

Technische Universität München

Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II

Freising-Weihenstephan

**Differenzierung und Charakterisierung von Betriebshefekulturen  
mit genetischen und physiologischen Methoden**

Holger Schöneborn

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 (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. Ulrich Kulozik

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger  
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 3. 12. 2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und  
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
am 7. 4. 2002 angenommen.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom Januar 1998 bis April 2000 sowie vom Januar 2001 bis Juli 2001 am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II der Technischen Universität München, Weihenstephan, unter der Leitung meines Doktorvaters Prof. Dr. Eberhard Geiger. Ihm möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Ausrüstung sowie seiner steten Unterstützung meiner Arbeit Dank sagen.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Reiner Springer für seinen fachlichen Rat bei den Pulsfeld-Gelelektrophoresen und die Hilfe bei meiner Arbeit im Labor.

Für die fachliche Anleitung bei den genetischen Experimenten und die ständige Diskussionsbereitschaft möchte ich mich bei Dr. Gudrun Vogeser, Andreas Scherer und Thomas Schuhbeck bedanken.

Die Laborarbeit in Weihenstephan wäre ohne die vielen Gespräche, Tips, und die Hilfsbereitschaft von Susan Illing, Petra Greim, Claudia Tischner und besonders Martina Oberkofler um vieles schwieriger gewesen. Ihnen danke ich auch für das großartige Arbeitsklima, in dem ich mich entfalten konnte.

Der Firma Doemens danke ich für die Bereitstellung der Hefekulturen und Dr. Thilo Strachotta für die Informationen zu der untersuchten Betriebshefe.

Der Brauerei danke ich dafür, daß diese Arbeit überhaupt zustande kommen konnte sowie für die finanzielle Unterstützung meiner Experimente. Allen Mitarbeitern dieser Brauerei gilt mein Dank für ihre großartig Unterstützung meiner Forschungsarbeit und auch für ihre Kollegialität und die hervorragende Zusammenarbeit bei meiner Tätigkeit in der Firma.

# I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	i
II. Abbildungsverzeichnis.....	v
III. Tabellenverzeichnis .....	ix
IV. Abkürzungsverzeichnis .....	xi
1. Einleitung.....	1
1.1. Hefe - eine Übersicht .....	1
1.2. Die Systematik der Hefen .....	2
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : die Bierhefe.....	3
1.4. Die Physiologie von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
1.5. Die Genetik von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7
1.6. Hefe in der Brauerei.....	8
1.7. Möglichkeiten der Stammdifferenzierung.....	9
1.8. Genetische Typisierungsmethoden.....	11
1.9. Immunologische Differenzierung .....	13
2. Zielsetzung.....	14
3. Material und Methoden.....	15
3.1. Geräte.....	15
3.1.1. Wachstumsversuche .....	15
3.1.2. HSGC-Analytik.....	15
3.1.3. PCR .....	15
3.1.4. Elektrophoresen .....	15
3.1.5. Southern Blotting.....	16
3.1.6. Immunologischer Nachweis von DNA.....	16
3.1.7. Sonstiges .....	16
3.2. Reagenzien und Chemikalien .....	16
3.3. Hefestämme .....	19
3.4. Kulturmedien.....	22
3.4.1. Würzemedium.....	22
3.4.2. YPG-Medium.....	22

---

3.4.3. Sterilisationsmethoden .....	22
3.5. Stammhaltung .....	22
3.6. Physiologische Charakterisierung von Hefe .....	22
3.6.1. Helmtest .....	22
3.6.2. Analyse der Zuckerverwertung .....	23
3.6.3. Wachstumsversuche .....	23
3.6.4. Headspace-Gaschromatographie .....	23
3.7. Molekularbiologische und genetische Methoden .....	26
3.7.1. Präparation von Gesamtzell-DNA .....	26
3.7.1.1. DNA-Extraktion .....	26
3.7.1.2. Chromosomenpräparation für die PFGE .....	26
3.7.2. Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	26
3.7.2.1. Agarose-Gelelektrophoresen .....	26
3.7.2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophoresen .....	27
3.7.2.3. Pulsfeld-Gelelektrophoresen .....	27
3.7.3. Restriktionsanalysen .....	28
3.7.4. PCR .....	28
3.7.4.1. Allgemeines .....	28
3.7.4.2. Oligonukleotid-Primer für die PCR .....	30
3.7.4.3. Primer für die Sequenzierung .....	30
3.7.4.4. Primer für die Mikrosatelliten-Typisierung .....	30
3.7.5. Sequenzierung .....	31
3.7.6. Mikrosatelliten-Typisierung .....	32
3.7.7. AFLP-Analytik .....	32
3.8. Biochemische und sonstige Methoden .....	33
3.8.1. Southern-Blotting .....	33
3.8.2. Hybridisierung von membranfixierter DNA mit DNA-Sonden .....	33
3.8.3. Immunologischer Nachweis von DNA .....	34
4. Ergebnisse .....	35
4.1. Physiologische Charakterisierung von Betriebshefe-Isolaten und Referenzstämmen .....	35
4.1.1. Wachstumseigenschaften der Isolate VBH9810 und VBH9812 in Würzemedium .....	35



---

4.1.1.1. Lebendzellzahl.....	35
4.1.1.2. Lebendzellanteil.....	36
4.1.1.3. Mittleres Zellvolumen .....	37
4.1.1.4. Größenverteilung der Hefezellen.....	37
4.1.2. Bildung von Gärungsnebenprodukten bei VBH9810 und VBH9812 sowie den Referenzstämmen W34/70 und W66.....	40
4.1.2.1. 1-Propanol.....	42
4.1.2.2. 2-Methyl-1-propanol .....	42
4.1.2.3. 2-Methyl-1-butanol.....	43
4.1.2.4. 3-Methyl-1-butanol.....	43
4.1.2.5. Ethylacetat.....	44
4.1.2.6. Ethylpropionat .....	45
4.1.2.7. Ethylbutyrat.....	46
4.1.2.8. Ethylhexanoat.....	47
4.1.2.9. Isoamylacetat.....	48
4.1.2.10. Isobutylacetat .....	49
4.1.2.11. 2,3-Butandion.....	49
4.1.2.12. 2,3-Pentandion.....	50
4.1.2.13. Acetaldehyd.....	51
4.1.3. Entwicklung des pH-Wertes.....	52
4.1.4. Bruchbildungsvermögen.....	53
4.1.5. Zuckerverwertung.....	55
4.2. Genetische Typisierung der Hefestämme .....	58
4.2.1. Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	59
4.2.2. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen .....	60
4.2.2.1. Auswahl der geeigneten Restriktionsenzyme.....	61
4.2.2.2. Restriktionspolymorphismen mit <i>Sma</i> I und <i>Sac</i> II.....	65
4.2.2.3. Doppelverdaue mit zwei Restriktionsenzymen.....	68
4.2.3. Hybridisierung von Restriktionsfragmenten mit DIG- markierten DNA-Sonden.....	69
4.2.4. Mikrosatellitentypisierung.....	72
4.2.4.1. Mikrosatelliten-Muster bei ausgewählten Betriebshefe-	

---

Isolaten und Referenzstämmen.....	76
4.2.4.2. Analyse von Stämmen der Hefebank Weihenstephan.....	82
4.2.4.3. Analyse von weiteren Betriebshefe-Isolaten .....	84
4.2.5. Sequenzanalysen .....	85
4.2.6. Hefedifferenzierung mit der AFLP.....	90
4.2.6.1. Analyse ausgewählter Betriebshefeisolate .....	90
4.2.6.2. Kontrolle der AFLP durch Analyse von Hefebank- Stämmen.....	91
4.2.6.3. Analyse von weiteren Betriebshefe-Isolaten .....	93
5. Diskussion.....	97
5.1. Physiologische Charakterisierung.....	97
5.2. Genetische Differenzierung von Betriebshefe-Isolaten und Referenzstämmen.....	101
5.3. Externe Analysen der Betriebshefe .....	104
5.4. Genetische Analyse der Hefe mit hochauflösenden Methoden.....	106
5.5. Methodenvergleich.....	110
5.6. Allgemeine Betrachtungen zur Klassifizierung und Artdefinition von Hefen.....	114
5.7. Möglichkeiten für weiterführende Analysen.....	116
5.8. Alternative Ansätze für die Hefedifferenzierung.....	117
5.9. Folgerungen aus den physiologischen und genetischen Analysen.....	118
5.10. Folgerungen für die Brauerei .....	120
6. Zusammenfassung.....	122
7. Literaturverzeichnis.....	123
8. Anhang .....	138
8.1. Sequenzdaten.....	138
8.1.1. Übersicht über die Mikrosatelliten.....	138
8.1.2. Sequenzdaten der Mikrosatelliten .....	138
8.2. AFLP-Bandenmuster .....	141

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1	Zellzyklus der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
Abb. 2	Aerober Stoffwechsel in <i>S. cerevisiae</i> am Beispiel der Glucose.....	5
Abb. 3	Anaerober Stoffwechsel in <i>S. cerevisiae</i> am Beispiel der Glucose.....	6
Abb. 4	Wachstumskurve der Hefeisolate VBH9810 und VBH9812.....	36
Abb. 5	Entwicklung des Lebendzellanteils bei den Isolaten VBH9810 und VBH9812.....	37
Abb. 6	Entwicklung des mittleren Zellvolumens bei den Isolaten VBH9810 und VBH9812 .....	38
Abb. 7	Entwicklung der Größenverteilungskurve bei den Hefeisolaten VBH9810 und VBH9812 .....	39
Abb. 8	Vergleich zwischen den Zellen von Stamm VBH9810 und VBH9812 im mikroskopischen Bild während der Stationärphase.....	40
Abb. 9	Entwicklung der 1-Propanol-Konzentration in Batch-Kulturen von Isolat VBH9810 und VBH9812.....	42
Abb. 10	Konzentrationsanstieg des 2-Methyl-1-propanols in den Gärungen beider Isolate.....	43
Abb. 11	Beim kontinuierlichen Anstieg der 2-Methyl-1-butanol-Konzentration zeigten sich größere Schwankungen in Vergleichsgärungen von VBH9810 und VBH9812 .....	44
Abb. 12	In der Produktion von 3-Methyl-1-butanol unterschieden sich die Isolate VBH9810 und VBH9812 sowie die Kontrollen W34/70 und W66 kaum voneinander.....	45
Abb. 13	Die Produktion von Ethylacetat setzte nach 20 bis 30 Stunden ein und erreichte sehr unterschiedliche Endkonzentrationen bei VBH9810 und VBH9812 bzw W34/70 und W66.....	46
Abb. 14	In der Bildung von Ethylpropionat sind sehr deutliche Unter- schiede zwischen den Isolaten VBH9810 und VBH9812 erkennbar.....	47
Abb. 15	Bei der Bildung von Ethylbutyrat wurden große Unterschiede zwischen den Eigenisolaten VBH9810 und VBH 9812 sowie den Stämmen W34/70 und W66 gemessen.....	48

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 16	Die Entwicklung der Ethylhexanoat-Konzentration zeigte die größten Unterschiede in der frühen stationären Phase von VBH9810 und VBH9812.....	49
Abb. 17	Auch die Entwicklung von Isoamylacetat ist durch große Unterschiede zwischen den Eigenisolaten und den Vergleichsstämmen gekennzeichnet.....	50
Abb. 18	2,3-Butandion wurde in der exponentiellen Wachstumsphase der Isolate VBH9810 und VBH9812 sehr stark gebildet und zum Ende der Gärung langsam wieder abgebaut.....	51
Abb. 19	2,3-Pentandion wird von beiden Isolaten in der exponentiellen Wachstumsphase gebildet und in der stationären Phase wieder abgebaut .....	52
Abb. 20	Die beiden Isolate VBH9810 und VBH9812 unterscheiden sich in der Entwicklung des Acetaldehyds kaum voneinander .....	53
Abb. 21	Die pH-Absenkung bei VBH9810 ist deutlich stärker als bei VBH9812.....	54
Abb. 22	PFGE-Bandenmuster der Betriebshefe-Isolate VBH9801 bis VBH9816 .....	59
Abb. 23	PFGE-Gel der Isolate VBH9903, VBH9907, VBH9909, VBH9914, VBH9810 und VBH9812 sowie der Stämme W34/70 und W66 .....	60
Abb. 24	PFGE-Gel der Stämme DWV1, DWV2, DWV3, DWV4 und DWV5 sowie der Referenzen W34/70 und W66 .....	61
Abb. 25	Restriktionsmuster der Enzyme <i>Bam</i> HI, <i>Bsp</i> CI, <i>Bss</i> HII und <i>Cfo</i> L.....	62
Abb. 26	Das Restriktionsmuster von <i>Eco</i> RI läßt im Agarosegel bei allen Stämmen ein Muster aus 13 Banden erkennen .....	63
Abb. 27	Restriktionsmuster der Enzyme <i>Fok</i> I, <i>Pvu</i> II und <i>Sac</i> II.....	64
Abb. 28	Restriktionsmuster der Enzyme <i>Sau</i> 3A, <i>Sfi</i> I und <i>Xba</i> I.....	65
Abb. 29	Das Restriktionsmuster von <i>Sma</i> I erzeugte bei den untergärigen Hefen 15 Banden .....	66
Abb. 30	Das Restriktionsmuster von <i>Sma</i> I bei ausgewählten Betriebshefeisolaten zeigt deutliche Unterschiede bei drei Proben.....	67
Abb. 31	Das Restriktionsenzym <i>Xma</i> I bildet die gleichen Bandenmuster wie sein Isoschizomer <i>Sma</i> .....	68
Abb. 32	Restriktionsmuster mit dem Enzym <i>Sac</i> II.....	69
Abb. 33	Doppelverdau mit den Enzymen <i>Sac</i> II und <i>Sma</i> I.....	70
Abb. 34	Hybridisierung <i>Eco</i> RI-verdauter DNA mit der <i>Ty1-15</i> -Sonde .....	71
Abb. 35	Hybridisierung <i>Cfo</i> L-verdauter DNA mit der <i>Ty1-15</i> -Sonde .....	72

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 36	Mikrosatelliten-Muster des Motivs chr13-tta bei den Berliner Referenzstämmen in einem 4 %-igen Agarosegel.....	74
Abb. 37	Mikrosatelliten-PCR des Motivs mito03 in einem 4 %-igen Agarosegel.....	75
Abb. 38	Mikrosatelliten-Muster der Motive chr04-ta, chr06-gt, chr08-taa und chr12-ga mit den Proben W34/70, W66, DWV2, DWV3 und DWV4 .....	76
Abb. 39	Mikrosatelliten-Muster des Motivs chr04-ta .....	77
Abb. 40	Mikrosatelliten-Muster des Motivs chr07-tta.....	78
Abb. 41	Mikrosatelliten-Muster des Motivs chr13-tta.....	79
Abb. 42	Mikrosatelliten-Muster des Motivs chr15-taa .....	80
Abb. 43	Bandenmuster der Mikrosatelliten-Motive von Chromosom IV (oben) und VII (unten).....	82
Abb. 44	Bandenmuster der Mikrosatelliten-Motive von Chromosom XIII (oben) und XV (unten).....	83
Abb. 45	Alignment der Sequenzierung auf Chromosom XIII.....	86
Abb. 46	Alignment der Sequenzierung auf Chromosom XV.....	88
Abb. 47	Musterunterschiede innerhalb der Betriebshefen bei der AFLP-Analyse mit 32 Primerkombinationen .....	91
Abb. 48	AFLP-Musterunterschiede bei untergärigen Kontrollstämmen und zwanzig Betriebshefe-Isolaten .....	94
Abb. 49	Wuchsbilder einiger Hefestämmen auf YPG-Medium.....	103
Abb. 50	AFLP-Bandenmuster der Primerpaare A/AN mit den Proben aus Abschnitt 4.2.6.1.....	141
Abb. 51	AFLP-Bandenmuster der Primerpaare A/GN mit den Proben aus Abschnitt 4.2.6.1.....	143
Abb. 52	AFLP-Bandenmuster der Primerpaare C/AN mit den Proben aus Abschnitt 4.2.6.1.....	144
Abb. 53	AFLP-Bandenmuster der Primerpaare C/GN mit den Proben aus Abschnitt 4.2.6.1.....	145
Abb. 54	AFLP-Bandenmuster der Primerpaare G/AN mit den Proben aus Abschnitt 4.2.6.1.....	146
Abb. 55	AFLP-Bandenmuster der Primerpaare G/GN mit den Proben aus Abschnitt 4.2.6.1.....	147
Abb. 56	AFLP-Bandenmuster der Primerpaare T/AN mit den Proben aus Abschnitt 4.2.6.1.....	148

---

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 57	AFLP-Bandenmuster der Primerpaare T/GN mit den Proben aus Abschnitt 4.2.6.1.....	149
Abb. 58	AFLP-Bandenmuster der Hefebank-Proben mit den Primerkombinationen A/AT, A/AG, A/GC und A/GT. ....	150
Abb. 59	AFLP-Bandenmuster der Hefebank-Proben mit den Primerkombinationen T/AT, T/AG, T/GC und T/GT.....	151

## III. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tab. 1	Auflistung der untersuchten Hefestämme .....	19
Tab. 2	Substanzmengen der Standardlösung für den FID .....	24
Tab. 3	Substanzmengen der Standardlösung für den ECD .....	25
Tab. 4	Temperaturprogramm für die Headspace-Gaschromatographie .....	25
Tab. 5	Verwendete Restriktionsenzyme.....	28
Tab. 6	Allgemeines PCR-Programm für Standard-Reaktionen (außer AFLP) .....	29
Tab. 7	Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (außer spezifischer AFLP-PCR).....	29
Tab. 8	Sequenzdaten der Primer für die Herstellung von Transposon-Sonden.....	30
Tab. 9	Sequenzdaten der Primer für die Sequenzierung.....	30
Tab.10	Sequenzdaten der Primer für die Mikrosatelliten-Analyse.....	31
Tab.11	Loci für die Sequenzierung.....	32
Tab.12	Zusammenstellung der untersuchten Gärungsnebenprodukte.....	41
Tab.13	Resultate der Helmtests (Sedimentbildung) und Zuordnung nach Bruch- und Staubhefe.....	54
Tab.14	Wachstum der Hefestämme auf verschiedenen Kohlehydraten nach 6 Tagen.....	56
Tab.15	Angaben zu den untersuchten Mikrosatelliten.....	73
Tab.16	Auswertung der Mikrosatelliten-Muster von vier Loci in Betriebshefe-Isolaten und Referenzstämmen .....	81
Tab.17	Differenzierung von 14 Stämmen der Hefebank Weihenstephan mit vier Mikrosatelliten-Motiven .....	84
Tab.18	Auswertung der Mikrosatelliten-Muster von vier Loci in Isolaten der Stämme DGV, IV und der Betriebshefe .....	85
Tab.19	Die Musteraufschlüsselung der AFLP-Analyse von Betriebshefe-Isolaten und Referenzen ergibt insgesamt sieben Mustergruppen.....	92
Tab.20	Die AFLP-Muster von 14 Stämmen der Hefebank Weihenstephan erlauben eine Aufgliederung in 13 Mustergruppen.....	93
Tab.21	Die Musteraufschlüsselung der AFLP-Analyse von zwanzig Betriebshefe- Isolaten und acht Referenzen ergibt insgesamt 15 Mustergruppen.....	95
Tab.22	Profile der pH-Veränderung und der Gärungsnebenprodukte, halb- quantitative Auswertung relativ zu W34/70 als Referenz.....	98

---

Tabelle	Titel	Seite
Tab.23	Differenzierung der Stämme von der Firma <i>Doemens</i> mit vier molekulargenetischen Methoden.....	105
Tab.24	Eine Mikrosatelliten-Analyse von dreißig Isolaten aus den Einzelkulturen und der Mischung der Betriebshefe erbrachte 17 Musterkombinationen.....	107
Tab.25	Informationen zu den Genorten der untersuchten Mikrosatelliten .....	138



## IV. Abkürzungsverzeichnis

### Alphabetische Auflistung der verwendeten Abkürzungen

A	Adenosin
A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
AVL	Amplification of Variable Loci
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaare
C	Cytidin
CIA	Chloroform/Isoamyl-Alkohol
DIG	Digoxigenin
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithioerythrit
ECD	Electron Capturing Detector
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FID	Flame Ionisation Detector
fl	Femtoliter
fw	forward
G	Guanosin
gTZ	Gramm Trockenzellmasse
h	hours (Stunden)
HSGC	Headspace Gas Chromatography
HT	Helm-Test
ITS	Internal Transcription Spacer
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	molar (mol/l)
m	milli (Faktor $10^{-3}$ )
$\mu$	micro- (Faktor $10^{-6}$ )
mA	Milliampère

---

min	Minuten
MLP	Mikrosatellite Length Polymorphism
N	Nucleotid
n	nano (Faktor $10^{-9}$ )
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalsz
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
p	pico (Faktor $10^{-12}$ )
RAPD-PCR	Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment-Length Polymorphism
RNase	Ribonuclease
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
rv	reverse
s	Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database
SSP	Substratstufen-Phosphorylierung
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
U	Unit / Units
üK	über Kopf
üN	über Nacht
V	Volt
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight
Y	Yield
YPG	Yeast extract-Peptone-Glucose

# 1. Einleitung

## 1.1. Hefe - eine Übersicht

Unter dem Begriff "Hefe" wird im allgemeinen Sprachgebrauch meist die bekannte Bäckerhefe verstanden. Im biologischen Wortsinn umfaßt die systematische Gruppe der Hefen aber ein Spektrum von 83 Gattungen mit etwa 600 Arten (Barnett *et al.* 1990). Sie sind Angehörige des Reiches der Pilze (Fungi), das selbst etwa 1.600.000 Arten umfaßt (Carlile und Watkinson 1994). Pilze leben überwiegend als Saprophyten von totem organischen Substrat. Manche Arten haben auch eine Lebensweise als Parasiten oder Symbionten entwickelt. Ihre Vermehrung erfolgt über Sporen. Im Gegensatz zu den meisten Vertretern dieser Organismengruppe, die in Form von apical wachsenden Hyphen auftreten, kommen die Hefen hauptsächlich oder ausschließlich als einzellige Stadien vor. Der Lebensraum dieser Organismen ist in erster Linie die Oberfläche von Pflanzen, auf der sie sich von natürlich ausgeschiedenen Substraten ernähren. Sehr häufig sind Hefen daher vor allem auf Blättern und Früchten sowie in den Nektarien der Blüten anzutreffen.

