

Lebensmit

Reaktion von *Streptococcus thermophilus* auf Stress

Michael Casey, Josef Gruskovnjak, Marie-Thérèse Fröhlich-Wyder, Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld (FAM), CH-3003 Bern

Auskünfte: Michael Casey, E-Mail: michael.casey@fam.admin.ch, Fax +41 (0)31 323 82 27, Tel. +41 (0)31 323 81 79

Zusammenfassung

Der Effekt eines tiefen pH-Wertes auf das Überleben von *S. thermophilus* in flüssigen Kulturen wurde untersucht. Die Resultate ergaben, dass diese Bakterien in Milch bei einer Temperatur von 37 °C nicht länger als eine Woche überleben. Die Überlebensdauer kann verlängert werden, wenn die Anzucht in verdünnter Milch oder vorzugsweise in M17 mit niedriger Lactosekonzentration erfolgt. Für die Verbesserung der Haltbarkeit flüssiger Kulturen wäre es vermutlich von Vorteil, die Käsehersteller in der Schweiz mit Kulturen zu beliefern, deren pH-Werte im Bereich von 5.9 liegen.

Eine plötzliche Temperaturerhöhung ist ein Stressfaktor, auf den sämtliche lebenden Zellen, von der einfachsten Bakterie bis zur differenziertesten Nervenzelle, reagieren. Dabei produziert die Zelle eine bestimmte Art von Molekülen, kleine Proteine, welche sie vor einer Schädigung schützen sollen. Dieses vor rund 40 Jahren von Wissenschaftlern entdeckte Phänomen wurde als «Heat Shock Response» bezeichnet (siehe Übersichtsartikel von Rosen und Ron, 2002). Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieselbe Reaktion bei einer grossen Anzahl anderer Stressfaktoren wie Alkohol, giftigen Metallen, hohen oder tiefen Temperaturen, tiefen pH-Werten usw. ebenfalls eintritt. Da die Zelle auf derart viele verschiedene Bedingungen mit demselben Abwehrmechanismus reagiert, wird dieser heute generell als «Stress Response» bezeichnet.

In der Wachstumsphase von Bakterienzellen ist es möglich, dass sie Stressfaktoren ausgesetzt sind. Die Wachstumsrate der Bakterien kann unter opti-

malen Bedingungen maximal sein, die Bedingungen können sich jedoch unvermittelt ändern. So kann eine Temperaturabnahme oder Nährstoffmangel dazu führen, dass die Bakterien in die stationäre Phase eintreten. Eine solche Umgebung kann den Bakterien erheblichen Stress verursachen und zu ihrem Absterben führen, wenn sie zu lange in diesen Bedingungen verbleiben. Werden sie jedoch rasch genug in ein neues, geeignetes Nährmedium versetzt, wird ihr Wachstum sogleich wieder einsetzen.

Auch die zur Käseherstellung verwendeten Milchsäurebakterien sind während der Käsefabrikation Stress ausgesetzt. Während ihres Wachstums im Käse steigt der pH-Wert der Umgebung rapide auf beinahe fünf ab und die zum Wachstum benötigte Energie wird knapp. Während des langen Reifungsprozesses verbleiben die Bakterien in dieser Umgebung und sterben schliesslich ab, wobei sie intrazelluläre proteolytische Enzyme ausschütten, die für die Reifung des Käses zentral sind.

Bevor die Milchsäurebakterien für die Käsefabrikation verwendet werden, sollten sie möglichst vor Stress geschützt werden, damit sie nach Zugabe zur Käsereimilch rasch gedeihen. Wenn die Bakterien allzu lange in Stress verursachenden Bedingungen verbleiben, bevor sie der Käsereimilch zugegeben werden, wird sich ihr Wachstum verzögern. Der zeitliche Abstand zwischen der Veränderung der Bedingungen und dem Einsetzen des Wachstums wird umso grösser, je länger die Bakterien Stress verursachenden Bedingungen ausgesetzt waren.

