTTAGCTA	GTGGAGAAGC	ATTAATAATCG	GAACAAGTTA
321	ATGACTTTAA	TCATTTTATT	GGAAATAAAA	ACAATACTGC
361	TTTACTCAAC	CTATATGGCC	CTACTGAAAC	AACCGTTGAC
401	GTAACAAGTT	TTGACTGTGA	AAATCATAAA	ACATATGACT
441	CGATTCCAAT	CGGCAAACCA	ATCTCAAATA	TTCAAGCTTA
481	TATTTTAAAT	GAAGATAATA	ATATAATGGG	TATCGGAGTG
521	CCCGGTGAAC	TTTGTATTGC	AGGTGTCGGT	GTCACAGCAG
561	GTTATTTAAA	TCGTCCTGAA	TTAACACAAG	AGAAATTTAT
601	TGATAATCCA	TTTGGGAAAG	GTAAATTATA	TCGTACCGGA
641	GACCTGGCGA	AATGG		

Anhang B

Identifizierung der Nukleotidsequenz des Amplifikats von *S. equorum* WS 4524 über eine Datenbankrecherche mit BlastN und BlastX bei NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

BlastN

Database Name: nr
 Description: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 Program: BLASTN 2.2.24

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF183902.1	Staphylococcus equorum micrococcin P1 peptide synthetase gene, partial cds	1133	1133	100%	0.0	97%
⋮						
Query AF183902	1 983	ACTGGGTGATAAATAAATATAATGTCGATG	A	TGAAGATAACAATA-TATTTAAAACGCCTT	59	
		ACTGGGTGATAAATAAATATAATGTCGATG	G	TGAAGATAACAATA	T	TATTTAAAACGCCTT 1042
Query AF183902	60 1043	ATACCTTCGATGTTTCAGTATGGGAAATCTTTGGCTGGGCAATGCT	C	GGTAGTCAAATTG	119	
		ATACCTTCGATGTTTCAGTATGGGAAATCTTTGGCTGGGCAATGCT	T	GGTAGTCAAATTG	1102	
Query AF183902	120 1103	TTT	T	ACTACCTTCTGGAGAAGAAGGGAACCCTGAAAAATAACTGAATTATTAGAAGGTT	179	
		TT	C	ACTACCTTCTGGAGAAGAAGGGAACCCTGAAAAATAACTGAATTATTAGAAGGTT	1162	
Query AF183902	180 1163	ACTCAGTAGCGATGGTTCACTTCGTGCCGTCGATGT	T	TAAATATGTTTGTTAATTTTATTA	239	
		ACTCAGTAGCGATGGTTCACTTCGTGCCGTCGATGT	T	TAAATATGTTTGTTAATTTTATTA	1222	

Query AF183902	240 1223	AATCTACAAACAACG T ACAAGCCATTTTCGAAACTAAAATATGTTTTAGCTAGTGGAGAAG	299 1282
Query AF183902	300 1283	CATTAAAAT T CGGAACAAGTTAATGACTTTAATCATTTTATTGGAAATAAAAACAATACTG	359 1342
Query AF183902	360 1343	C TTTACTCAACCTATATGGCCCTACTGAAACAACCGTTGACGTAACAAGTTTTGACTGTG	419 1402
Query AF183902	420 1403	AAAATCATAAAACATATGA C TCGATTCCAATCGGCAAACCAATCTC A AATATTCAAGCTT	479 1462
Query AF183902	480 1463	ATATTTTAAATGAAGATAATAATATAATGGGTATCGGAGTGCC C GGTGAACCTTTGTATTG	539 1522
Query AF183902	540 1523	CAGGTGTCGGTGTACAGCAGGTTATTTAAATCGTCCTGAATTAACACAAGAGAAATTTA	599 1582
Query AF183902	600 1583	TTGATAATCCATTTGGGAAAGGTAAATTATATCGTAC C GGAGAC C T G GCGAAATGG	655 1638

In blau dargestellt sind die Unterschiede in der Nukleotidsequenz.

BlastX

Database Name: nr
 Description: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
 Program: BLASTX 2.2.24

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AAG16975.1	micrococcin P1 peptide synthetase [Staphylococcus equorum]	414	448	99%	2e-117	98%
:						
Query	44	I FKTPYTFDVSVWEIFGWAMLGSQIVLLPSGEEGNPEKITELLEGYSVAMVHFVPSMLNM				223
AAG16975.1	343	LFKTPYTFDVSVWEIFGWAMLGSQIVLLPSGEEGNPEKITELLEGYSVAMVHFVPSMLNM				402
Query	224	FVNFIKSTNNVQAISKLKYVLASGEALKSEQVNDFNHFIGNKNNTALLNLYGPTETTVDV				403
AAG16975.1	403	FVNFIKSTNNAQAISKLKYVLASGEALKPEQVNDFNHFIGNKNNTALLNLYGPTETTVDV				462
Query	404	TSFDCENHKTYDSIPIGKPISNIQAYILNEDNNIMGIGVPGELCIAGVGVTAGYLNRP				583
AAG16975.1	463	TSFDCENHKTYDSIPIGKPISNIQAYILNEDNNIMGIGVPGELCIAGVGVTAGYLNRP				522
Query	584	TQEKFIDNPFQKGLYRTGDLAKW	655			
AAG16975.1	523	TQEKFIDNPFQKGLYRTGDLAKW	546			

In blau dargestellt sind die Unterschiede in der Aminosäuresequenz.

Publikationen, Posterpräsentationen

Publikationen

Goerges, S., Koslowsky, M., **Velagic, S.**, Borst, N., Bockelmann, W., Heller, K. J. und Scherer, S. (2010)

Anti-listerial potential of food-borne yeasts in red smear cheese, *International Dairy Journal*, 21:83-89

Velagic, S., Goerges, S., Neve, H., Heller, K. J. und Scherer, S.

Partial characterization of the listericidal action exerted by the yeast *Pichia norvegensis*, *in preparation*

Posterpräsentationen

Velagic, S., Goerges, S., Neve, H., Heller, K. J. und Scherer, S. (2010)

Partial characterization of the anti-listerial action exerted by the yeast *Pichia norvegensis*, 1. Kiel Food Science Symposium, Kiel

Velagic, S., Goerges, S., Neve, H., Heller, K. J. und Scherer, S. (2010)

Partial characterization of the anti-listerial action exerted by the yeast *Pichia norvegensis*, 3. gemeinsame Jahrestagung der DGHM und VAAM, Hannover.

Velagic, S., Goerges, S. und Scherer, S. (2008)

Anti-listerial yeasts - initial characterization of the inhibitory mechanism, 10. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Univ. Hohenheim.