Die Vielfalt der Hefen wird besonders in der Verschiedenartigkeit der Lebensweisen in einer Vielzahl von Lebensräumen deutlich, die sich im Laufe ihrer Evolution entwickelt haben. Außer Pflanzen sind auch die Körperoberfläche und das Intestinal von Tieren, hier besonders Insekten, geeignete Lebensräume für manche Arten. Andere wiederum treten als Pathogene bei warmblütigen Tieren und beim Menschen auf. Die ursprünglichen Hefearten, die auf der Oberfläche von Pflanzen oder Tieren wachsen, haben dort mit einem stetigen Wechsel zwischen Benetzung mit Wasser und Austrocknung und den damit einhergehenden Schwankungen des Wasserpotentials ihrer Umgebung zu kämpfen. Zudem stehen sie mit schnellwachsenden Bakterien in Konkurrenz um die Nährstoffe. Wahrscheinlich aufgrund dieser Umweltbedingungen haben die Hefen ursprünglich ihre besondere, ovale Form und die Vermehrung durch Sprossung entwickelt. Durch die Konkurrenz zwischen den Hefearten in einem Habitat haben sich im Verlauf der Evolution aber auch besondere Mechanismen entwickelt, die einigen Arten einen Wachstumsvorteil verschaffen.

Das Phänomen dieser "Killerhefen", die ein für viele andere Hefearten letal wirkendes, extrazelluläres Toxin bilden, wurde erstmals 1963 von Bevan und Makover beschrieben und ist weit verbreitet (Buzzini und Martini 2000). Inzwischen sind etwa 100 Arten bekannt, die diese Eigenschaft besitzen (Golubev 1998). Inzwischen wird sogar versucht, Nutzhefen mit dieser Eigenschaft zu finden, um Kontaminationen mit unerwünschten Arten zu vermeiden (Yap *et al.* 2000).

Einige Hefen aus den Gattungen *Saccharomyces* und *Candida* haben sogar die Fähigkeit entwickelt, sich räuberisch von anderen Ascomyceten und Basidiomyceten zu ernähren (Lachance *et al.* 2000).

## 1.2. Die Systematik der Hefen

Ursprünglich stellte die Gruppe der Hefen in der Systematik einen Zusammenschluß von Pilzen dar, die ausschließlich oder überwiegend als Einzelzellen wachsen und sich keiner anderen Pilzgruppe zuordnen ließen. Einige Hefen produzieren dabei Ascosporen, andere Basidiosporen und wieder andere sind anamorph, haben also keine sexuelle Entwicklungsphase. Es stellte sich aber im Lauf der Zeit oftmals heraus, daß es sich bei vielen zunächst den Hefen zugeordneten Arten um die anamorphen Stadien von ansonsten (also in ihrer teleomorphen Form) unter anderem Namen bereits bekannten Pilzen handelte. Diese wurden meist zu der Gruppe der Basidiomycetes gerechnet.

Erst nach und nach, teilweise durch die Methoden der modernen Molekulargenetik, sind diese Verhältnisse aufgeklärt und die vermeintlichen Hefen schließlich ihrer "eigentlichen" systematischen Gruppe zugeordnet worden. Die Basidiomycetes-Hefen beispielsweise stehen heute in der Ordnung der Tremellales. Die anamorphen oder asporogenen Hefen bilden eine weitere Gruppe. Ihr Name deutet an, daß keine Sporen gebildet werden, was aber nur für die sexuelle Sporulation (zur Fortpflanzung) gilt. Viele dieser Hefen können jedoch sehr wohl asexuell Sporen (zur Vermehrung) bilden. Diese anamorphen Hefen werden zwei Familien der Deuteromycetes zugeordnet, den Sporobolomycetaceae und Cryptococcaceae.

Die Ascosporen-bildenden Hefen schließlich sind per Definition Ascomyceten. Sie bilden aber keinen Ascokarp und wurden aus diesem Grund früher als "Hemiascomyceten" bezeichnet. Sie gehören alle zu einer Ordnung innerhalb der Ascomycetes, den Endomycetales. Während sich die meisten Endomycetales durch Knospung vermehren können und daher zu den Hefen gezählt werden, gibt es einige darunter, z.B. *Dipodascus candidum*, die dieses nicht können und daher auch keine Hefen sind.

Zu dieser Gruppe der Ascosporen-bildenden Hefen gehört auch *Saccharomyces cerevisiae*, die wohl bekannteste Hefeart. Obwohl die meisten durch den Menschen genutzten Hefen zu dieser Art gehören, werden wichtige Varietäten oftmals abweichend benannt, so z.B. *Saccharomyces carlsbergensis* (die untergärrige Bierhefe) und *Saccharomyces ellipsoideus* (die Weinhefe). Im Fall von *Saccharomyces carlsbergensis* kommt allerdings ein weiterer Umstand hinzu, der die Einteilung in eine eigene Art rechtfertigt. So haben Homologie-Untersuchungen am Genom dieser untergärrigen Brauhefe ergeben, daß dieser Organismus wahrscheinlich aus der Verschmelzung zweier verschiedener Hefearten,

wahrscheinlich *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces monacensis*, entstanden ist und somit eine Arthybride darstellt, die nicht mit *Saccharomyces cerevisiae* identisch ist (Hansen und Kielland-Brandt 1994, Pedersen 1994, Børsting *et al.* 1997).

### 1.3. *Saccharomyces cerevisiae* : die Bierhefe

Der ursprüngliche Lebensraum dieser Hefeart, deren wissenschaftlicher Name mit "Zuckerpilz" übersetzt werden kann, ist wahrscheinlich die Oberfläche von Früchten. Die frühesten Anfänge der Geschichte ihrer Nutzung durch den Menschen sind nicht überliefert. Vermutlich haben die Hefen aber spätestens mit dem Übergang vom Nomadentum als Jäger und Sammler zum Ackerbauern ihre Bedeutung für den Menschen gefunden. Bei der Weiterverarbeitung der angebauten Pflanzen zu Nahrungsmitteln und Getränken hat die Hefe mit Sicherheit schon sehr bald eine große, wenn auch zu der Zeit noch unbekannt Rolle gespielt.

Der Einsatz der Hefen geschah wahrscheinlich auf der Basis von Versuch und Irrtum, wodurch mit der Zeit Rezepte entwickelt wurden, die die weitgehend reproduzierbare Herstellung von Brot, Wein und Bier ermöglichten. Erste Überlieferungen zur Herstellung dieser Lebensmittel stammen aus dem alten Ägypten, und schon vor etwa 6000 Jahren waren mindestens 16 Sorten Brot und Kuchen, sechs Sorten Wein und vier Bierarten bekannt (Mackenzie 1925), für deren Herstellung die Hefe ein wesentlicher Faktor ist. Dennoch ist auch im Reinheitsgebot des Bieres von 1516 noch keine Erwähnung der Hefe für die Bierherstellung zu finden. Erst mit der Entdeckung der Mikroorganismen durch Louis Pasteur im Jahr 1876 und der darauf basierenden Entwicklung mikrobiologischer Techniken wurden die Zusammenhänge klar und die Methoden des Einsatzes dieser Mikroorganismen besser beherrschbar.

Die Zellen dieser Hefe vermehren sich, anders als die meisten anderen Mikroorganismen, durch Sprossung. Während die anfangs kleine Knospe der Tochterzelle schnell bis zur Größe der Mutterzelle heranwächst, findet die Kernteilung statt. Nach der Trennung besitzt die Tochterzelle eine sogenannte Geburtsnarbe und die Mutterzelle eine Sproßnarbe, an der keine weiteren Tochterzellen mehr gebildet werden können. Der Grund hierfür ist, daß an dieser Stelle Chitin in die Zellwand eingelagert wird, die sonst hauptsächlich aus Glucanen und Mannanen besteht. Bei optimalen Wachstumsbedingungen kann es vorkommen, daß die Zellteilung schneller erfolgt als die Trennung von Mutter- und Tochterzelle, so daß sich Sproßverbände ausbilden können.

Der Lebenszyklus der Hefe ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine diploide Zelle, die sich durch Sprossung vermehrt, kann unter bestimmten Bedingungen (z.B. Stickstoffmangel) unter Durchlaufen einer Meiose einen Ascus mit vier haploiden Ascosporen bilden.

Diese können als Dauerstadien ungünstige Phasen überstehen und bei guten Wachstumsbedingungen wieder auskeimen, wobei haploide vegetative Zellen mit zwei unterschiedlichen Paarungstypen (bezeichnet mit a und  $\alpha$ , siehe Abbildung 1) entstehen, die etwas kleiner sind als die diploiden Zellen. Wie diese können sich auch die haploiden Zellen wieder durch Sprossung vermehren. Treffen zwei haploide Zellen mit verschiedenem Paarungstyp aufeinander, vereinigen sie sich miteinander und bilden wieder eine diploide Zelle. Die Hefe *Saccharomyces carlsbergensis* hat allerdings, wahrscheinlich aufgrund ihrer besonderen Chromosomenausstattung als Hybride (siehe Abschnitt 1.2.), die Fähigkeit zur Sporenbildung weitgehend verloren. Von dieser Ausnahme abgesehen gelten die hier beschriebenen Eigenschaften aber für beide Hefearten.

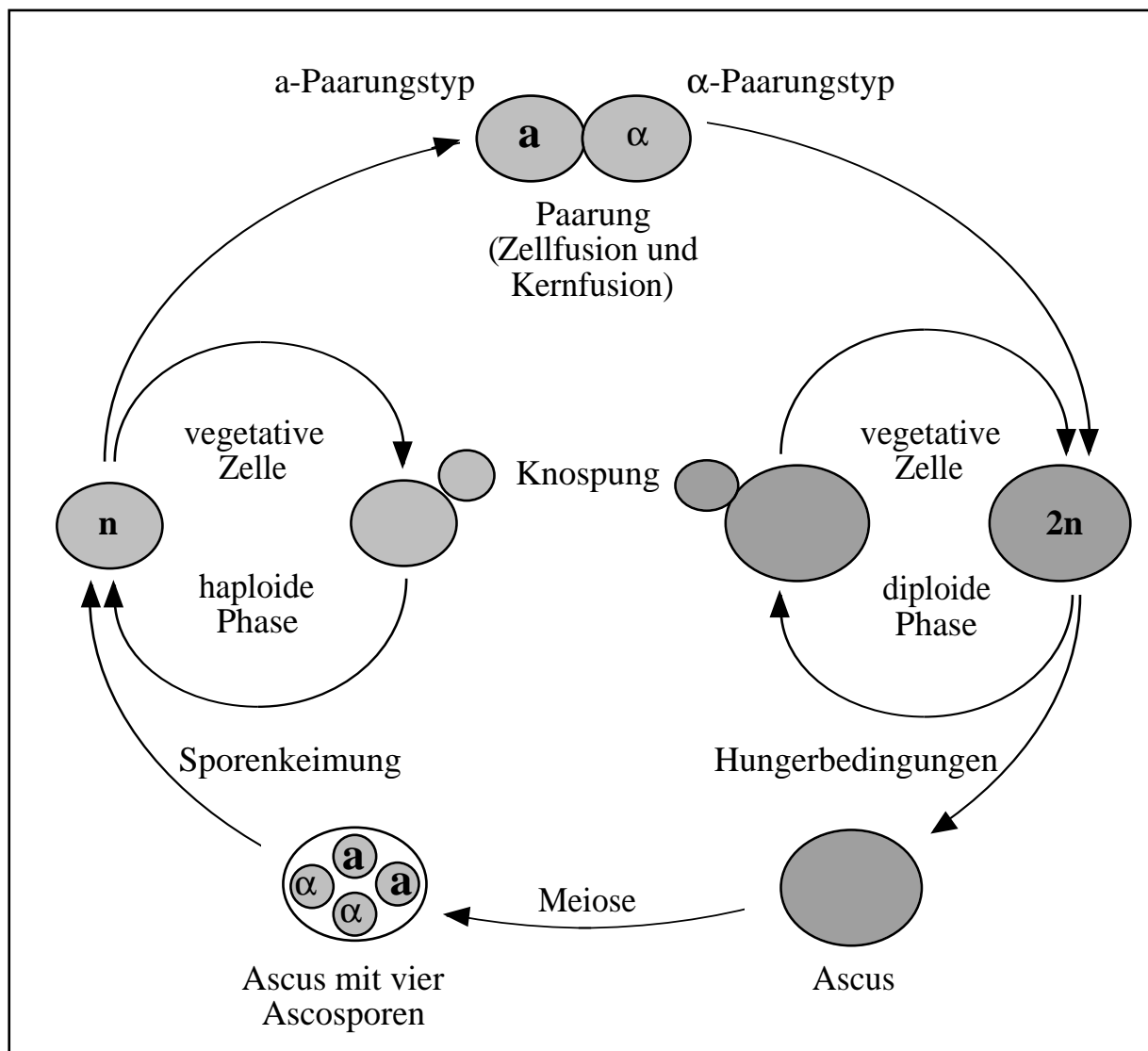


Abbildung 1: Zellzyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Erläuterungen im Text.

Einige, sogenannte "haploide Hefen" vermehren sich nur in der haploiden Phase durch Sprossung. Der Verschmelzung zweier haploider Zellen folgt direkt eine Meiose und die Ascusbildung.

Bei anderen Hefen folgt der Keimung aus den Ascosporen unmittelbar eine Verschmelzung von Zellen verschiedenen Paarungstyps und der Übergang in die diploide Phase, daher werden sie als "diploide Hefen" bezeichnet. Bei diesem Typ, zu dem auch *S. cerevisiae* gerechnet wird, können aber durch Isolation von einzelnen Zellen aus dem Ascus auch stabile haploide Kulturen angezogen werden. Bei den für Fermentationen verwendeten Hefen handelt es sich zumeist um diploide Stämme.

#### 1.4. Die Physiologie von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Brauer- und Bäckerhefe ist nicht in der Lage, längerkettige Polysaccharide, wie z.B. Stärke, zu verstoffwechseln und ist daher hauptsächlich auf Mono- und Disaccharide angewiesen. Sie metabolisiert zum Beispiel Glucose zunächst über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (die Glycolyse) bis zum Pyruvat. In Anwesenheit von Sauerstoff kann das Pyruvat dann über den Tricarbonsäurezyklus vollständig zu Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) oxidiert werden.

Als fakultativ anaerober Organismus kann *Saccharomyces cerevisiae* das Pyruvat aber auch fermentativ zu Ethanol und Kohlendioxid verstoffwechseln. Dieser Stoffwechselweg ist die vom Menschen bevorzugte alkoholische Gärung.

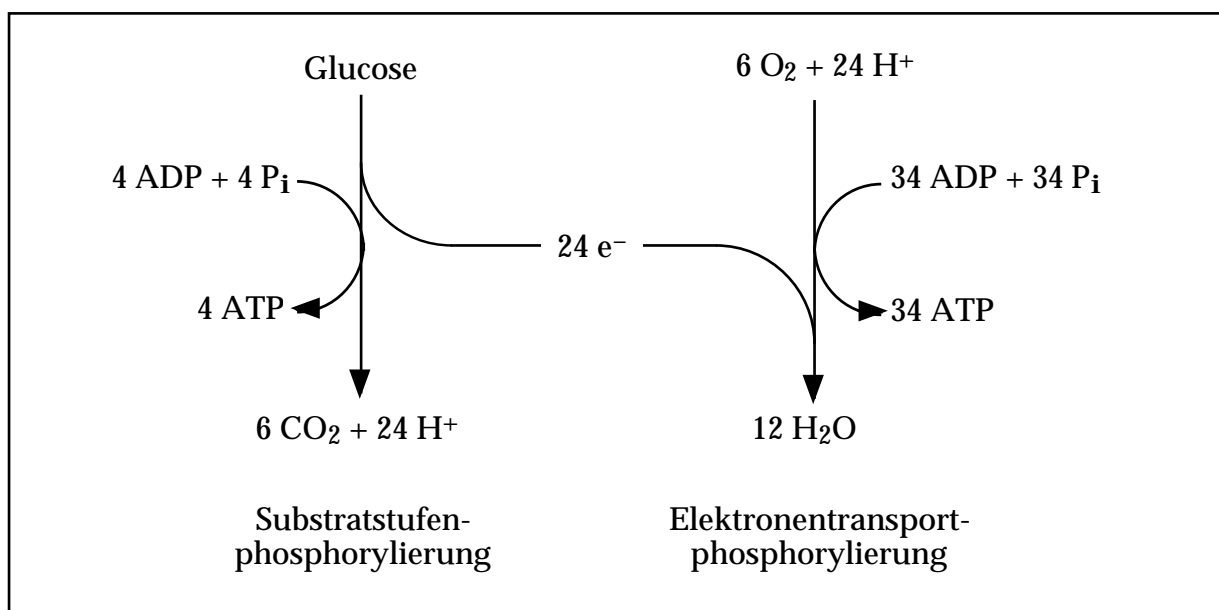


Abbildung 2: Der aerobe Stoffwechsel von *S. cerevisiae* am Beispiel der Glucose. Linke Seite: Oxidation, rechte Seite: Reduktion. Durch die komplette Oxidation des Substrates und Übertragung der Elektronen auf  $\text{O}_2$  als externen Elektronenakzeptor (Elektronentransport-Phosphorylierung) können insgesamt 38 mol ATP pro mol Glucose gebildet werden.

*S. cerevisiae* ist in der Lage, sehr schnell in substratreichen Medien unter Sauerstoffabschluß zu wachsen, wobei sich eine Zellpopulation in etwa 90 Minuten verdoppelt. Durch die verhältnismäßig schlechte Energieausbeute bei anaerobem Wachstum müssen dabei 98% der Glucose für den Energiestoffwechsel aufgewendet werden und nur 2% können in neues Zellmaterial eingebaut werden. Daher ist der spezifische Zellertrag pro Gramm metabolisiertem Substrat sehr gering.