Ziel dieser Untersuchung war es, die Folgen von Stress auf thermophile Milchsäurebakterien zu untersuchen, die für die Herstellung von Schweizer Käse verwendet werden. Die FAM beliefert Käseproduzenten in der Schweiz wöchentlich mit Kulturen in flüssiger Form, die bei niedrigen Temperaturen aufbewahrt werden und einen pH-Wert um 4,5 aufweisen. Deshalb wollten wir den Einfluss von Säurestress und niedrigen Temperaturen auf Wachstum und Lebensfähigkeit dieser Bakterien testen, um zu ermitteln, ob die Haltbarkeit der Starterkulturen eventuell verbessert werden könnte. Frühere Untersuchungen zeigten, dass FAM-Kulturen bei 4 °C etwa zehn Tage überlebten. Nachfolgend werden die ersten Ergebnisse zum Einfluss von Stress auf *Streptococcus thermophilus* präsentiert.

Bakterienstamm und Wachstumsbedingungen

Der für diese Studie verwendete Bakterienstamm war *Streptococcus thermophilus* FAM 10794. Als Nährmedium diente einerseits M17-Medium, das Laktose in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt, andererseits steriler Natriumphosphat-Puffer, der verschiedene Anteile steriler Bio-Milch enthielt. Um die Kolonien bildenden Einheiten (KbE) zu bestimmen, wurden den Bakterienkulturen aliquote Volumina entnommen, die in Peptonwasser verdünnt wurden. Davon wurden 0,1 ml auf M17-Agarplatten ausgestrichen, die mit 0,5 % Glukose ergänzt wurden. Um den Analyseprozess zu beschleunigen, wurden die Untersuchungen zur Lebensfähigkeit der Bakterien bei 37 °C durchgeführt.

Einfluss von Kältestress

Das M17-Medium wurde mit *S. thermophilus* FAM 10794 beimpft und bei 42 °C inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,25 bei 600 nm erreicht war. Die Bakterien suspension wurde danach vier Tage lang entweder bei 4 °C oder 20 °C inkubiert. Probenentnahmen und die Bestimmung der KbE erfolgten täglich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 ersichtlich.

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Lagertemperatur auf die Überlebensrate von *S. thermophilus* nachgewiesen werden. Diese Art von Kälteschock scheint somit die Bakterien nicht signifikant zu beeinträchtigen.

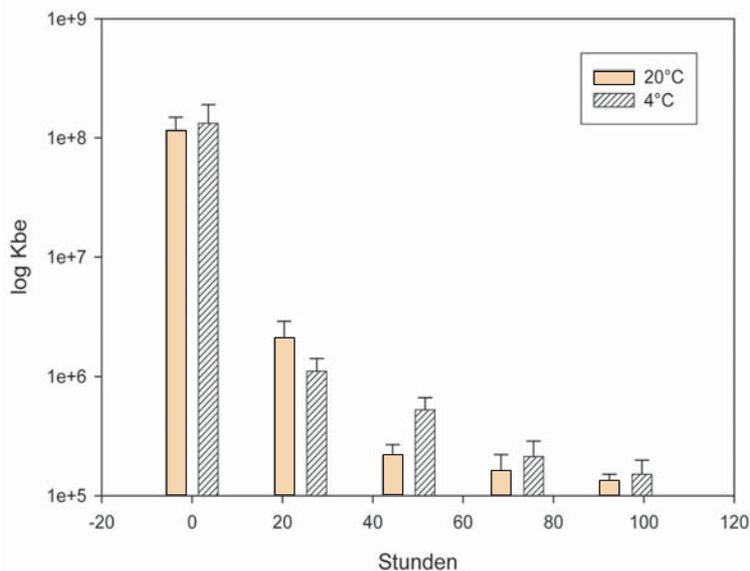


Abb. 1. Einfluss der Lagertemperatur auf die Lebensfähigkeit von *S. thermophilus* in M17 (n=4).

Einfluss von Säurestress

Die Inkubation von *S. thermophilus* erfolgte in M17, das unterschiedliche Laktosekonzentrationen enthielt, oder in sterilem Natriumphosphat-Puffer, der Milch in unterschiedlichen Verdünnungen enthielt. Der pH wurde nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden bei 37 °C

gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt. Wie erwartet führten höhere Konzentrationen von Milch oder Laktose zu einer verstärkten Abnahme des pH-Wertes.