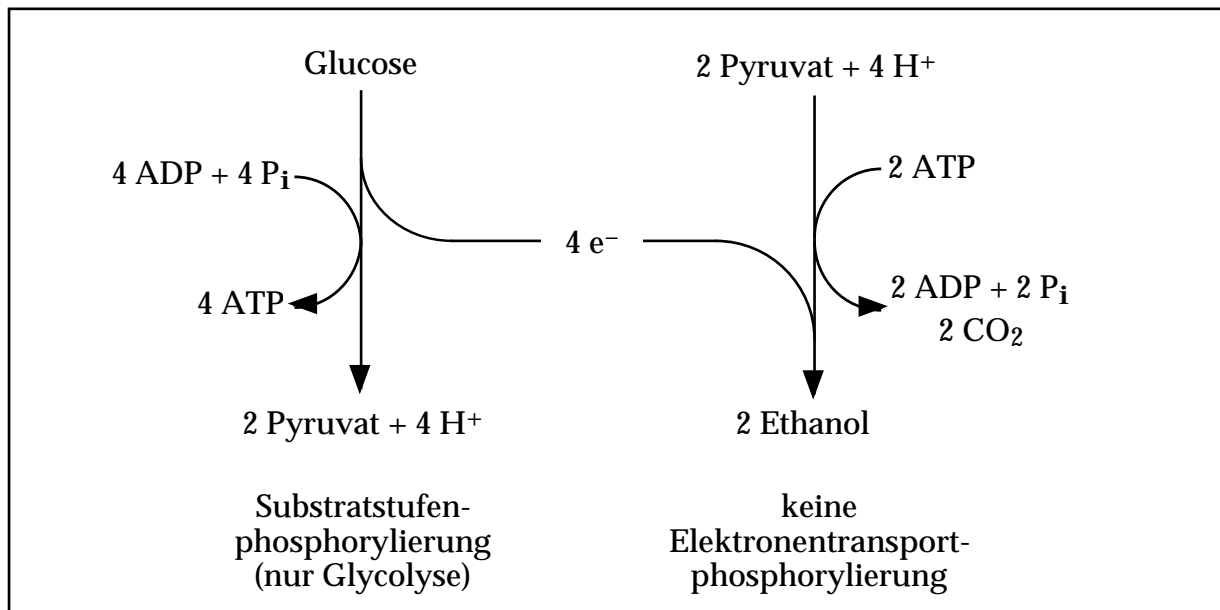


Abbildung 3: Anaerober Stoffwechsel in *S. cerevisiae* am Beispiel der Glucose. Linke Seite: Oxidation, rechte Seite: Reduktion. Da kein externer Elektronenakzeptor (wie O<sub>2</sub>) zur Verfügung steht, muß das Substrat selbst reduziert werden. Pro mol Glucose kann die Zelle durch die Substratstufen-Phosphorylierung netto nur 2 mol ATP gewinnen.

Dieser fermentative Weg wird sogar in Anwesenheit von Sauerstoff bei sehr hohen Substratkonzentrationen beschritten. Der Grund hierfür liegt darin, daß die Reaktionsfolgen des Tricarbonsäure-Zyklus im Vergleich zur Glycolyse langsam ablaufen. Dadurch hat der Organismus trotz der wesentlich geringeren Energieausbeute aus der Glycolyse einen Wachstumsvorteil. Diesen metabolischen "Kniff" nennt man Katabolitrepression oder, nach seinem Entdecker, Crabtree-Effekt.

Geht das Substratangebot in Gegenwart von Sauerstoff zurück, kann die Hefe das gebildete Ethanol wieder zu Pyruvat umsetzen und dieses in den Tricarbonsäurezyklus leiten, um weiterhin Energie gewinnen zu können. Teilweise geht das Pyruvat dann auch in die Gluconeogenese. Hierbei handelt es sich praktisch um eine umgekehrt ablaufende Glycolyse, die es der Zelle ermöglicht, auch unter diesen Bedingungen beispielsweise Bausteine für die Zellwand zu gewinnen.



Der Zellertrag  $Y$  (Yield, in Gramm Trockenzellmasse (gTZ) pro mol Substrat) kann theoretisch bestimmt werden und differiert sehr stark in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Sauerstoff. Fehlt der Sauerstoff, können durch fermentativen Stoffwechsel nur  $Y = 17,6$  gTZ/mol Glucose erreicht werden. Sind die Substratkonzentrationen unter aeroben Bedingungen gering genug, so daß der Crabtree-Effekt nicht zum Tragen kommt, liegt der Wachstumsertrag dagegen bei etwa  $Y = 104$  gTZ/mol Glucose. Diesen erhöhten Zellertrag unter aeroben Bedingungen nennt man Pasteur-Effekt.

### 1.5. Die Genetik von *Saccharomyces cerevisiae*

Der Nukleus dieser Hefe enthält im haploiden Zustand etwa 12,1 Millionen Basenpaare, die auf 16 Chromosomen verteilt sind. Das ist lediglich das 2,6-fache der DNA des Chromosoms von *Escherichia coli* als typischem Bakterium (mit 4,64 Millionen bp), aber nur etwa ein 273-stel des Genoms des Menschen (mit ca. 3,3 Milliarden bp). Die Hefeart *Saccharomyces cerevisiae* dient daher, aufgrund ihres für einen Eukaryoten relativ einfachen Aufbaus und auch wegen ihrer wirtschaftlichen Bedeutung, als Modellorganismus für viele biologische Forschungsrichtungen.

In der Folge ist sie sowohl genetisch als auch biochemisch einer der am intensivsten erforschten und am besten bekannten Organismen überhaupt. Das Chromosom III von *S. cerevisiae* wurde schon 1992 als erstes Chromosom eines eukaryotischen Organismus überhaupt durchgehend sequenziert (Oliver *et al.* 1992). Die Bäckerhefe wird aus diesem Grund häufig gentechnisch eingesetzt, sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die industrielle Biotechnologie.

Nicht nur in physiologischer, auch in genetischer Hinsicht gibt es große Unterschiede zwischen den industriell eingesetzten Heferasen. Während die *Saccharomyces cerevisiae*-Hefen zumeist einen normalen, doppelten Satz von Chromosomen besitzen, also diploid sind, treten bei den *Saccharomyces carlsbergensis*-Stämmen, die in der Bierherstellung z. B. für Lagerbiere eingesetzt werden, neben der Diploidie auch verschiedene Formen der Polyploidie (mit vielfachen Chromosomensätzen) und sogar Aneuploidien (vielfache Kopien von bestimmten Chromosomen) auf.

Eine gewünschte Konsequenz dieser Polyploidien ist eine erhöhte Stoffwechselleistung der Zellen (der sogenannte "Gen-Dosis-Effekt"), die man sich z.B. auch in der Landwirtschaft beim Getreide zunutze macht, um höhere Erträge zu erreichen. Eine erhöhte Leistungsfähigkeit kann man aber auch schon bei diploiden Hefestämmen gegenüber ihren haploiden Phasen beobachten.

## 1.6. Hefe in der Brauerei

In der Brauerei werden die sogenannten *obergärigen* Hefen von den *untergärigen* unterschieden. Obergärige Stämme bilden Sproßverbände, in denen sich während der Gärung gebildete Kohlendioxidbläschen fangen und die Hefezellen zur Oberfläche tragen. Die für den Brauer wichtigen phänotypischen Unterschiede dieser beiden Gruppen manifestieren sich auch in der Zuordnung in verschiedene Arten: die obergärigen Stämme werden in der Art *Saccharomyces cerevisiae* zusammengefaßt, während die untergärigen Typen als *Saccharomyces carlsbergensis* bezeichnet werden. Die Hefe sorgt in der Brauerei für die Umwandlung der Würze in Jungbier, wobei der in der Würze enthaltene Zucker durch die alkoholische Gärung zu Ethanol verstoffwechselt wird. Da die Hefe die im Korn vorhandene Stärke nicht direkt als Substrat verwenden kann, muß diese vorher im Sudhaus durch die im Malz vorhandenen Enzyme aufgeschlossen und in monomere bzw. oligomere Kohlenhydrate umgesetzt werden.

Für die Vergärung werden überwiegend diskontinuierliche Gärverfahren eingesetzt, in denen eine Starterkultur der Hefe in die Würze gegeben wird („Anstellen“), in der sie wächst und die dazu nötige Energie durch die Gärung gewinnt. Aufgabe des Brauers ist es dabei, diesen Vorgang im Hinblick auf ein optimales Produkt zu steuern. Dabei soll in erster Linie ein möglichst großer Anteil des Substrates in möglichst kurzer Zeit in Alkohol umgesetzt und nicht in neues Zellmaterial eingebunden werden.

Da der Stoffwechsel der Hefe allerdings wesentlich komplexer ist, entsteht auch ein ganzes Spektrum an sogenannten Gärungsnebenprodukten, die sich auf den Geschmack des Bieres stark auswirken können. Einige dieser Substanzen, wie die vicinalen Diketone (Diacetyl und Pentandion) führen zu deutlichen Fehlparfümen und sollen deshalb nicht im fertigen Bier vorkommen.

Allerdings sind bestimmte Nebenprodukte des Hefestoffwechsels in definierten, geringen Mengen zwar erwünscht, da sie den Geschmack positiv beeinflussen können, sie dürfen aber nicht in zu großen Mengen auftreten, um keine Fehlparfümen zu verursachen. Ein Teil dieser Substanzen, die sogenannten Fuselalkohole, sind Endprodukte des Aminosäurestoffwechsels der Hefe. Sie entstehen durch den Abbau von Oxosäuren, die bei der Transaminierung auftreten. Durch eine Transaminierungsreaktion kann die Zelle die Aminogruppe von einer Aminosäure zur Herstellung einer anderen Aminosäure, die nicht in ausreichenden Mengen vorhanden ist, verwenden.

Die übrig bleibenden Oxosäuren werden anschließend durch eine Decarboxylierung in die entsprechenden Alkohole überführt und von der Zelle ausgeschieden. Wachstum und Stoffwechsel der Hefe können neben der Zusammensetzung der Würze auch durch die Wahl geeigneter Gärungsparameter wie Temperatur und Druck entspre-

chend diesen Anforderungen beeinflusst werden (Miedaner *et. al.* 1974). Auch die Behandlung der Hefe vor dem Anstellen und die Zellzahl, mit der die Würze angestellt wird, hat einen großen Einfluß auf den Verlauf der Gärung. Wird die Hefe optimal vorbehandelt, verkürzt sich unter anderem die Anlauf- oder Lag-Phase, in der sich die Hefezellen an die neuen Bedingungen gewöhnen müssen, bevor das Wachstum einsetzen kann. Dies ist der erste Abschnitt einer typischen Wachstumskurve, wie sie in den diskontinuierlichen Gärungen auftritt.

Nach der Lag-Phase beschleunigt sich das Wachstum der Zellen immer mehr (Beschleunigungsphase) und tritt danach in eine Phase schnellstmöglicher Zellvermehrung über (exponentielle Phase). Durch den Abbau des Substrates und die Bildung von Stoffwechselprodukten (Ethanol, CO<sub>2</sub>) wird das Wachstum im weiteren Verlauf immer weiter verzögert (Retardierungsphase), bis es schließlich ganz zum Stillstand kommt und die Zellzahl nicht weiter zunimmt (stationäre Phase). Zu diesem Zeitpunkt ist die Gärung abgeschlossen, und in der Brauerei wird die Hefe aus dem fertigen Jungbier abgezogen. Verbleibt die Hefe weiterhin in dieser Kultur, ist nach der stationären Phase eine Abnahme des Anteils lebender Zellen zu beobachten (Absterbephase).

Ideal ist bei der Gärung eine kurze Lag-Phase und ein schnelles Wachstum der Hefe. Für den Brauer ist schließlich die Wahl eines für sein Gärverfahren optimal einsetzbaren Hefestammes wichtig, um unter den gegebenen Bedingungen in möglichst kurzer Zeit das gewünschte Produkt zu erhalten.

### 1.7. Möglichkeiten der Stammdifferenzierung

Die Klassifizierung des eingesetzten Stammes und dessen sichere Bestimmung ist ein wesentlicher Aspekt beim Einsatz von Mikroorganismen in technologischen Abläufen. Besonders in der heutigen Zeit, in der die Qualitätsanforderungen an Lebensmittel sehr hoch sind und weiter steigen, ist es für eine Brauerei von Bedeutung, den eingesetzten Stamm schnell und sicher bestimmen zu können. Die technischen Abläufe in der Produktion sind hinsichtlich des Verlaufs der Gärung und des Geschmacks des fertigen Produktes auf die Eigenschaften des eingesetzten Hefestammes abgestimmt. Dadurch kann eine in dieser Hinsicht gleichbleibend hohe Qualität des Produktes gewährleistet werden.

In der Vergangenheit wurden im wesentlichen Typisierungsmethoden auf der Basis physiologischer Eigenschaften eingesetzt. Aus naheliegenden Gründen werden für solche Typisierungen bevorzugt gärungs- und produktrelevante Eigenschaften herangezogen. Für den Brauer ist zunächst einmal interessant, ob es sich um eine obergärige oder untergärige Hefe handelt. Innerhalb der untergärigen Hefen kann nochmals grob

zwischen sogenannten Bruchhefen und Staubhefen differenziert werden, je nach dem, ob sich die Hefezellen nach der Hauptgärung zu Agglomeraten zusammenschließen oder nicht. Dies ist für die Klärung des Jungbieres und die anschließende Lagerung eine sehr wichtige Eigenschaft. Für die Bestimmung dieser Fähigkeit gibt es schon seit vielen Jahren eine recht zuverlässige Methode, den sogenannten Helmtest (Helm *et al.* 1952), der stetig weiterentwickelt wird (González *et al.* 1996, D'Hautcourt und Smart 1999). Daneben können auch Parameter wie die Gäraktivität und der Sauerstoffbedarf wichtige und technologisch relevante Daten zu einem Hefestamm liefern (Quain 1986).

Für eine weitergehende Differenzierung kann man verschiedene Charakteristika der Hefe heranziehen, z.B. die Form von sogenannten Riesenkolonien, die nach langer Inkubationszeit entstehen, die Resistenz gegen das Antibiotikum Cycloheximid, serologische Eigenschaften oder auch die Fähigkeit, auf verschiedenen Kohlenhydraten zu wachsen (Wickerham und Burton 1948, Quain 1986). Das Vermögen, auf verschiedenen Selektivmedien wachsen zu können, dient hingegen in erster Linie zur Unterscheidung von Kultur- und Fremdhefen (Röcken und Marg 1983).

Schließlich kann auch die in Art und Menge unterschiedliche Bildung von Gärungsnebenprodukten wie längerkettige Alkohole und vicinale Diketone eine Differenzierung verschiedener Stämme ermöglichen. Während die Bestimmung des Zuckerspektrums einer Hefe noch ohne großen apparativen Aufwand möglich ist, erfordert die Quantifizierung von Gärungsnebenprodukten, zumindest für einen zügigen Nachweis, den Einsatz von Gaschromatographen (Mändl *et al.* 1975, Narziß *et al.* 1982).

Die klassischen Methoden der Hefetypisierung haben allerdings einige Nachteile, die sie eher für eine begleitende Beschreibung der Hefe als für eine echte Bestimmung des einzelnen Stammes prädestinieren. So sind viele der Nachweismethoden von der aktuellen Konstitution der untersuchten Zellpopulation und den Umgebungsbedingungen (z.B. Temperatur und Nährstoffangebot) abhängig und besitzen eine gewisse Instabilität aufgrund von einzelnen Mutationen (Scheda und Yarrow 1966). Darüber hinaus sind viele der Analysen sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Insbesondere, wenn die in der Brauerei eingesetzte Hefe nicht im selben Betrieb gehalten, sondern z.B. aus einer anderen Brauerei oder einer externen Stammsammlung bezogen wird, kommt es auf eine schnelle und sichere Zuordnung an, die die bisher angesprochenen Methoden nicht leisten können.

Daher werden etwa seit Mitte der achtziger Jahre die Methoden der modernen Molekularbiologie auch für die schnelle und sichere Identifizierung von industriell genutzten Mikroorganismen eingesetzt (Quain 1986, Querol *et al.* 1992). In erster Linie sind dies Analysen, die genetische Unterschiede für eine Typisierung heranziehen und die teil-

weise in anderen Bereichen, wie z.B. der Medizin, für die Bestimmung von Krankheitserregern schon längere Zeit im Einsatz sind (Caligiorno *et al.* 1999, Speuer *et al.* 1999, Jonas *et al.* 2000, Sloos *et al.* 2000, Huys *et al.* 2000, Joung und Côté 2001).

Diese Methoden können in sehr unterschiedlichen Größenmaßstäben im Genom ansetzen und sowohl die Größe ganzer Chromosomen als auch geringste Abweichungen der Basensequenz zwischen Organismen miteinander vergleichen. Da die Veränderlichkeit der DNA innerhalb eines Genoms nicht gleichmäßig ist, können durch genetische Analysen sowohl phylogenetisch sehr weit auseinander liegende Taxa als auch sehr nahe verwandte Organismen gleichermaßen untersucht werden. Darüber hinaus sind einige der genetischen Analysen, insbesondere die auf PCR-Basis, sehr schnell und zuverlässig und daher für eine Routineanalytik geeignet.

## 1.8. Genetische Typisierungsmethoden

Eine häufig verwendete Methode, mit der man die Größe der Chromosomen miteinander vergleichen kann, ist die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE, Schwartz und Cantor 1984, Lai *et al.* 1989, Donhauser *et al.* 1990, Bentley *et al.* 1991). Bei dieser Analyse werden die Chromosomen als intakte Einheiten aus den Zellen isoliert und in einem Agarosegel mit Hilfe eines alternierenden elektrischen Feldes aufgetrennt. Da sich die Chromosomen in diesem gepulsten Feld immer wieder neu ausrichten müssen, ist es überhaupt möglich, DNA-Moleküle mit dieser Größe elektrophoretisch aufzutrennen.

Detailliertere Untersuchungen machen sich Sequenzunterschiede der DNA zunutze. Im "einfachsten" Fall, genannt RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), kann man dies mit dem Einsatz von Restriktions-Endonukleasen erreichen, die die DNA sequenzabhängig schneiden (Barberio *et al.* 1994, Guillamón *et al.* 1998, Hayford und Jakobsen 1999, Varga *et al.* 2000). Die so gewonnenen Fragmente können wiederum in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Muster miteinander verglichen werden. Treten nun Unterschiede im Abstand dieser Erkennungssequenzen auf oder sind sie in ihrer Zahl verschieden, so finden sich diese Unterschiede in den Bandenmustern wieder. Diese Methode stößt allerdings bei großen Genomen durch die hohe Anzahl der Fragmente an ihre Grenzen. In diesem Fall kann man die Methode durch die Hybridisierung dieser Fragmente mit speziell markierten DNA-Sonden verfeinern. Dazu werden die Bandenmuster auf eine Membran übertragen (Southern-Blot) und die Sonden hybridisieren darauf nur mit solchen Fragmenten, die eine zumindest in Teilen übereinstimmende Basenabfolge besitzen. So kann man gezielt einzelne Fragmente, die diese Sequenz enthalten, hervorheben (Schofield *et al.* 1995, Wightman *et al.* 1996, Miteva *et al.* 1998).

Genetische Analysen auf PCR-Basis (Polymerase Chain Reaction; de Barros Lopes *et al.* 1996, de Barros Lopes *et al.* 1998, Yoder *et al.* 1999, Yamagishi *et al.* 1999) wählen einen anderen Ansatz, indem sie sehr kleinräumige Differenzen ausnutzen, die sogar in einem einzigen Basenaustausch liegen können. Hierbei werden sehr kurze DNA-Abschnitte (Oligonukleotide) von etwa 20-30 Basenpaaren Länge, die sich an die zu untersuchende DNA anlagern können, als Ausgangspunkt für die DNA-Polymerase genutzt, die die DNA in mehreren Zyklen dupliziert. Im Idealfall kommt man so zu einer exponentiellen Vermehrung der gewünschten DNA, die z.B. auf einem Gel aufgetrennt und sichtbar gemacht werden kann.

Die PCR kann natürlich auch mit anderen Methoden, wie der RFLP, kombiniert werden, um Restriktionsmuster ganz bestimmter DNA-Bereiche untersuchen zu können (Brunel *et al.* 1997, Manceau und Horvais 1997, Nguyen *et al.* 2000).

Wenn man nun ein unbekanntes Genom untersuchen und dennoch Unterschiede zwischen nahe verwandten Organismen finden will, bedient man sich einer Spielart dieser Methode, der RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA, Nigatu *et al.* 1998, Taillez *et al.* 1998, Caligiorne *et al.* 1999, Moschetti *et al.* 2000). Hierbei bedient man sich willkürlich gewählter PCR-Primer mit zufälliger Basensequenz, die an unbekannt Positionen des Genoms anlagern und so statistisch ein Set aus unterschiedlich langen DNA-Abschnitten amplifizieren können. Das so mittels einer Gel-Elektrophorese entstehende Bandenmuster kann für den untersuchten Organismus charakteristisch sein und eine Unterscheidung ermöglichen.

Ein ähnlicher Ansatz, wenn auch mit bekannten DNA-Sequenzen, liegt der Mikrosatelliten-Analyse zugrunde (Walmsley *et al.* 1989, Rassmann *et al.* 1991, Field und Wills 1998, Ali *et al.* 1999, Rassmann und Leibhard 1999). Hierbei sind es Längenunterschiede von sogenannten Mikrosatelliten, das sind sich vielfach wiederholende, kurze DNA-Sequenzen im Genom, die man sich für eine Differenzierung nutzbar machen kann. Wenn die flankierenden Sequenzen bekannt sind, kann man mit der PCR diese Mikrosatelliten amplifizieren und die Längen dieser Fragmente miteinander vergleichen. Diese Methode wird in vielen Bereichen, in denen es auf eine genetische Typisierung sehr nahe miteinander verwandter Individuen ankommt, routinemäßig eingesetzt (van Belkum *et al.* 1992, Metzgar *et al.* 1998, Smouse und Chevillon 1998, Dalle *et al.* 2000).

Eine Kombination aus RFLP und PCR ist die sogenannte AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos *et al.* 1995, Janssen *et al.* 1996, de Barros Lopez *et al.* 1999, Jiang *et al.* 2000, Azumi und Goto-Yamamoto 2001). Bei dieser Methode werden an DNA-Fragmente, die durch zwei verschiedene Restriktionsenzyme gewonnen wurden, sogenannte Adapter (kurze, doppelsträngige DNA-Abschnitte) ligiert, die eine kom-

plementäre Sequenz für PCR-Primer besitzen. Nun kann man in einer PCR diese Fragmente oder eine Untergruppe davon amplifizieren und die so gewonnenen Bandenmuster in einem hochauflösenden Gel vergleichen. Das Prinzip ist dabei mit einer Hybridisierung von "normalen" RFLP-Fragmenten vergleichbar, nur daß man in diesem Fall wesentlich detailliertere Ergebnisse gewinnen kann.

Durch eine Sequenzierung, d.h. die Bestimmung der Basenabfolge in einem Bereich des Genoms, kann man auch geringste Unterschiede zwischen zwei Genomen herausarbeiten (Valente *et al.* 1999). Entscheidend ist hierbei die Wahl des zu sequenzierenden Bereiches. Abhängig vom Grad der Verwandtschaft hat man die Wahl zwischen Abschnitten verschieden großer Variabilität, z.B. Gene für essentielle Zellbestandteile wie Cytochrome (Biswas *et al.* 2001), die Sequenz von Genen für ribosomale RNA (rRNA, Ando *et al.* 1996, Fonseca *et al.* 2000) oder hochvariable ITS-Sequenzen (Internal Transcription Spacer) zwischen rRNA-Genen (Montrocher *et al.* 1998, Hsiang und Wu 2000).

Eine sehr aufwendige, aber auch sehr leistungsfähige Methode, Sequenzunterschiede in zwei einander sehr ähnlichen, kompletten Genomen zu untersuchen ist das "Genomic Mismatch Scanning" (Nelson *et al.* 1993, Brown 1994). Dabei werden Heteroduplices der durch ein Restriktionsenzym fragmentierten DNA von den beiden zu untersuchenden Organismen hergestellt und in mehreren Schritten alle Fragmente, die keine Heteroduplices mit komplett übereinstimmender Basensequenz sind, ausgesondert. Die so gewonnenen Abschnitte können mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden und als Sonden z.B. auf Mikrotiterplatten mit DNA-Proben, die das gesamte Genom repräsentieren, hybridisiert werden.

### 1.9. Immunologische Differenzierung

Neben den genetischen Charakteristika bieten auch immunologische Eigenschaften von Organismen eine Möglichkeit der Differenzierung. Hierbei werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper, die sehr spezifisch an bestimmte Oberflächenproteine der Zellen binden, eingesetzt. Der Vorteil dieser Methode, die bisher unter anderem für die Detektion von bierschädlichen Lactobazillen (Whiting *et al.* 1999 a) und Pediokokken (Whiting *et al.* 1999 b) entwickelt wurde, ist, daß sie sehr sensitiv und schnell ist. Bei der Detektion von Oberflächen-Antigenen entfällt auch der Aufschluß der Zellen und ggf. eine Extraktion und Reinigung von Zellbestandteilen, wie es bei der genetischen Differenzierung notwendig ist. Entscheidend ist hierbei aber, daß die zu unterscheidenden Organismen unterschiedliche Oberflächenantigene aufweisen. Solche Immunoassays können bei entsprechender Verfeinerung als Schnellnachweis innerhalb von etwa 10 Minuten zu einem Ergebnis führen (Olsen *et al.* 1998).

## 2. Zielsetzung

Die Betriebshefe der betrachteten Brauerei setzt sich aus zwei getrennt voneinander geführten Kulturen zusammen. Ziel dieser Arbeit war es, diese Hefen aufgrund ihrer physiologischen und genetischen Konstitution von anderen Hefestämmen und, wenn möglich, auch voneinander abzugrenzen sowie gegebenenfalls das Verhalten dieser beiden Anteile im Verlauf der Gärung sowie mehrerer Führungen zu untersuchen.

Die genetische Analyse sollte zudem klären, ob es sich bei der Betriebshefe tatsächlich um zwei oder eine andere Zahl verschiedener Stämme handelt. Optimales Resultat dieser Analysen wäre dabei ein sicherer Schnelldachweis für die Betriebshefe, z.B. auf Basis der PCR. Dies wäre sowohl für eine Eingangskontrolle in der Brauerei als auch für die Überwachung während der Gärungen von Bedeutung, falls in der Produktionshefe mehrere Stämme in bestimmten Anteilen enthalten sind.

Die vielen für die genetische Differenzierung eingesetzten Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit zudem auf ihre Eignung und die Leistungsfähigkeit für die nicht ganz einfache Unterscheidung von untergärigen Brauereihefen getestet.



## 3. Material und Methoden

### 3.1. Geräte

#### 3.1.1. Wachstumsversuche

Magnetrührer MR 3000 D

*Heidolph Instruments*, Schwabach

Kühlbad *Haake* K

Thermostat *Haake* F3

*Haake*, Hamburg

Zentrifuge

Zellanalyser CASYbrau

*Schärfe System*, Reutlingen

#### 3.1.2. HSGC-Analytik

Gaschromatograph GC 8500

Headspace-Probennehmer HS 101

Kapillarsäule PVMS/54L

Flammen-Ionisations-Detektor

Elektronen-Einfang-Detektor

*Perkin Elmer*, Boston, USA

Gas-Nachreinigungssystem Oxi- und Hydrosorb

*Messer*, Griesheim

#### 3.1.3. PCR

Thermocycler PTC 100

Thermocycler PTC 200

*MJ Research*, Waltham, USA

#### 3.1.4. Elektrophoresen

Kühleinheit Frigomix U-2

Thermostat Thermomix UB

*B. Braun*, Melsungen

Direct Blotting Sequencer 1500

Direct Blotting Membran

*GATC Biotech*, Konstanz

Temperierbad WK 250

*Lauda Dr. R. Wobser*, Lauda Königshofen

Spannungsgeber 2301 Macrodrive 1

Kontrolleinheit 2015 Pulsaphor

Elektrophoreseeinheit 2015 Pulsaphor

*LKB Biotechnology AB*, Bromma, Schweden

Spannungsgeber EPS 600

Elektrophoresekammer GNA 200

Elektrophoresekammer Hoefer HE 33

*Pharmacia Biotech*, Freiburg

### 3.1.5. Southern-Blotting

LKB 2016 Vacuum Blotting System

*LKB Biotechnology AB*, Bromma, Schweden

Nylon-Membran NY12N Nytran

*Schleicher & Schuell*, Dassel

### 3.1.6. Immunologischer Nachweis von DNA

GATC-Tube

UV-Schirm GATC-Link

*GATC Biotech*, Konstanz

Hybridisierungsöfen *Unitherm* Modell 12/24

*UniEquip*, Martinsried

### 3.1.7. Sonstiges

Glasperlen Ø 0,45 - 0,50 mm

*B. Braun*, Melsungen

Zentrifuge Labofuge GL

*Heraeus Instruments*, Hanau

Zentrifuge Sorvall RC-5B

*Kendro Laboratory Products GmbH*, Hanau

## 3.2. Reagenzien und Chemikalien

Taq-DNA-Polymerase

10x PCR-Puffer

*Amersham Pharmacia Biotech*, Piscataway, USA

Phenol

Phenol/Chloroform

Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan

*Carl Roth*, Karlsruhe

Hefeextrakt

Bacto-Pepton

*Difco Laboratories*, Detroit, USA

Dimethylsulfid

*Fluka Chemie AG*, Buchs, Schweiz

Agarose SeaKem LE

Agarose SeaKem GTG

Low-Melting Agarose SeaPlaque GTG

*FMC Bioproducts*, Rockland, USA

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

Ammoniumperoxodisulfat

TEMED

Streptavidin-AP-Konjugat

*GATC Biotech*, Konstanz

Stickstoff

*Linde Gas AG*, Höllriegelskreuth

1-Propanol

2-Methyl-1-propanol

3-Methyl-1-butanol

Acetaldehyd

Agar

Calciumsulfat

Chloroform

D-Glucose Monohydrat

Diacetyl

Ethanol

Ethanol LiChroSolv, gradient grade

Ethidiumbromid

Ethylacetat

Ethylbutyrat

Ethylhexanoat

Ethylpropionat

Harnstoff  
Isoamylacetat  
Isoamylalkohol  
Isobutanol  
Isobutylacetat  
Kaliumacetat  
Natriumacetat  
Natriumdodecylsulfat  
Pentandion  
Salzsäure

*Merck, Darmstadt*

*EcoRI*  
*FokI*  
*SacII*  
*SmaI*  
*XbaI*  
*XmaI*

*New England Biolabs, Frankfurt/Main*

Oligonukleotide

*MWG Biotech, Ebersberg*

*BamHI*  
*BspCI*  
*BssHIII*  
*CfoI*  
*PvuII*  
*RsrII*  
*SalI*  
*Sau3A*  
*SfiI*

Adenosin-5'-triphosphat

DNA Molecular Weight Marker II

DIG-Labeling-Mix

Anti-DIG-AP-Konjugat

5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (X-Phosphat, BCIP)

Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT)

*Roche Molecular Biochemicals, Mannheim*

Proteinase K  
 RNase A  
 Serva, Heidelberg  
 2-Methyl-1-butanol  
 Lyticase  
 Sigma Chemical Co., St. Louis, USA  
 Kieselgur "Celite"  
 World Minerals Inc., Santa Barbara, USA

### 3.3. Hefestämme

Die für die Experimente zur Differenzierung eingesetzten Hefen stammen aus der Hefebank der *Technischen Universität München-Weihenstephan*, der *VLB Berlin* sowie von der Firma *Doemens*, Gräfelfing. Die aus der Betriebshefe gewonnenen Isolate stammen von Kulturen der Firma *Doemens* ab. Die verwendeten Hefestämme und Isolate sind in Tabelle 1 aufgeführt.

---

Bezeichnung	Herkunft / Beschreibung
Stämme aus der Hefebank Weihenstephan:	
W34/70	Untergärige, bruchbildende Hefe <sup>*)</sup>
W34/78	Untergärige, bruchbildende Hefe <sup>*)</sup>
W44	Untergärige, bruchbildende Hefe <sup>*)</sup>
W66	Untergärige, nicht bruchbildende Hefe
W68	Obergärige Weißbier-Hefe
W69	Untergärige, bruchbildende Hefe <sup>*)</sup>
W71	Untergärige Staubhefe
W84	Untergärige, bruchbildende Hefe <sup>*)</sup>
W128	Untergärige, bruchbildende Hefe <sup>*)</sup>
W148	Obergärige Hefe
W159	Untergärige, bruchbildende Hefe
W170	Untergärige Staubhefe
W184	Obergärige Hefe
W195	Untergärige, bruchbildende Hefe

---

Tabelle 1: Auflistung der untersuchten Hefestämme. <sup>\*)</sup>: Donhauser *et al.* 1987.

---

Bezeichnung	Herkunft / Beschreibung
-------------	-------------------------

---

Stämme der Firma *Doemens* von 1999:

DWV1	entspricht dem untergärigen Hefestamm W34/70
DWV2	entspricht dem obergärigen Hefestamm W68
DWV3	entspricht dem untergärigen Hefestamm DGV, Bestandteil der Betriebshefe
DWV4	entspricht dem untergärigen Hefestamm IV, Bestandteil der Betriebshefe
DWV5	entspricht dem untergärigen Hefestamm W120

Stämme der Firma *Doemens* von 2000:

DGV	Bestandteil der Betriebshefe
IV	Bestandteil der Betriebshefe

Isolate aus der Betriebshefe:

VBH9810	Isolat der Betriebshefe vom Januar 1998
VBH9812	Isolat der Betriebshefe vom Januar 1998
VBH9901	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9902	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9903	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9904	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9905	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9906	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9907	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9908	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9909	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9910	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9911	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9912	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9913	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9914	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999

---

---

Bezeichnung	Herkunft / Beschreibung
VBH9915	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH9916	Isolat der Betriebshefe vom Mai 1999
VBH0101	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0102	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0103	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0104	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0105	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0106	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0107	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0108	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0109	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0110	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0111	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0112	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0113	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0114	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0115	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0116	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0117	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0118	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0119	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
VBH0120	Isolat der Betriebshefe vom Juni 2001
Stämme der VLB Berlin:	
BDGH1	Untergärige Druckgärhefe
BDGH2	Untergärige Druckgärhefe
BDGH3	Untergärige Druckgärhefe
BDGH4	Untergärige Druckgärhefe
BDGH5	Untergärige Druckgärhefe
BDGH6	Untergärige Druckgärhefe
BDGH7	Untergärige Druckgärhefe

---

Tabelle 1: Fortsetzung

### 3.4. Kulturmedien

#### 3.4.1. Würzemedien

- Würzeagar: Mit 1,5 % Agar verfestigte, gehopfte Bierwürze.
- W1-Medium: gehopfte und über Kieselgur filtrierte Bierwürze

#### 3.4.2. YPG-Medium

- 5 g/l Hefeextrakt
- 10 g/l Pepton
- 20 g/l D-Glucose

Die fertige Lösung wurde 15 min bei 121°C autoklaviert und bei Verwendung als Festmedium 15 g/l Agar zugegeben.

#### 3.4.3. Sterilisationsmethoden

Alle Nährmedien wurden vor Gebrauch 15 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert.

### 3.5. Stammhaltung

Die Hefen wurden in mit Parafilm verschlossenen Petrischalen oder Reagenzgläsern auf Würze- oder YPG-Agar ausgestrichen, 2 Tage bei 25 - 27°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Eine Überimpfung auf frisches Medium erfolgte alle 2 -3 Monate.

### 3.6. Physiologische Charakterisierung von Hefe

#### 3.6.1. Helmtest

Zur Bestimmung und Quantifizierung des Flockulationsvermögens ausgewählter Hefestämme wurde der Helmtest (Helm *et al.* 1952) mit einigen Abwandlungen eingesetzt. Die zu untersuchenden Hefen wurden dazu in 50 ml Würzemedium angeimpft und 24 h bei RT auf einem Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur wurden 100 ml des gleichen Mediums angeimpft und wie zuvor inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen in drei Durchgängen in einem 50 ml-Zentrifugengefäß abzentrifugiert.

Das Pellet wurde zweimal mit HT-Puffer (0,56 g/l CaSO<sub>4</sub>, 6,8 g/l Na-Acetat, pH 4,5) gewaschen und anschließend gewogen. Pro Gramm Zellen wurden 10 ml HT-Puffer zugegeben, die Zellen resuspendiert und Aliquots von 10 ml auf drei graduierte 15 ml-Zentrifugengefäße verteilt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde die Suspension erneut homogenisiert und nach 10 min sowie nochmals nach 2 h die Sedimentmenge abgelesen.



### 3.6.2. Analyse der Zuckerverwertung

Für die Analyse der von den Hefen als Substrat verwertbaren Kohlenhydrate wurde das Identifizierungssystem API 20C AUX der Firma *BioMérieux*, Marcy l'Etoile, Frankreich entsprechend dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Die Auswertung erfolgte nach sechs Tagen bei einer Inkubationstemperatur von 27°C.

### 3.6.3. Wachstumsversuche

Für die Wachstumsversuche wurden stets zwei Hefekulturen parallel in der gleichen Charge des Nährmediums untersucht. Für diese Versuche und die gaschromatographischen Analysen der Gärungsnebenprodukte wurden die von einer Würzeagar-Platte abgeimpften Hefen zunächst für einen Tag in einem Erlenmeyerkolben mit 40 ml des auch im Wachstumsversuch verwendeten Mediums bei 27°C unter leichtem Rühren auf einem Magnetrührer inkubiert. Anschließend wurde diese Kultur quantitativ in einen Erlenmeyerkolben mit 200 ml desselben Mediums überführt und einen weiteren Tag unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Mit einem entsprechenden Aliquot dieser Starterkultur wurden Glaskolben mit 2 l W1-Medium so angestellt, daß in beiden eine möglichst gleiche Zellzahl vorhanden war. Die Hefen wurden für die Analyse der Wachstumseigenschaften und der Gärungsnebenprodukte bei 20°C in einem Wasserbad inkubiert, das an einen Temperierbad angeschlossen war. Dabei wurde die Zellsuspension auf einem Magnetrührer mit 150 rpm gerade so stark gerührt, daß sich die Zellen nicht auf dem Gefäßboden absetzen konnten.

Für die Analysen der Hefeparameter Lebendzellzahl, Lebendzellanteil, mittleres Zellvolumen und die Größenverteilung wurde dasselbe Hefeanalysegerät eingesetzt, das auch für Routineanalysen in der Brauerei verwendet wurde. Die Hefeproben wurden entsprechend den Erfordernissen des Gerätes, das für eine optimale Analyse eine Hefezellzahl von 30.000 bis 50.000 Zellen pro ml benötigt, mit dem vom Hersteller empfohlenen und angebotenen CASYton verdünnt. Es wurde in einem Probenvolumen von 600 µl gemessen.

### 3.6.4. Headspace-Gaschromatographie

Für die Analysen der Würze mittels Headspace-Gaschromatographie (HSGC) wurden jeweils 50 ml der Hefesuspension 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und ein Aliquot von 5 ml des Überstandes mit 1 ml internem Standard (Isobutanol, Endkonzentration 40,5 mg/l) in die Analysen-Vials für den Chromatographen überführt.

Wenn die Analysen nicht sofort durchgeführt werden konnten, wurden die Proben für maximal einen Tag bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Der Gaschromatograph war mit je einer Kapillarsäule (50 m Länge, 0,32 mm interner Durchmesser, 1  $\mu\text{m}$  Schichtdicke) für den FID (Flammen-Ionisations-Detektor zum Nachweis von höheren Alkoholen, Estern, Acetaldehyd und Dimethylsulfid) und für den ECD (Elektronen-Einfang-Detektor für den Nachweis der vicinalen Diketone) ausgestattet.

Diese beiden Säulen wurden parallel mit der gesplitteten Probe beschickt. Als Trägergas wurde Stickstoff mit einem Druck von 135 kPa eingesetzt. Für die Kalibrierung des Gerätes wurde für jeden Detektor eine Stammlösung verwendet. Für die FID-Stammlösung wurden in einem Endvolumen von 200 ml Ethanol die zu kalibrierenden Substanzen in den in Tabelle 2 dargestellten Mengen zugegeben.

Die ECD-Standardlösung wurde auf die gleiche Art hergestellt und enthielt die in Tabelle 3 angegebenen Substanzen.