Die Bakterien wurden danach bei 37 °C inkubiert, um zu untersuchen, welchen Einfluss die

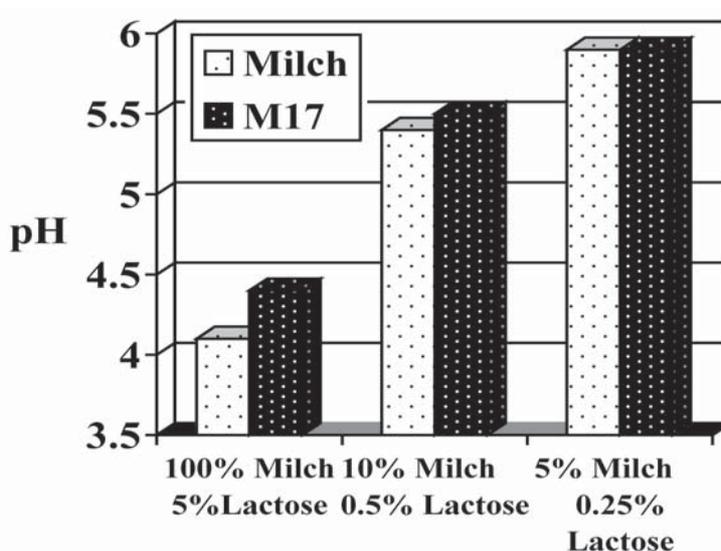


Abb. 2. Einfluss der Laktosekonzentration in M17 und der Milchkonzentration in Natriumphosphat-Puffer auf den pH-Wert des Mediums nach Wachstum von *S. thermophilus*.

Abb. 3. Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Lebensfähigkeit von *S. thermophilus* in 100 % Milch und M17 ergänzt mit 5 % Laktose.

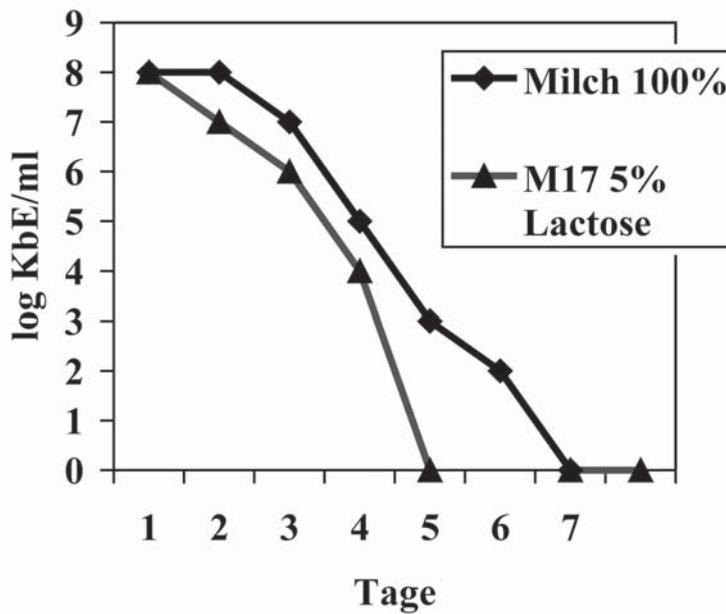
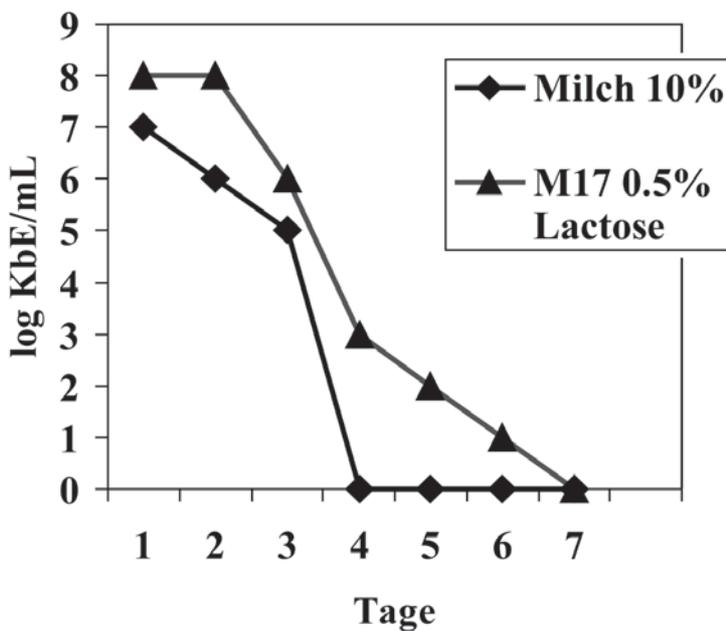


Abb. 4. Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Lebensfähigkeit von *S. thermophilus* in 10 % Milch und M17 ergänzt mit 0,5 % Laktose.