Substanz	Dichte ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	Volumen ( $\mu\text{l}$ )*	Konzentration ( $\text{mg}/\text{l}$ )
1-Propanol	0,800	2.500	10.000,00
2-Methyl-1-propanol	0,800	700	2.800,00
2-Methyl-1-butanol	0,811	1.200	4.866,00
3-Methyl-1-butanol	0,810	4.500	18.225,00
Ethylacetat	0,900	2.600	11.700,00
Ethylpropionat	0,890	20	89,00
Ethylbutyrat	0,878	10	43,90
Ethylhexanoat	0,870	20	87,00
Isoamylacetat	0,870	250	1.087,50
Isobutylacetat	0,868	5	21,70
Acetaldehyd	0,780	1.000	3.900,00
Dimethylsulfid	0,847	10	42,35

Tabelle 2: Substanzmengen der Standardlösung für den FID.

\* in 200 ml Lösungsvolumen

Substanz	Dichte (g/cm <sup>3</sup> )	Volumen (µl)*	Konzentration (mg/l)
Diacetyl	0,99	50	247,50
Pentandion	0,96	50	240,00

Tabelle 3: Substanzmengen der Standardlösung für den ECD

\* in 200 ml Lösungsvolumen

Von der FID-Stammlösung wurden für eine Vier-Punkt-Kalibrierung Verdünnungsreihen mit 200 µl, 300 µl, 400 µl und 500 µl der Stammlösung in 200 ml 5 %igem Ethanol hergestellt. Von der ECD-Stammlösung wurden 20 µl, 30 µl, 40 µl, 60 µl und 80 µl in 200 ml 5 %igem Ethanol für eine Fünf-Punkt-Kalibrierung verwendet. Für die Headspace-Probenahme wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Probentemperatur: 65°C (Aufheiz-Zeit: 115 min)

Nadeltemperatur: 90°C

Transfertemperatur: 100°C.

Die Chromatographie erfolgte nach dem in Tabelle 4 aufgeführten Temperaturprogramm. Die Injektionstemperatur betrug dabei 120°C, der FID hatte eine Temperatur von 250°C, der ECD von 170°C. Die Auswertung der so gewonnenen Ergebnisse erfolgte über die "Chem Station"-Software der Firma *Hewlett Packard* (Palo Alto, USA).

Schritt	Temperatur (°C)	Haltezeit (min)	Aufheizrate (°C/min)
1	65,0	7,0	6,0
2	70,0	3,0	15,0
3	180,0	0,1	25,0
4	220,0	4,0	–

Tabelle 4: Temperaturprogramm für die Headspace-Gaschromatographie

## 3.7. Molekularbiologische und genetische Methoden

### 3.7.1. Präparation von Gesamtzell-DNA

#### 3.7.1.1. DNA-Extraktion

Die Extraktion von DNA für die genetischen Analysen (außer PFGE) erfolgte nach einem von zwei Protokollen, je nach benötigter Menge.

Für die Gewinnung größerer Mengen wurde die Methode nach Seehaus *et al.* (1985) mit einigen Veränderungen eingesetzt. Dazu wurden die Zellen nach Anzucht in YPG-Medium (24 h bei 25°C) mit 1200 U Lyticase enzymatisch aufgeschlossen (37°C für 1 h). Die so entstandenen Protoplasten wurden mit 1% SDS aufgeschlossen und die DNA durch Phenol-, Phenol/Chloroform und CIA-Extraktion gereinigt.

Die gereinigte Nukleinsäure wurde durch Zugabe von 96 %igem Ethanol gefällt, resuspendiert und die RNA-Anteile mit 200 µg RNase A abgebaut. Die DNA wurde ein weiteres Mal durch Extraktion mit Phenol/Chloroform und CIA gereinigt, nochmals mit Ethanol gefällt und schließlich in bidestilliertem Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Agarosegel.

Für die Gewinnung kleinerer Mengen wurden die Zellen aus 15 ml YPG-Medium mittels Glasperlen in TE-Puffer mit 1 % SDS und einer Phenolphase mit gleichem Volumen mechanisch aufgeschlossen und wie oben beschrieben gereinigt, gefällt und in bidestilliertem Wasser gelöst. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte wie zuvor beschrieben durch den Vergleich mit Mengenstandards im Agarosegel.

#### 3.7.1.2. Chromosomenpräparation für die PFGE

Für die Präparation der intakten Chromosomen wurde das Verfahren von Schwartz und Cantor (1984) eingesetzt. Die über 24 h bei 25°C in 50 ml YPG-Medium herangezogenen Zellen wurden mit 170 U Lyticase in 2 %iger Low-Melting-Agarose eingeschlossen und nach der Freisetzung der Zellinhaltsstoffe (Inkubation für 20h bei 37°C) die Zellproteine mit Proteinase K (400 µg pro Ansatz) durch Inkubation bei 50°C für 48 h abgebaut. Die Lagerung der so gewonnenen Inserts erfolgte in LET-Puffer bei 4°C.

### 3.7.2. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

#### 3.7.2.1. Agarose-Gelelektrophoresen

Die DNA aus Restriktionen oder PCR wurde standardmäßig in einem 1 %igen Agarosegel in TAE-Puffer aufgetrennt. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Elektrophorese von PCR-Produkten in Minigelen (25 ml Gelvolumen) in 30 Minuten mit einer Spannung von 110 V durchgeführt.

Für die Elektrophorese von Restriktionsfragmenten in Minigelen wurde die Gelkammer vor dem Einsatz zusätzlich bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Die Elektrophorese erfolgte hierbei mit einer Spannung von 60 V und einer Laufzeit von 2 h.

Elektrophoresen in großen Gelen (Maxigele, Gelvolumen 200 ml) wurden mit der gleichen Zusammensetzung über 4 h mit einer Spannung von 125 V bzw. 16 h mit 36 V bei  $8^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die Dokumentation der mit Ethidiumbromid gefärbten Gele erfolgte mittels eines Fotoapparates auf einem UV-Schirm.

### 3.7.2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten bei der Mikrosatelliten-Typisierung (Punkt 3.7.6.) und AFLP (Punkt 3.7.7.) wurde ein 4 %iges, denaturierendes Polyacrylamid-Gel in TBE-Puffer mit einer Länge von 32 cm und einer Stärke von 0,2 mm verwendet. Vor dem Probenauftrag wurde ein Vorlauf mit einer konstanten Leistung von 30 W für 30 Minuten durchgeführt.

Nach einem Probeneinlauf mit 500 V für ca. 4 min erfolgte die Elektrophorese bei einer konstanten Leistung von 30 W bei ca. 1700 V und ca. 18 mA. Die so aufgetrennte DNA wurde direkt auf eine 40 cm lange Nylonmembran geblottet. Die Membran wurde nach dem Auftreffen der Blaupuffer-Front mit 19 cm/h (Dauer: 2:07 h) transportiert.

### 3.7.2.3. Pulsfeld-Gelelektrophoresen

Für die PFGE-Analysen wurden die Hefezellen, die während 24 h bei  $25^{\circ}\text{C}$  in 50 ml YPG-Medium gewachsen waren, entsprechend dem Protokoll von Schwartz und Cantor (1984) in 500  $\mu\text{l}$  0,5 %iger Low Melting-Agarose eingebettet und darin mit 1200 U Lyticase aufgeschlossen. Die so freigesetzten Chromosomen wurden mit einem Pulsaphor-System aufgetrennt.

Während des Laufs wurden die 1,2 %igen Agarosegele in 0,5 x TBE-Puffer (7,73 g/l Tris, 1,31 g/l Borsäure, 0,45 g/l  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ) durch ein Temperierbad auf  $14^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Folgende Parameter wurden standardmäßig für die Elektrophoresen gewählt:

Laufzeit: 52 h

Pulszeit: 104 s

Spannung: 165 V

Stromstärke: 40 mA.

Die Gele wurden anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt und auf einem UV-Schirm fotografiert.

### 3.7.3. Restriktionsanalysen

Für die RFLP-Analysen wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Restriktionsendonukleasen verwendet. Der Einsatz der Enzyme erfolgte mit 20 U pro Ansatz gemäß den Angaben des Herstellers in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Die Dauer der Restriktionen war 4 h oder über Nacht.

Name	Herkunft	Erkennungssequenz
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5'–G•GATCC–3'
<i>Bsp</i> CI	<i>Bacillus species</i> CI	5'–CGAT•CG–3'
<i>Bss</i> HII	<i>Bacillus stearothermophilus</i> H3	5'–G•CGCGC–3'
<i>Cfo</i> I	<i>Clostridium formicoaceticum</i>	5'–GCG•C–3'
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	5'–G•AATTC–3'
<i>Fok</i> I	<i>Flavobacterium okeanokoites</i>	5'–GGATG(N)9•–3'
<i>Pvu</i> II	<i>Proteus vulgaris</i>	5'–CAG•CTG–3'
<i>Rsr</i> II	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	5'–CG•G(A,T)CCG–3'
<i>Sac</i> II	<i>Streptomyces achromogenes</i>	5'–CCGC•GG–3'
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i>	5'–G•TCGAC–3'
<i>Sau</i> 3A	<i>Staphylococcus aureus</i>	5'–•GATC–3'
<i>Sfi</i> I	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	5'–GGCC(N)4•NGGCC–3'
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	5'–GGG•CCC–3'
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas badrii</i>	5'–T•CTAGA–3'
<i>Xma</i> I	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	5'–C•CCGGG–3'

Tabelle 5: Verwendete Restriktionsenzyme.

• kennzeichnet die Schnittstelle des Enzyms im angegebenen Einzelstrang.

### 3.7.4. PCR

#### 3.7.4.1. Allgemeines

Die Annealing-Temperatur und die Anzahl der Zyklen wurden auf die jeweiligen Erfordernisse abgestimmt, es wurde aber, mit Ausnahme der AFLP-PCRs, das in Tabelle 6 dargestellte prinzipielle Schema verwendet (Tabelle 6).

Schritt	Temperatur	Dauer (min:s)
1	94°C	1:30
2	94°C	0:30
3	$m^{\circ}\text{C}$	0:30
4	72°C	0:30
5	$n$ mal zu Schritt 2	
6	72°C	1:00
7	4°C	halten

Tabelle 6: Allgemeines PCR-Programm für Standard-Reaktionen (außer AFLP).  
 $m$  bezeichnet die Annealing-Temperatur,  $n$  die Anzahl der zusätzlichen Zyklen.

Die erste AFLP-PCR mit den allgemeinen Primern erfolgte im wesentlichen nach dem Protokoll von Vos *et al.* (1995), außer daß in dieser Arbeit über 30 Zyklen statt 20 amplifiziert wurde. Für die spezifische AFLP-PCR wurde ein "Touchdown"-Protokoll eingesetzt, das dem von Vos *et al.* (1995) beschriebenen entspricht.

Bestandteil	Konzentration	Menge
H <sub>2</sub> O		12,8 µl
Puffer	10 x	3,0 µl
dNTP-Mix	je 2 mM	3,0 µl
Primer fw	2,5 pmol/µl	4,0 µl
Primer rv	2,5 pmol/µl	4,0 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,2 µl
Template -DNA		3,0 µl

Tabelle 7: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (außer spezifischer AFLP-PCR).

Die Standard-PCR erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 30 µl, wobei das in Tabelle 7 dargestellte Rezept verwendet wurde. Für die spezifische AFLP-PCR wurden abweichend davon 1,6 µl des mit Biotin markierten *EcoRI*-Primers und 2,4 µl des *MseI*-Primers eingesetzt und die H<sub>2</sub>O-Menge entsprechend angepaßt.

### 3.7.4.2. Oligonukleotid-Primer für die PCR

Primer für die Herstellung einer chromosomalen DNA-Sonde

Für die Herstellung der *Ty1-15*-Sonde wurde ein Primerpaar verwendet, mit dem das gesamte Transposon mit einer Länge von ca. 1,4 kb amplifiziert (Daten entsprechend den Sequenzen der SGD) wurde.

---

Bezeichnung	Länge	Sequenz
ty1.4-fw	21-mer	5'-CAA TTA TCT CAA CAT TCA CCC-3'
ty1.4-rv	21-mer	5'-GAT GAG CAG ATC TTA TAA GGG-3'

---

Tabelle 8: Sequenzdaten der Primer für die Herstellung von Transposon-Sonden

### 3.7.4.3. Primer für die Sequenzierung

Die Sequenzierungsprimer dienten der Amplifizierung zweier DNA-Bereiche auf den Chromosom XIII bzw. XV. Die genauen Genorte, die sequenziert wurden, sind in Tabelle 9 dargestellt.

---

Bezeichnung	Länge	Sequenz
chr13.seq1-fw	24-mer	5'-TCT GAA TCT TTT GTG ATT AGA ACG-3'
chr13.seq1-rv	20-mer	5'-GCC AGT AAT TCC AGC TTT TG-3'
chr15.seq1-fw	23-mer	5'-GAC GTT AAT AGG AAC TCA TGG TG-3'
chr15.seq1-rv	20-mer	5'-TGG TAA TCC GGA AGA TCA GT-3'

---

Tabelle 9: Sequenzdaten der Primer für die Sequenzierung

### 3.7.4.4. Primer für die Mikrosatelliten-Typisierung

Die für die Mikrosatelliten-Typisierung verwendeten Primer wurden mit Hilfe der SGD erstellt. Die Sequenz der Mikrosatelliten für den Referenzstamm in der SGD, bezeichnet mit S288C, sind im Anhang dargestellt.



Bezeichnung	Länge	Sequenz
chr04-tta-193-fw	20-mer	5'-AGGGAAAGAGCGAAGAAGTT-3'
chr04-tta-193-rv	22-mer	5'-CAATCTGTGCGTAAAGCAGTG-3'
chr04-ta-196-fw	20-mer	5'-ATCTTTGAAGGCTTGTGCTG-3'
chr04-ta-196-rv	24-mer	5'-GTGCCATATCTTCATACTATGAGA-3'
chr06-gt-135-fw	22-mer	5'-ACTCACGTTATCAGGCTCATAG-3'
chr06-gt-135-rv	22-mer	5'-GCACCAGAAAGTGTGCTTACTT-3'
chr07-tta-216-fw	22-mer	5'-TATCTCTGCGGAAGACTAAGAC-3'
chr07-tta-216-rv	20-mer	5'-TACGCTGACAAGTTTTTGGC-3'
chr08-taa-230-fw	23-mer	5'-TGGCAATAATGCTAACACATTAC-3'
chr08-taa-230-rv	26-mer	5'-CCAGATAAGATAAATCAAAGATTTTT-3'
chr12-ga-176-fw	19-mer	5'-GGGGAAACTGGAATGAAAT-3'
chr12-ga-176-rv	25-mer	5'-CTTCCTTTTCTACTATCTTCTCTTT-3'
chr13-tta-223-fw	23-mer	5'-GCAATGGTGTAGATACTTCTTAT-3'
chr13-tta-223-rv	20-mer	5'-CCTCTTCAAGCATGACCTTT-3'
chr15-taa-195-fw	23-mer	5'-TGCTGTTTATTCTGACCTTTTAC-3'
chr15-taa-195-rv	20-mer	5'-GGTTATTCTCGGAGCATTCT-3'
mito01-ta-189-fw	24-mer	5'-GAAACCCCTCATTTTATCATTAT-3'
mito01-ta-189-rv	24-mer	5'-TAAATATAATTA AAAAGTCCGCTCC-3'
mito02-tta/ta-393-fw	28-mer	5'-ACAATTATAATAAAAATTACAATTACAA- 3'
mito02-tta/ta393-rv	22-mer	5'-TTGAAAATAATAATTGGGACCC-3'
mito03-ta/tta-416-fw	25-mer	5'-GATTTGAACTTAGATAATATGCACC-3'
mito03-ta/tta416-rv	25-mer	5'-CTCCACAGATATATATCCAAA ACTC-3'
mito04-tttta/taa-272-fw	20-mer	5'-TATTTAAGAAGGAGTGCGGG-3'
mito04-tttta/taa-272-rv	23-mer	5'-GTCGTAACCATTAGACGATAAGG-3'

Tabelle 10: Sequenzdaten der Primer für die Mikrosatelliten-Analyse

### 3.7.5. Sequenzierung

Die Sequenzierung von je zwei Isolaten der Stämme DWV3 (benannt DWV3/10 und DWV3/42) und DWV4 (benannt DWV4/10 und DWV4/18) sowie den Referenzstämmen W34/70, W66 und der obergärigen Hefe DWV2 erfolgte durch die Firma *MWG Biotech*, Ebersberg.

Zunächst wurden zwei Bereiche geeigneter Größe ausgewählt, die zwischen zwei ORFs liegen und selbst keine codierenden Sequenzen beinhalten. Diese Abschnitte wurden mit Hilfe der *Saccharomyces* Genome Database der *Stanford University*, USA ausgesucht.

Chromosom	Koordinaten	Größe	ORF "upstream"	ORF "downstream"
XIII	297330 - 297534	205 bp	SNR78	SNR77
XV	842177 - 842398	221 bp	SNR31	SNR5

Tabelle 11: Loci für die Sequenzierung, entsprechend den genomischen Daten der *Saccharomyces* Genome Database (SGD) der *Stanford University*.

Die DNA-Abschnitte wurden mit der PCR (siehe Punkt 3.7.4.) amplifiziert und anschließend mittels eines QIAquick Gel Extraction Kits der Firma *Qiagen*, Hilden, für die Sequenzierung gereinigt. Die Alignments zum Vergleich der Sequenzen wurden manuell erstellt.

### 3.7.6. Mikrosatelliten-Typisierung

Für diese Methode wurde die entsprechend Punkt 3.7.1.1. extrahierte DNA 1:100 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und in einer Standard-PCR-Reaktion (siehe Punkt 3.7.4.) eingesetzt. Die so gewonnenen PCR-Produkte wurden wie unter Punkt 3.7.2.2. beschrieben aufgetrennt und entsprechend den Angaben in Abschnitt 3.8.2. und 3.8.3. nachgewiesen.

### 3.7.7. AFLP-Analytik

Für die Untersuchung der "Amplified Fragment Length"-Polymorphismen wurde im wesentlichen das Protokoll von Vos *et al.* (1995) verwendet. Abweichend davon wurde für die Restriktion der wie in Punkt 3.7.1.1. gewonnenen DNA der Puffer des Enzyms *MseI* verwendet und der Ansatz zwei Stunden inkubiert. Weiterhin wurde der Ligations-Mix mit dem Puffer der T4-Ligase hergestellt und die Ligation bei 15°C über Nacht durchgeführt.

Die Grundsequenz der Adapter und der allgemeinen Primer für die AFLP wurde ebenfalls von Vos *et al.* (1995) übernommen. Für diese Arbeit wurden die spezifischen *EcoRI*-Primer an ihrem 5'-Ende mit Biotin markiert. Von diesem Primer wurden vier selektive

Versionen mit jeweils einem einzelnen selektiven Nukleotid am 3'-Ende eingesetzt. Die *Mse*I-Primer wurden mit jeweils zwei selektiven Nukleotiden versehen. Dabei wurden die acht Kombinationen -AA, -AT -AC, -AG sowie -GA, -GT, -GC und -GG verwendet. Die Adapter wurden von der Firma *MWG Biotech*, Ebersberg bezogen. Die PCR-Reaktionen für die Amplifikation der DNA-Fragmente sind unter Punkt 3.7.4 beschrieben. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte wie unter Punkt 3.7.2.2. beschrieben, der Nachweis entsprechend den Angaben unter Punkt 3.8.3.

## 3.8. Biochemische und sonstige Methoden

### 3.8.1. Southern-Blotting

Die mit Restriktionsenzymen behandelte DNA wurde über 4 h bei 40 V in einem Minigel aufgetrennt (siehe Punkt 3.7.2.1.) und anschließend durch Vakuumblotting entsprechend dem Protokoll des Herstellers (*LKB*, Bromma, Schweden) auf eine Nylon-Membran übertragen.

### 3.8.2. Hybridisierung von membranfixierter DNA mit DNA-Sonden

Die Hybridisierung von mit Restriktionsenzymen behandelte genomischer DNA erfolgte mit Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden, die die Sequenz und Größe des *Ty1-15*-Transposons besaßen. Für die Mikrosatelliten-Analyse (siehe Punkt 3.7.6) wurden die korrespondierenden DNA-Abschnitte des Referenzstammes W34/70 verwendet. Diese DNA-Sonden wurden mit Hilfe in einer ansonsten normalen PCR-Reaktion (siehe Punkt 3.7.4.) mit einem DIG-Labeling-Mix hergestellt, durch das DIG-markierte Nukleotide in den DNA-Strang eingebaut werden. Die mit einem Southern-Transfer (für mit Restriktionsenzymen behandelte DNA) oder direkt (siehe Punkt 3.7.2.2.) auf eine Membran geblottete DNA wurde nach dem Trocknen durch 1 min UV-Crosslinking mit einem UV-Strahler fixiert.