Veränderung des pH-Wertes auf ihre Lebensfähigkeit hatte. Abbildung 3 zeigt den Einfluss auf die Lebensfähigkeit, wenn die Bakterien in Milch oder in M17 mit 5 % Laktose kultiviert wurden. Es ist offensichtlich, dass die Bakterien in der Milch besser überlebten als in M17, obwohl der pH-Wert der Milch etwas niedriger war.

Abbildung 4 zeigt, welchen Einfluss verdünnte Milch oder mit nur 0,5 % Laktose angereichertes M17 auf das Überleben der

Bakterien hat. Weil der pH-Wert des Mediums höher war als derjenige von Vollmilch oder M17, wurde eine höhere Überlebensrate erwartet. Trotz des höheren pH-Wertes konnte jedoch keine höhere Überlebensrate festgestellt werden.

Abbildung 5 zeigt, welchen Einfluss eine weitere Verdünnung der Milch oder ein Laktosegehalt von 0,25 % auf die Überlebensrate hat. Unter diesen Bedingungen, mit einem pH-Wert von 5,9, überleben die Bakterien

in beiden Medien länger. Sogar nach 24 Tagen kann *S. thermophilus* noch in einer Konzentration von 10^5 /ml gefunden werden. Hier muss darauf hingewiesen werden, dass die Überlebensrate in M17 höher ist als in verdünnter Milch.

Obwohl sich bereits zahlreiche Studien mit dem Einfluss von Stress auf *Lactococcus lactis* befasst haben, gibt es noch relativ wenige Arbeiten zu thermophilen Milchsäurebakterien. Der Einfluss von Hitzestress (Varcamonti *et al.*, 2003; Giliberti *et al.*, 2002; Solow und Somkuti, 2000), Kältestress (Kim und Dunn, 1997; Kim *et al.*, 1998; Perrin *et al.*, 1999; Wouters *et al.*, 1999) und oxidativem Stress (Pebay *et al.*, 1995; Thibessard *et al.*, 2001 & 2002) auf *S. thermophilus* wurde etwas ausführlicher beschrieben, zu Säurestress jedoch ist unseres Wissens bislang sehr wenig publiziert worden.

Diese ersten Ergebnisse machen deutlich, dass ein tiefer pH-Wert für *S. thermophilus* schädlich ist. Dies gilt vermutlich auch für andere Milchsäurebakterien, die für Starterkulturen verwendet werden. Es könnte von Vorteil sein, Käsehersteller in der Schweiz mit Kulturen zu beliefern, die einen pH-Wert um 5,9 aufweisen, um ihre Haltbarkeit zu verlängern. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um die optimalen Lagerbedingungen von Flüssigkulturen zu bestimmen und zu klären, weshalb die Bakterien in M17 stabiler sind als in verdünnter Milch. Ebenfalls wäre es möglich, stressresistentere Stämme zu isolieren, um daraus Starterkulturen mit einer erheblich verbesserten Haltbarkeit zu entwickeln.

Literatur

■ Giliberti G., Naclerio G., Martirani L., Ricca E., De Felice M., 2002. Alteration of cell morphology and

viability in a *recA* mutant of *Streptococcus thermophilus* upon induction of heat shock and nutrient starvation. *Gene*. 295: 1-6.

■ Kim W.S., Dunn N.W., 1997. Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance. *Curr Microbiol.* 35: 59-63.

■ Kim W.S., Khunajakr N., Ren J., Dunn N.W., 1998. Conservation of the major cold shock protein in lactic acid bacteria. *Curr Microbiol.* 37: 333-6.

■ Pebay M., Holl A.C., Simonet J.M., Decaris B., 1995. Characterization of the *gor* gene of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *Res Microbiol.* 146: 371-83.

■ Perrin C., Guimont C., Bracquart P., Gaillard J.L., 1999. Expression of a new cold shock protein of 21.5 kDa and of the major cold shock protein by *Streptococcus thermophilus* after cold shock. *Curr Microbiol.* 39: 342-347.