Wenn die fixierte DNA noch nicht selbst durch entsprechende PCR-Primer markiert war, wurde sie für die immunologische Detektion zunächst mit geeigneten DNA-Sonden hybridisiert. Die entsprechenden Sonden sind in Abschnitt 3.7.4. beschrieben. Die Hybridisierung erfolgte in einem Hybridisierungs-ofen mit einer GATC-Tube entsprechend dem Protokoll des "DIG DNA Detection Kits" der Firma *Roche Molecular Biochemicals*, Mannheim über Nacht bei 68°C.

### 3.8.3. Immunologischer Nachweis von DNA

Die Detektion von mit Digoxigenin markierter DNA erfolgte mit einem Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, für den Biotin-Nachweis wurde ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat eingesetzt. Der Nachweis der Sonden fand, wie die Hybridisierung, in einem Hybridisierungsofen mit einer GATC-Tube entsprechend dem Protokoll des Herstellers bei 30°C statt.

Die Nachweisschritte unterschieden sich nach der Anlagerung des entsprechenden Konjugates nicht mehr voneinander. Bei dem hier eingesetzten enzymgebundenen Immunnachweis mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) markiert schließlich ein dunkler Farbniederschlag die Positionen der DNA-Banden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Physiologische Charakterisierung von Betriebshefe-Isolaten und Referenzstämmen

Für eine physiologische Charakterisierung der Betriebshefe wurden zwei von insgesamt 16 Isolaten ausgewählt (bezeichnet mit VBH9810 und VBH9812), die sich anhand einer Pulsfeld-Gelelektrophorese jeweils einem von zwei vorkommenden Typen zuordnen ließen. Diese beiden Gruppen unterschieden sich durch das Vorhandensein bzw. das Fehlen einer Chromosomenbande (siehe Punkt 4.2.1.). Zusätzlich wurden die Eigenschaften dieser Isolate mit denen von zwei Referenzstämmen, der bruchbildenden Hefe W34/70 und der nicht bruchbildenden Hefe W66 der Hefebank Weihenstephan, verglichen.

Diese vier Hefen wurden hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften, der pH-Wert Entwicklung und der Produktion von verschiedenen Gärungsnebenprodukten (u.a. höhere Alkohole, Ester, vicinale Diketone, siehe Tabelle 12) in einer standardisierten Batch-Kultur untersucht. Weitere Analysen bezogen sich auf das Bruchbildungsvermögen (Flockulation) sowie die Fähigkeit, verschiedene Zucker als Kohlenstoffquelle zu verwerten.

#### 4.1.1. Wachstumseigenschaften der Isolate VBH9810 und VBH9812 in Würzemedium

Zunächst wurde untersucht, inwiefern sich die ausgewählten Hefen in ihren allgemeinen Wachstumseigenschaften in einer Batch-Kultur unterscheiden. Dazu wurden die Hefen unter gleichmäßigen Bedingungen in 2 Liter fassenden Glasflaschen bei 20°C unter Rühren mit 150 rpm kultiviert und regelmäßig die Parameter Zellzahl, Lebendzellanteil und mittleres Zellvolumen mit dem Hefeanalyser CASYbrau (Brauwelt 1995) ermittelt.

##### 4.1.1.1. Lebendzellzahl

Im Verlauf der Gärung zeigten die beiden Betriebshefe-Isolate ein sehr weit übereinstimmendes Wachstum. Nach einer Lag-Phase von etwa 8 Stunden Dauer traten beide Isolate in die exponentielle Wachstumsphase ein, die nach weiteren 20 Stunden beendet war (Retardierungsphase, siehe Abbildung 4). Nach etwa 80 Stunden war das Wachstum praktisch zum Stillstand gekommen. In dieser Zeit hatte sich die Lebendzellzahl von etwa 2,5 Mio/ml auf knapp 73 Mio/ml beim Isolat VBH9810 bzw. 76 Mio/ml bei VBH9812 erhöht, was etwa einer Verdreißigfachung der Anfangszellzahl entspricht. Bei

mehrfachen Gärungen mit vergleichbarer Anfangszellzahl wurde dieser Wert immer wieder recht genau erreicht. Die Zellzahlen der beiden Vergleichsstämme erreichten ebenfalls Werte in diesem Bereich, allerdings gingen die Werte bei der Bruchhefe W34/70 nach einer Gärdauer von 76 Stunden stark zurück und die Zellen setzten sich am Gefäßboden ab (Daten nicht gezeigt).

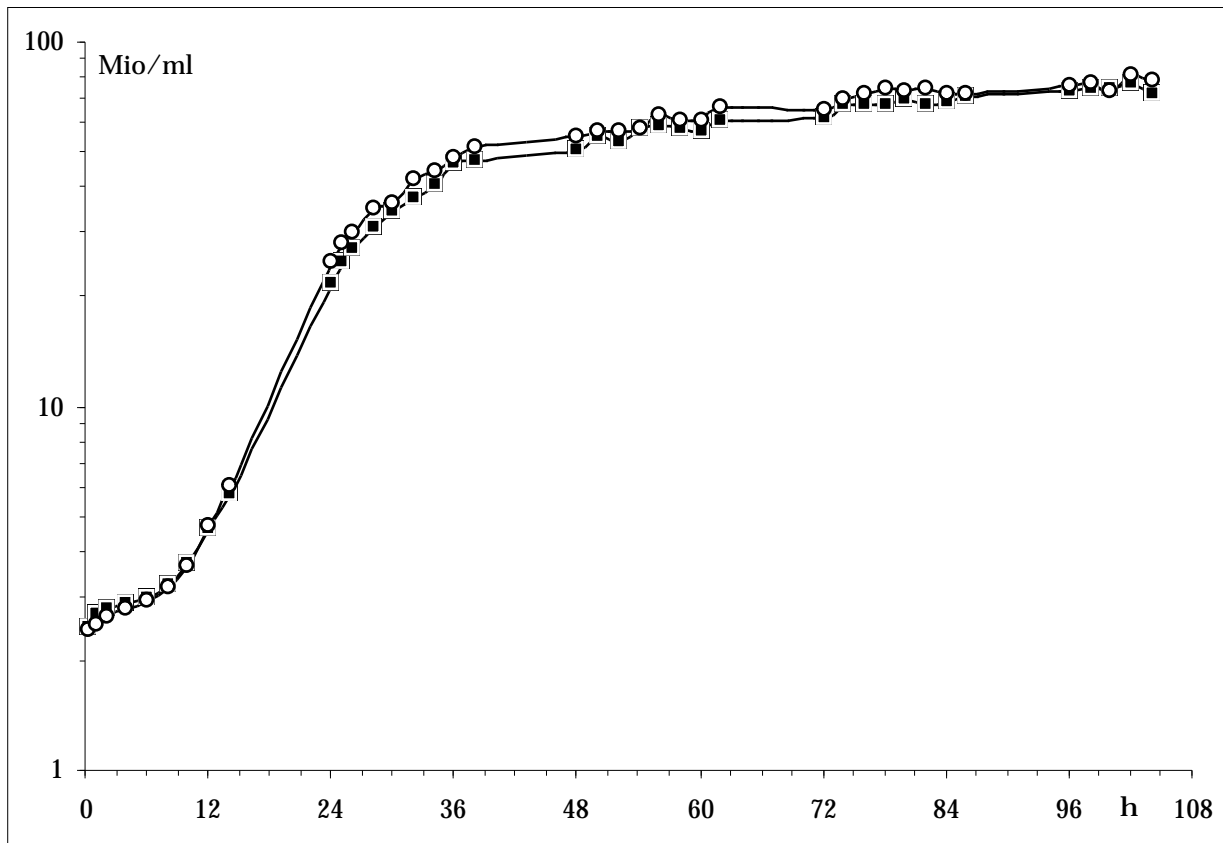


Abbildung 4: Wachstumskurve der Hefeisolate VBH9810 (■) und VBH9812 (O). Die Hefe VBH9812 wächst geringfügig schneller und höher als das Isolat VBH9810.

#### 4.1.1.2. Lebendzellanteil

Die Betrachtung des Lebendzellanteils, wie er mit dem Zell-Analyser ermittelt wurde, ergab nach Beginn der Inkubation einen Anstieg von etwa 67% bis auf 88% nach 24 Stunden bei beiden Stämmen. Nach diesem Maximum sank der Anteil vitaler Zellen wieder auf etwa 74% ab (siehe Abbildung 5).

In Mehrfachversuchen variierte der Lebendzellanteil allerdings in einem Bereich zwischen 88% und 96%, er war damit ebenso hoch wie der der Referenzstämmen (Daten nicht gezeigt). Bei der Hefe VBH9810 lag der Anteil zumeist etwas höher als bei VBH9812.

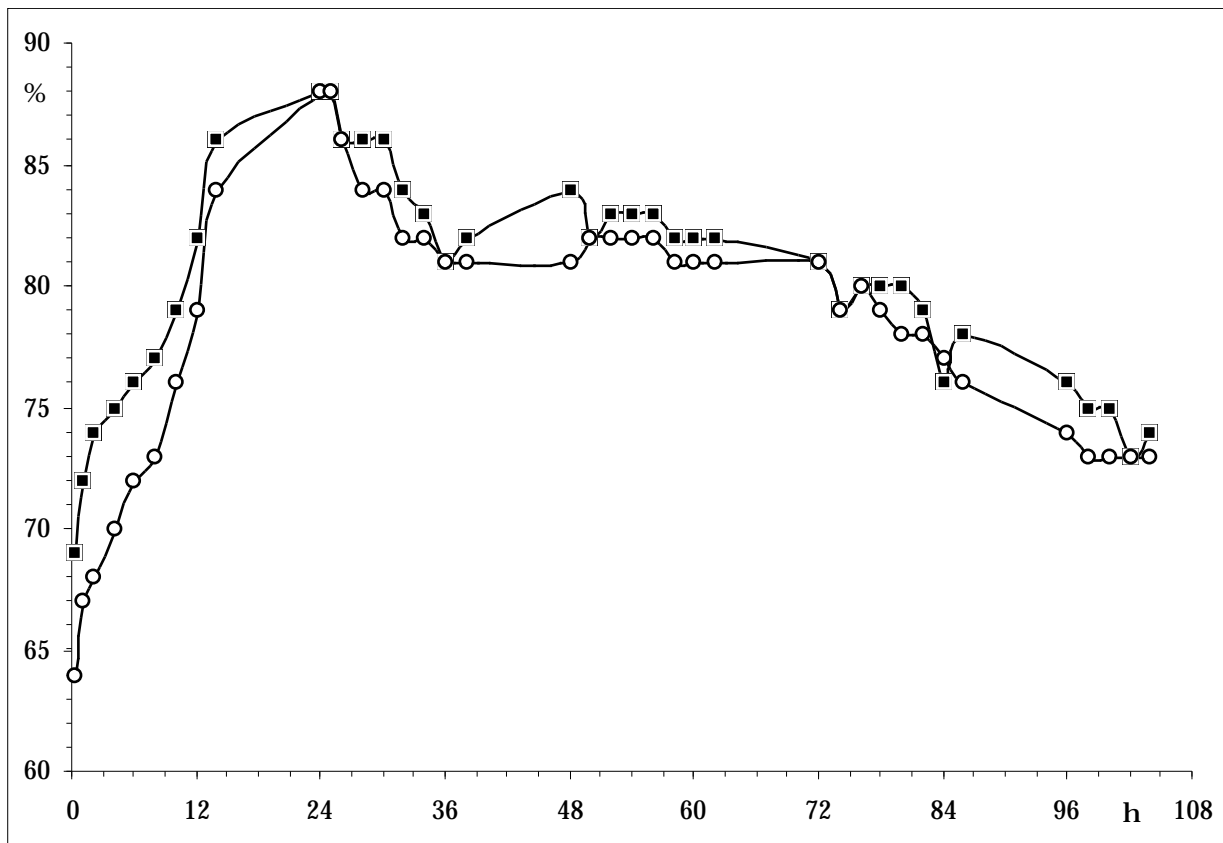


Abbildung 5: Entwicklung des Lebendzellanteils bei den Isolaten VBH9810 (■) und VBH9812 (○). Nach der Zunahme während der Wachstumsphase ist in der stationären Phase eine stetige Abnahme der vitalen Zellen zu erkennen.

#### 4.1.1.3. Mittleres Zellvolumen

Die Bestimmung des mittleren Zellvolumens, die der verwendete Counter ermöglichte, zeigte eine sehr starke Zunahme zu Beginn des Versuches von ca. 154 fl bis auf 210 fl (VBH9810) bzw. 218 fl (VBH9812) innerhalb von 14 Stunden. Danach sank das mittlere Volumen der Zellen fast ebenso schnell wieder ab und erreichte nach weiteren 18 Stunden einen weitgehend stabilen Wert von ca. 136 fl, wobei die untersuchten Stämme sich kaum unterschieden (s. Abbildung 6). Über mehrere Gärversuche blieb der Verlauf erhalten, es traten jedoch erhebliche Abweichungen auf, so daß auch ein Vergleich zu den Referenzen nur schwer möglich ist (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.1.4. Größenverteilung der Hefezellen

Die Größenverteilungskurve entwickelte sich im Verlauf des Wachstums in charakteristischer Weise (siehe Abbildung 7). Zu Beginn der Entwicklung unterschieden sich die untersuchten Stämme dabei nur unwesentlich.

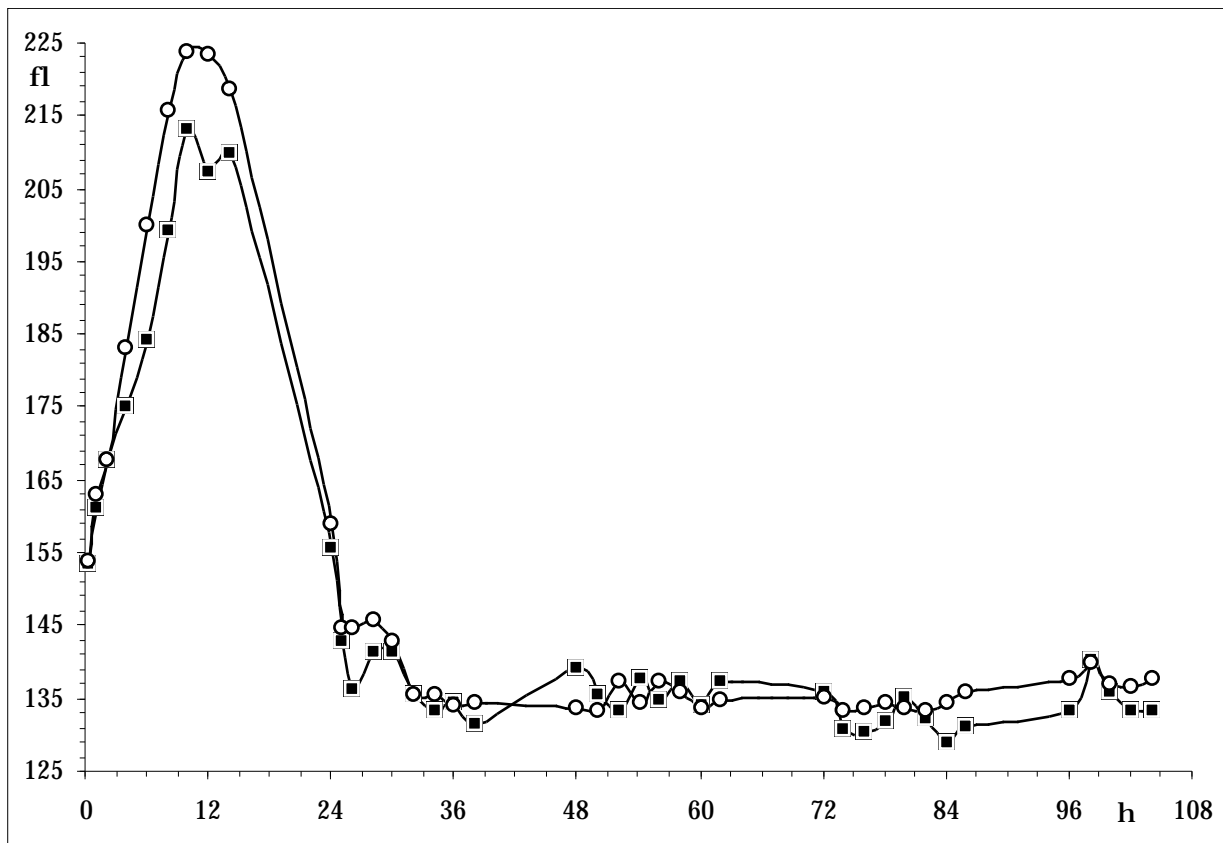


Abbildung 6: Entwicklung des mittleren Zellvolumens bei den Isolaten VBH9810 (■) und VBH9812 (○). Die mittlere Größe der Zellen nimmt bis etwa zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase stark zu und fällt dann auf einen stabilen Wert ab.

Die frisch angeimpften Zellen hatten eine Größe von 4,2 bis 6,5  $\mu\text{m}$ , die meisten waren 5  $\mu\text{m}$  groß. Nach 10 Stunden lag der Größenbereich der Zellen zwischen 4,5 und 7,5  $\mu\text{m}$  mit einem Maximum bei etwa 5,7  $\mu\text{m}$ . Die typische Gauß'sche Verteilungskurve war in den Bereich der größeren Zellen verschoben. Weitere 22 Stunden später zeigten beide Stämme eine sehr gleichmäßige Verteilungskurve mit Zellgrößen von 4 bis 7  $\mu\text{m}$  und am häufigsten eine Größe von 5  $\mu\text{m}$ . Das Isolat VBH9812 hatte das Häufigkeitsmaximum bei 5,2  $\mu\text{m}$ .

Nach 58 Stunden konnte man eine Verschiebung der Größenverteilung beobachten. Die Zellen waren 4 bis 7,5  $\mu\text{m}$  groß, das Maximum lag bei 5,2 (VBH9810) bzw. 5,5  $\mu\text{m}$  (VBH9812). Insbesondere bei dem Isolat VBH9812 zeichnete sich eine Aufteilung des Maximums ab, die sich nach weiteren 24 Stunden bei beiden Stämmen deutlich erkennen ließ. Der Stamm VBH9810 hatte die Maxima bei 4,9 und 5,4  $\mu\text{m}$ , VBH9812 bei 4,8 und 5,5  $\mu\text{m}$ . Während bei VBH9810 das Maximum bei 5,4  $\mu\text{m}$  nach einem weiteren Tag zurückging, blieb die Zweigipfeligkeit der Größenverteilungskurve bei dem Isolat VBH9812 erhalten.



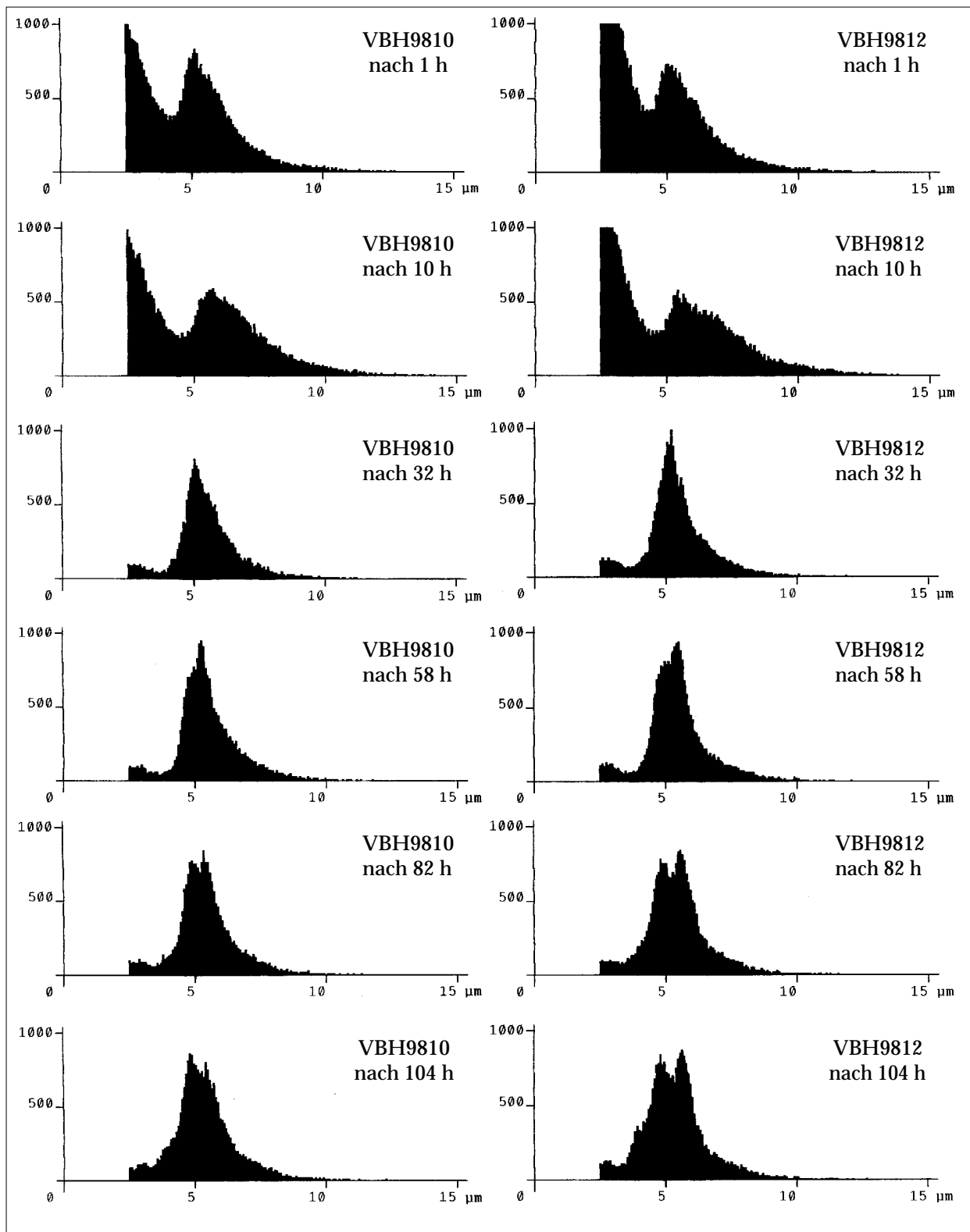


Abbildung 7: Entwicklung der Größenverteilungskurve bei den Hefeisolaten VBH9810 (linke Spalte) und VBH9812 (rechte Spalte) nach 1, 10, 32, 58, 82 und 102 Stunden (v.o.n.u.).

Der Stamm VBH9812 zeigte unter den gewählten Bedingungen nach einer Gärdauer von etwa drei Tagen eine deutlich sichtbare Flockenbildung, was bei dem Isolat

VBH9810 nicht auftrat. Diese Flocken konnten auch unter dem Mikroskop dargestellt werden (Abbildung 8).

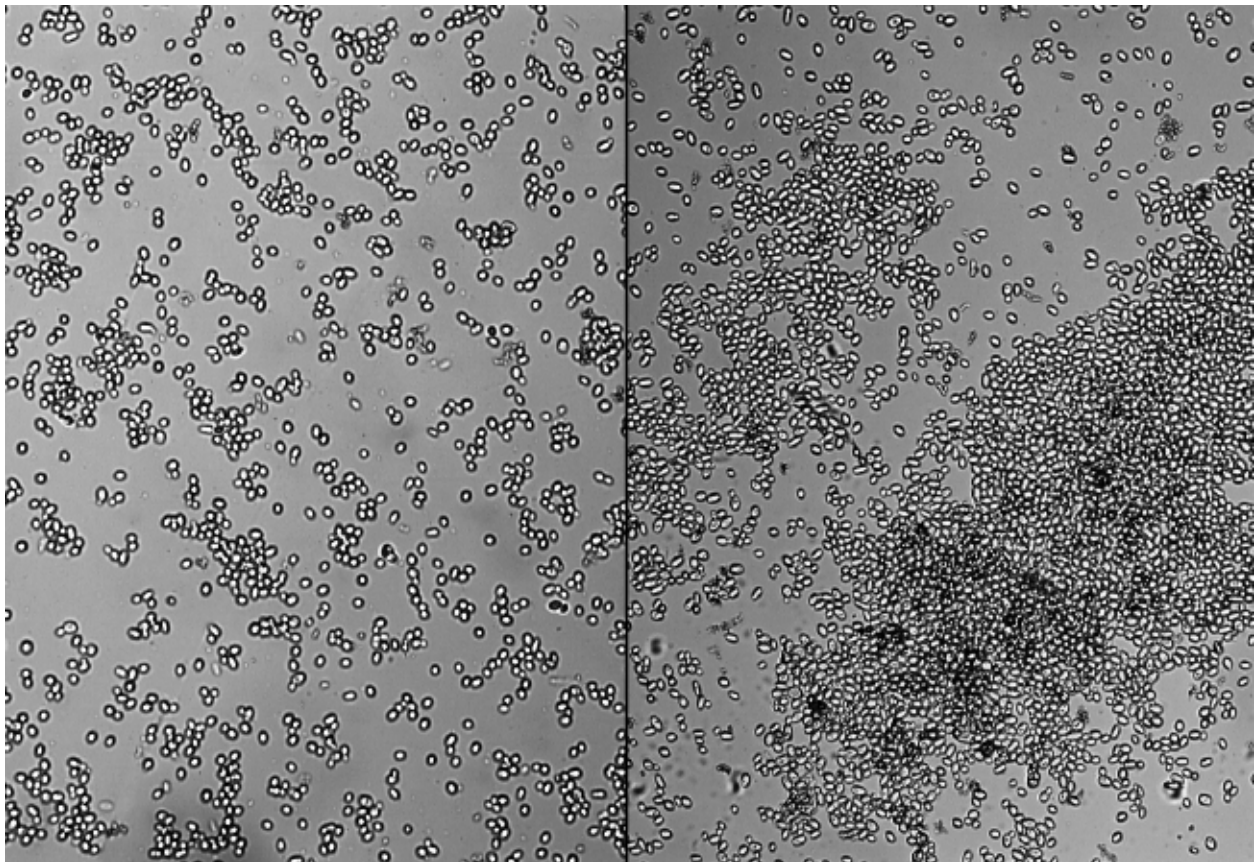


Abbildung 8: Vergleich zwischen den Zellen von Stamm VBH9810 (links) und VBH9812 (rechts) im mikroskopischen Bild während der Stationärphase. Der Stamm VBH9812 aggregiert zu makroskopisch sichtbaren Flocken.

#### 4.1.2. Bildung von Gärungsnebenprodukten bei VBH9810 und VBH9812 sowie den Referenzstämmen W34/70 und W66

Eine mögliche Methode zur physiologischen Charakterisierung von Hefestämmen ist die Analyse der im Gärungsverlauf gebildeten Nebenprodukte, wie höhere Alkohole, Ester und vicinale Diketone. Die beiden Isolate VBH9810 und VBH9812 wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften in bezug auf 14 Gärungsnebenprodukte aus vier Substanzgruppen untersucht (siehe Tabelle 12), um eventuell Unterschiede zwischen den beiden Isolaten zu finden. Um die Ergebnisse in Relation zu anderen, bekannten Produktionsstämmen setzen zu können und einen “Maßstab” zu haben, wurden die Stämme W34/70 und W66 der Hefebank Weihenstephan in einem weiteren Gärversuch ebenfalls analysiert.

Gruppe	Substanz	Formel
Alkohole	1-Propanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$
	2-Methyl-1-propanol	$\text{CH}_3\text{-CHCH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$
	2-Methyl-1-butanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CHCH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$
	3-Methyl-1-butanol	$\text{CH}_3\text{-CHCH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$
Ester	Ethylacetat	$\text{CH}_3\text{-CO-O-CH}_2\text{-CH}_3$
	Ethylpropionat	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CO-O-CH}_2\text{-CH}_3$
	Ethylbutyrat	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-O-CH}_2\text{-CH}_3$
	Ethylhexanoat	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CO-O-CH}_2\text{-CH}_3$
	Isoamylacetat	$\text{CH}_3\text{-CO-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHCH}_3\text{-CH}_3$
	Isobutylacetat	$\text{CH}_3\text{-CO-O-CH}_2\text{-CHCH}_3\text{-CH}_3$
vicinale Diketone	2,3-Butandion	$\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$
	2,3-Pentandion	$\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_2\text{-CH}_3$
Sonstige	Acetaldehyd	$\text{CH}_3\text{-CHO}$

Tabelle 12: Zusammenstellung der untersuchten Gärungsnebenprodukte

Im Verlauf einer Gärung unter den gewählten Standardbedingungen zeigten die beiden untersuchten Isolate in bezug auf einige der Nebenprodukte, z.B. 1-Propanol, Ethylhexanoat und 2,3-Pentandion, eindeutige Differenzen. Bei anderen Substanzen waren entweder kaum Unterschiede erkennbar, z.B. beim 2-Methyl-1-propanol und 3-Methyl-1-butanol, oder sie waren bei den drei durchgeführten Vergleichsgärungen so variabel, daß keine eindeutige Aussage möglich war, wie im Fall von 2-Methyl-1-butanol.

Bei einigen der Gärungsnebenprodukte zeigten sich sehr große Differenzen zu den beiden Kontrollstämmen, insbesondere beim 2-Methyl-1-propanol, Ethylacetat, Isoamylacetat und den vicinalen Diketonen. Im einzelnen zeigte sich dabei das im folgenden beschriebene Bild.

## 4.1.2.1. 1-Propanol

1-Propanol war zu Beginn der Gärung bei beiden Isolaten in gleicher Menge vorhanden (etwa 3,4 mg/l) und der Gehalt stieg im Verlauf der Gärung über 100 Stunden relativ gleichmäßig an. Das Isolat VBH9810 erreichte dabei mit ca. 50 mg/l wesentlich höhere Werte als VBH9812 mit etwa 30 mg/l, während die Kontrollen nur eine Endkonzentration von 20 bis 23 mg/l aufwiesen (siehe Abbildung 9).

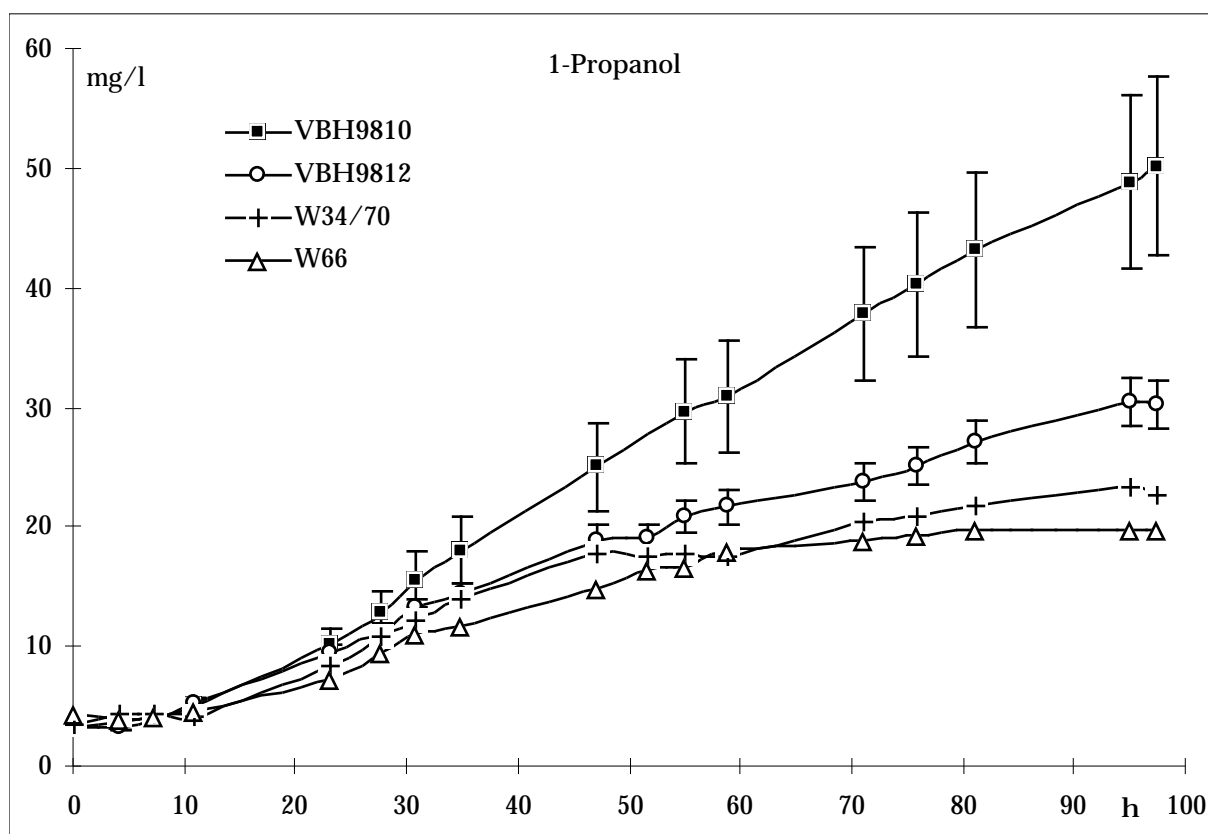


Abbildung 9: Die Entwicklung der 1-Propanol-Konzentration in Batch-Kulturen von Isolat VBH9810 (■) und VBH9812 (○) zeigte deutliche Unterschiede untereinander und zu W34/70 (+) bzw. W66 (Δ).

## 4.1.2.2. 2-Methyl-1-propanol

Beim 2-Methyl-1-propanol oder Isobutanol entwickelten sich beide Isolate sehr ähnlich, die Konzentration dieser Substanz stieg im Gärungsverlauf sehr gleichmäßig von 1,2 mg/l bis auf rund 20 mg/l an, wobei 10 Stunden nach dem Anstellen eine deutliche Beschleunigung des Konzentrationsanstieges zu erkennen war. Die beiden Stämme W34/70 und W66 bildeten während eines insgesamt langsameren Anstieges nur etwa die Hälfte dieser Menge und erreichten so am Versuchsende eine Konzentration von etwa 10 mg/l (siehe Abbildung 10).

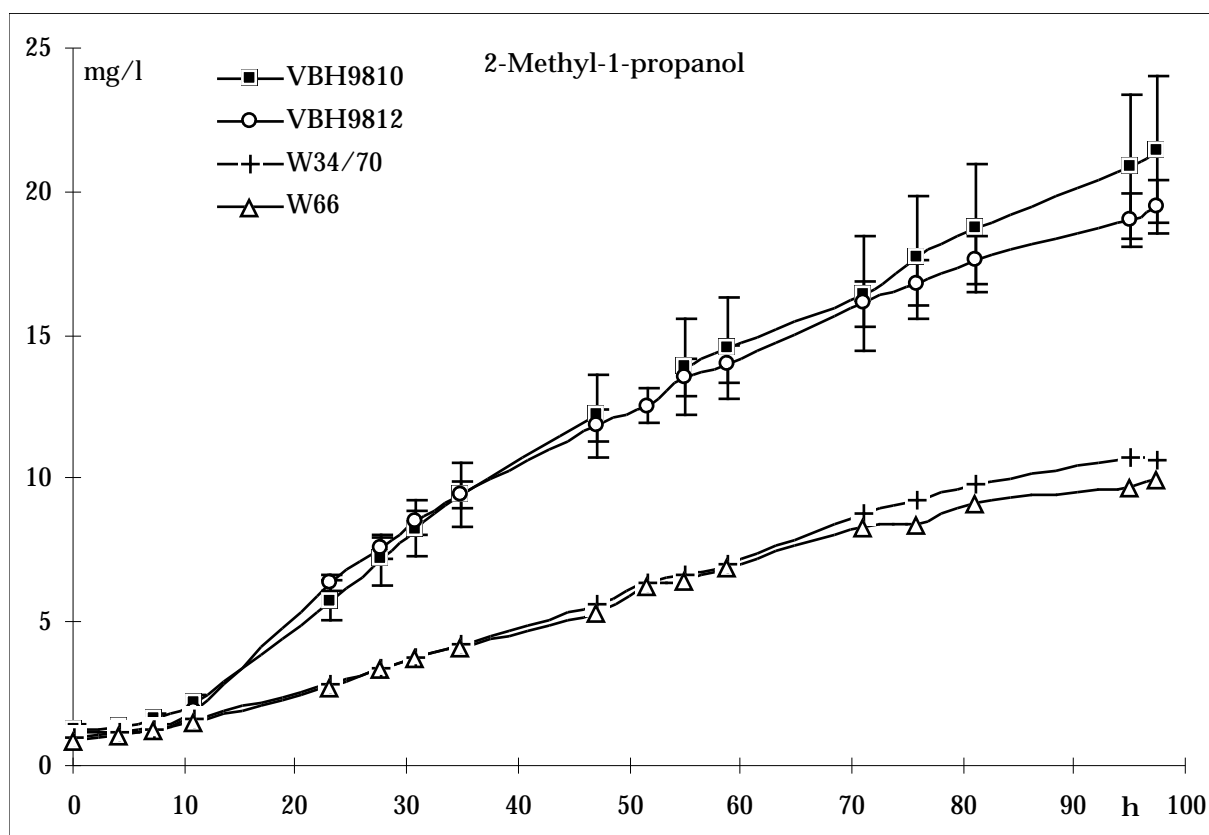


Abbildung 10: Der Konzentrationsanstieg des 2-Methyl-1-propanols verlief in den Gärungen beider Isolate (■ = VBH9810, O = VBH9812) sehr gleichmäßig und auf dem selben Niveau. Die Stämme W34/70 (+) und W66 (Δ) erreichten weit geringere Konzentrationen.

#### 4.1.2.3. 2-Methyl-1-butanol

Das 2-Methyl-1-butanol war ebenfalls eine der Substanzen, die einen über den Verlauf der Gärung gleichmäßigen Anstieg in der Konzentration aufwiesen. Von einer Anfangskonzentration von 0,08 mg/l stieg der Wert bis auf 6,9 mg/l bei VBH9810 bzw. 8,5 mg/l bei VBH9812 an. Auch hier war eine deutliche Beschleunigung der Zunahme nach 10 Stunden zu erkennen (siehe Abbildung 11). Allerdings variierten die Werte bei den drei Ansätzen sehr stark, so daß man die beiden Isolate hiermit nicht eindeutig charakterisieren kann. Die Entwicklung bei den Kontrollhefen verlief im wesentlichen auf gleiche Art, die Konzentrationen waren hier nur unwesentlich höher.

#### 4.1.2.4. 3-Methyl-1-butanol

In der Produktion von 3-Methyl-1-butanol unterschieden sich die Isolate praktisch nicht. Die Anfangskonzentration lag bei ca. 3,5 mg/l und stieg auf etwa 53 mg/l an. Charakteristisch war auch hier ein starker Konzentrationsanstieg in der exponentiellen Wachstumsphase (siehe Abbildung 12).

Die Schwankungsbreite innerhalb der Vergleichsgärungen war bei dieser Substanz sehr gering. Im Vergleich zu den Hefen W44/70 und W66 waren keine wesentlichen Unterschiede erkennbar.