■ Rosen R., Ron E.Z. 2002. Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response. *Mass Spectrom Rev.* 21: 244-65.

■ Solow B.T., Somkuti G.A., 2000. Comparison of low-molecular-weight heat stress proteins encoded on plasmids in different strains of *Streptococcus thermophilus*. *Curr Microbiol* 41: 177-81.

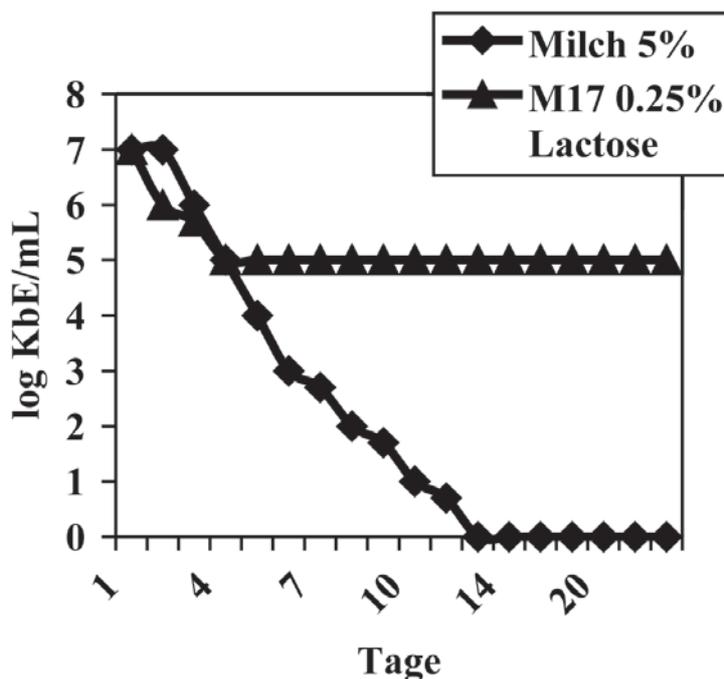


Abb. 5. Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Lebensfähigkeit von *S. thermophilus* in 5 % Milch und M17 ergänzt mit 0,25 % Laktose.

■ Thibessard A., Fernandez A., Gintz B., Leblond-Bourget N., Decaris B., 2001, Hydrogen peroxide effects on *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 cell viability, *Res Microbiol.* 152:593-6.

■ Thibessard A., Fernandez A., Gintz B., Leblond-Bourget N., Decaris B., 2002, Effects of *rodA* and *pbp2b* disruption on cell morphology and oxidative stress response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *J Bacteriol.* 184: 2821-6.

■ Varcamonti M., Graziano M.R., Pezzopane R., Naclerio G., Arsenijevic S., De Felice M., 2003, Impaired temperature stress response of a *Streptococcus thermophilus* *deoD* mutant. *Appl Environ Microbiol.* 69: 1287-9.

■ Wouters J.A., Rombouts F.M., de Vos W.M., Kuipers O.P., Abee T., 1999. Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4436-42.

RÉSUMÉ

Réaction au stress du *Streptococcus thermophilus*

On a étudié l'influence d'un pH bas sur la survie de *S. thermophilus* dans des cultures liquides. Les résultats démontrent que la bactérie ne survit pas plus d'une semaine dans le lait maintenu à 37 °C. Cette survie peut cependant être prolongée en faisant croître la bactérie dans du lait dilué ou de préférence dans du M17 contenant de faibles concentrations en lactose. Il serait probablement avantageux de mettre à disposition des fabricants de fromage de Suisse des cultures ayant un pH proche de 5.9 en vue de prolonger la durée de vie de cette culture.

SUMMARY

Reaction of *Streptococcus thermophilus* to Stress

The effect of low pH on the survival of *S. thermophilus* in liquid cultures was studied. Results showed that the bacteria do not live more than a week at 37°C when grown in milk. Survival can be prolonged by growing them in diluted milk or preferably in M17 containing low concentrations of lactose. It would probably be advantageous to supply cheese manufacturers in Switzerland with cultures at a pH close to 5.9 in order to prolong the shelf life of the cultures.

Key words: *Streptococcus thermophilus*, stress, milk, M17, survival.