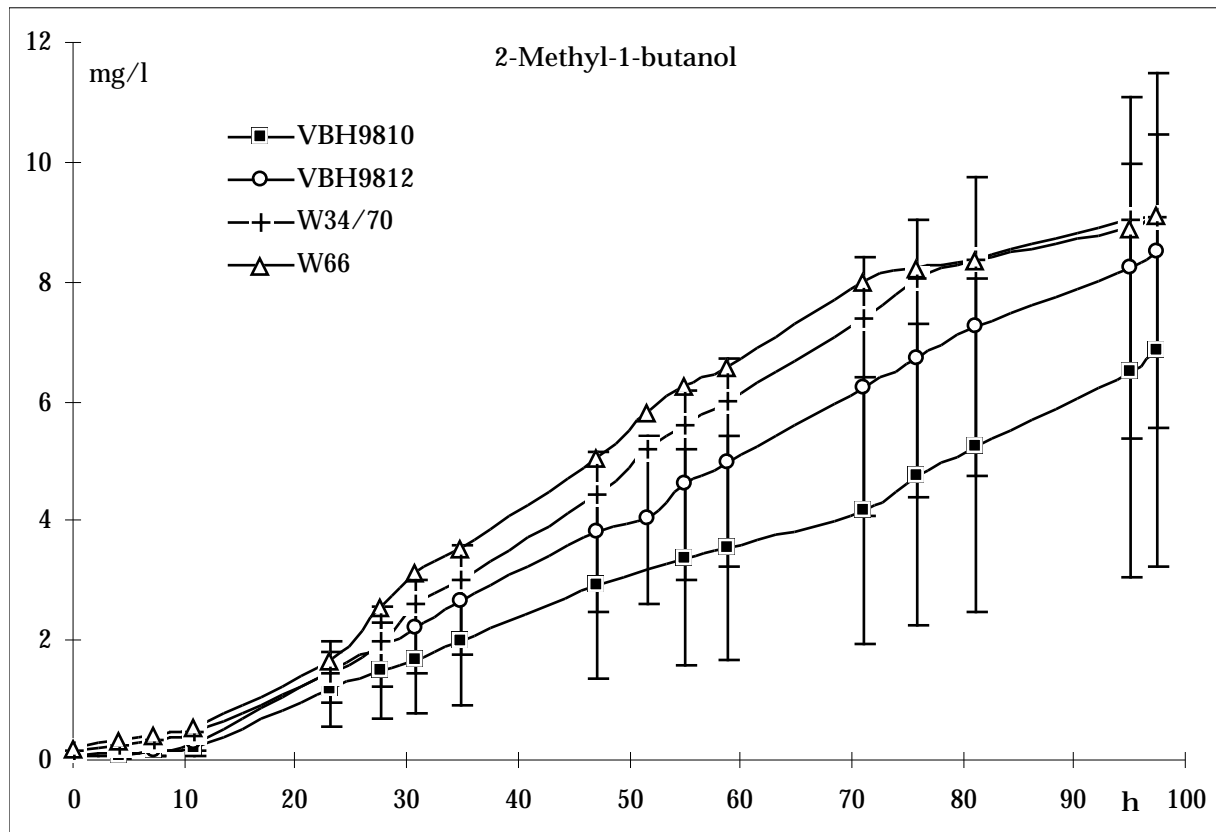


Abbildung 11: Beim kontinuierlichen Anstieg der 2-Methyl-1-butanol-Konzentration zeigten sich größere Schwankungen in Vergleichsgärungen von VBH9810 (■) und VBH9812 (○). Die Kontrollen W34/70 (+) und W66 (Δ) verhielten sich in Bezug auf die Konzentrationen ähnlich.

#### 4.1.2.5. Ethylacetat

Im Gegensatz zu den höheren Alkoholen wurden die Ester in sehr viel geringeren Konzentrationen gebildet und wiesen daher insgesamt auch eine wesentlich höhere Schwankungsbreite auf. Der vorherrschende Ester bei den Betriebshefeisolaten war das Ethylacetat, was nach etwa 30 Stunden gebildet wurde und Konzentrationen von 4 mg/l bei VBH9810 bis zu 7 mg/l bei VBH9812 erreichte (siehe Abbildung 13).

Bei dieser Substanz wichen beide Weihenstephaner Vergleichshefen sehr stark von den Isolaten ab und bildeten wesentlich mehr von dieser Substanz, so daß am Ende der Gärung Konzentrationen von etwa 19 mg/l erreicht wurden.

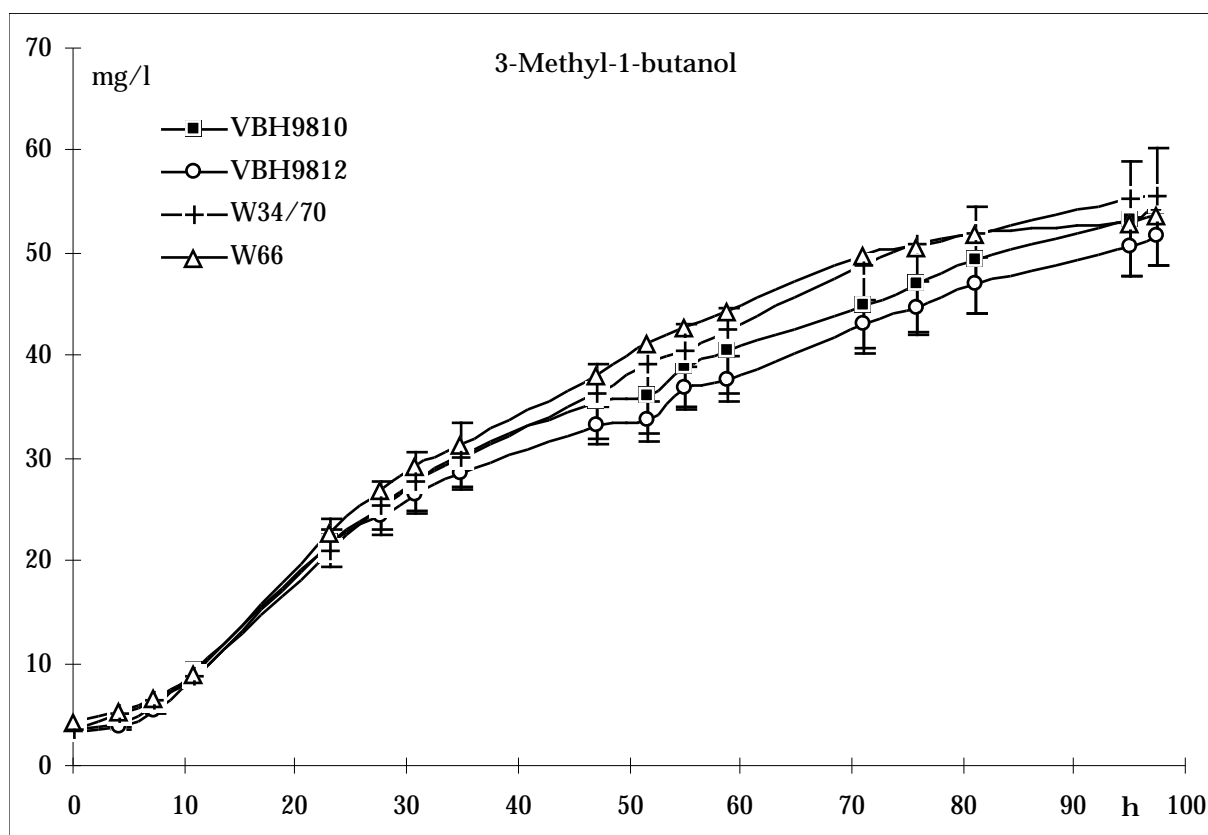


Abbildung 12: In der Produktion von 3-Methyl-1-butanol unterschieden sich die Isolate VBH9810 (■) und VBH9812 (○) sowie die Kontrollen W34/70 (+) und W66 (Δ) kaum voneinander.

#### 4.1.2.6. Ethylpropionat

In der Bildung des zweiten untersuchten Esters, dem Ethylpropionat, zeigten sich in den Gärungen der beiden Isolate sehr deutliche Unterschiede. Während bei beiden Stämmen die Bildung nach etwa einem Tag einsetzte, stieg sie bei VBH9810 sehr schnell bis auf Werte um 0,25 mg/l an.

Bei VBH9812 lag diese Zunahme zunächst nur im Bereich von 0,06 mg/l, um nach weiteren 30 Stunden nochmals anzusteigen und schließlich das Niveau des anderen Stammes zu erreichen (siehe Abbildung 14).

Im Vergleich dazu setzte die Bildung bei den Vergleichsstämmen früher ein, stagnierte dann für ca. 30 Stunden bei 0,11 mg/l und stieg danach bei W34/70 bis auf 0,19 mg/l an.

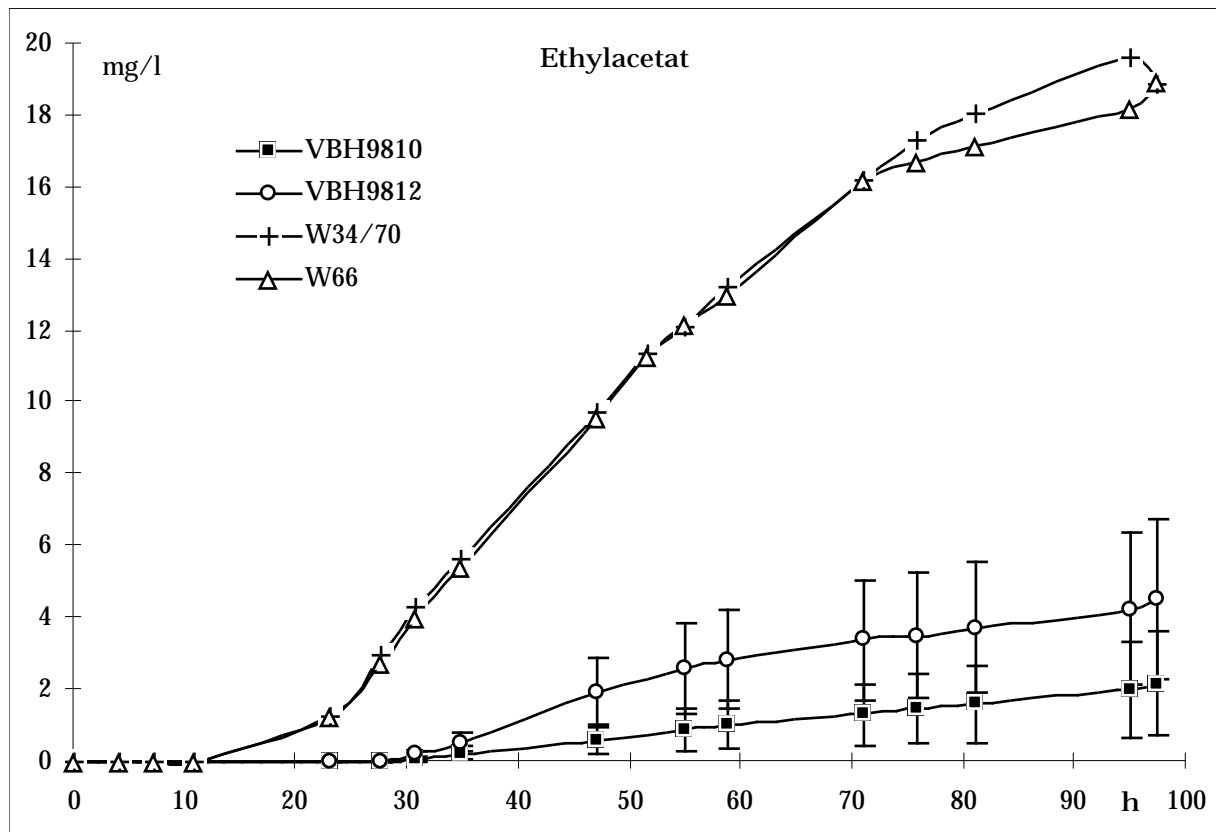


Abbildung 13: Die Produktion von Ethylacetat setzte nach 20 bis 30 Stunden ein und erreichte sehr unterschiedliche Endkonzentrationen bei VBH9810 (■) und VBH9812 (○) bzw. W34/70 (+) und W66 (Δ).

#### 4.1.2.7. Ethylbutyrat

Ethylbutyrat wurde von beiden Betriebshefe-Isolaten nur am Ende der Gärung, etwa 60 bis 80 Stunden nach dem Anstellen, in sehr geringen und stark variierenden Mengen gebildet.

Maximal wurden Werte von etwa 0,03 mg/l gemessen. Im Gegensatz dazu war bei den Stämmen aus der Hefebank Weihenstephan schon etwa zehn Stunden früher eine Konzentration von 0,025 mg/l nachweisbar.

Diese stieg bis zum Versuchsende deutlich an und erreichte Werte von 0,056 mg/l bei W34/70 bzw. 0,07 mg/l bei W66 (siehe Abbildung 15).



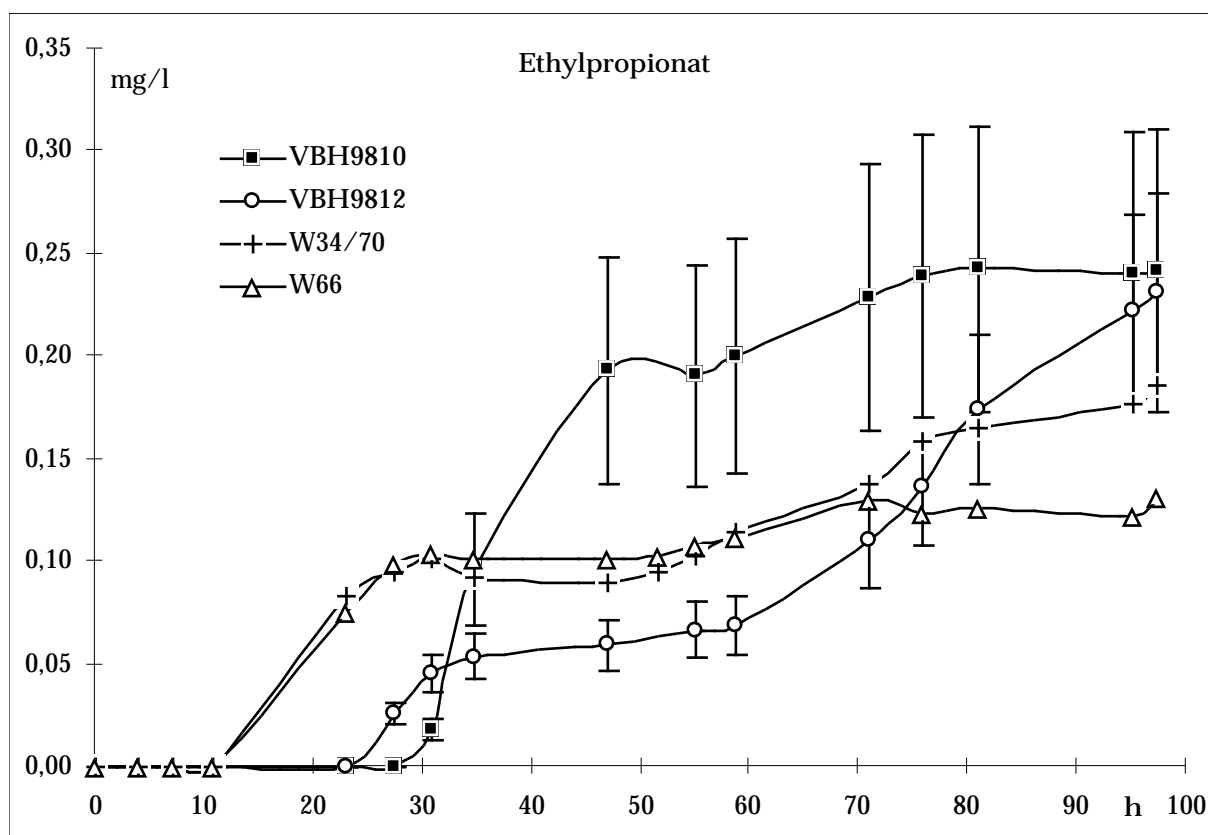


Abbildung 14: In der Bildung von Ethylpropionat sind sehr deutliche Unterschiede zwischen den Isolat-ten VBH9810 (■) und VBH9812 (○) erkennbar. Die Vergleichsstämme W34/70 (+) und W66 (Δ) weichen in ihrer Entwicklung deutlich von den Eigenisolaten ab.

#### 4.1.2.8. Ethylhexanoat

Das Ethylhexanoat ließ sich nach etwa einem Tag Gärdauer nachweisen und die Konzentrationen unterschieden sich deutlich zwischen allen vier Stämmen. Während VBH9812 diese Substanz stärker bildete und finale Konzentrationen von 0,07 mg/l erreichte, produzierte VBH9810 im Mittel nur 0,03 mg/l als Endkonzentration, die VBH9812 schon nach etwa zwei Tagen gebildet hatte. Gegen Ende der Gärung überschritten sich die Konzentrationsbereiche mehr (siehe Abbildung 16).

Bei den Stämmen W34/70 und W66 war die Substanz schon zehn Stunden früher nachweisbar und stieg im weiteren Verlauf wesentlich stärker an. W34/70 erreichte nach ca. 50 Stunden Gärung schon die Konzentration von 0,07 mg/l, die sich bis zum Schluß nicht mehr wesentlich veränderte. Der Stamm W66 erreichte nach 76 Stunden eine Konzentration von 0,13 mg/l, die anschließend aber wieder bis auf etwas über 0,1 mg/l abfiel (siehe Abbildung 16).

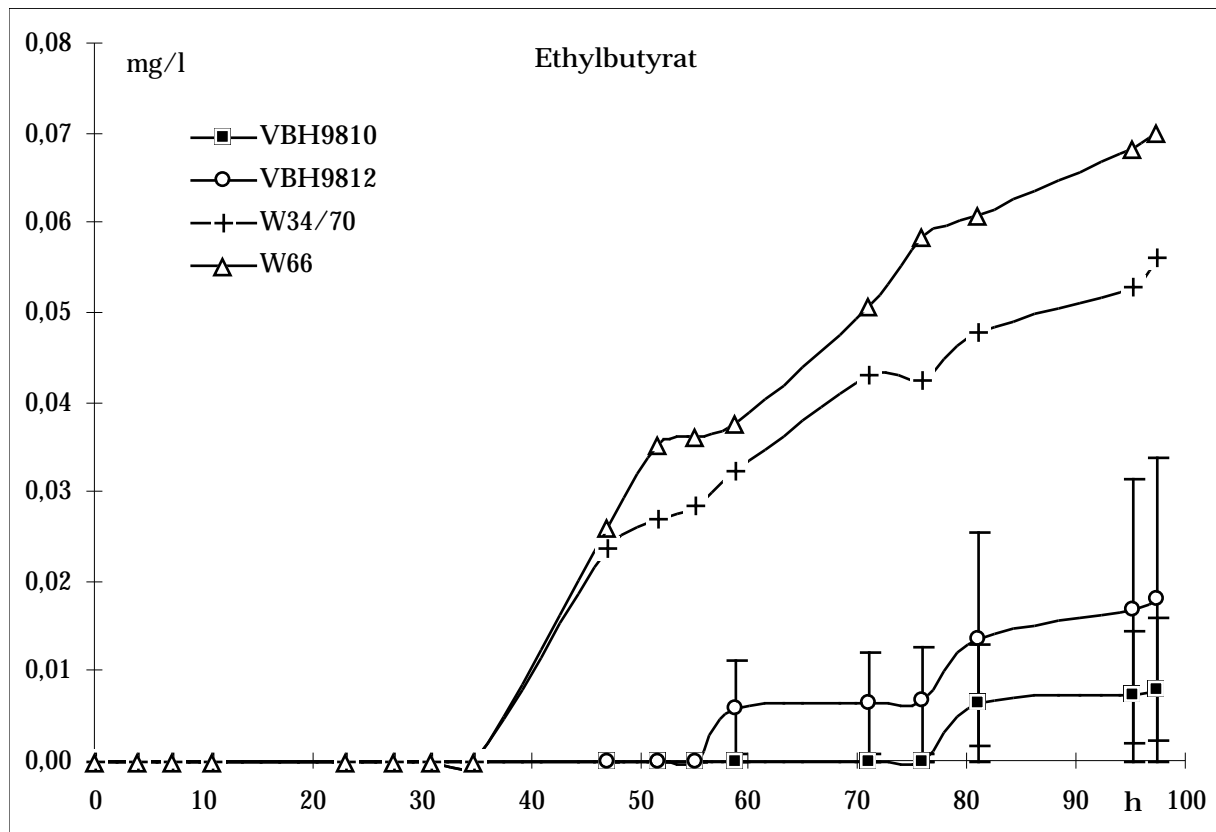


Abbildung 15: Bei der Bildung von Ethylbutyrat wurden große Unterschiede zwischen den Eigenisolaten VBH9810 (■) und VBH 9812 (○) sowie den Stämmen W34/70 (+) und W66 (Δ) gemessen.

#### 4.1.2.9. Isoamylacetat

Isoamylacetat entstand in meßbaren Mengen erst nach etwa 35 Stunden und erreichte Werte von etwa 0,2 mg/l, die aber sehr stark variierten. Insgesamt lagen die Werte bei VBH9812 etwas höher, die Konzentrationsbereiche überschneiden sich aber weitgehend (siehe Abbildung 17).

Ähnlich wie schon beim Ethylbutyrat war bei beiden Vergleichsstämmen eine deutlich stärkere Bildung dieses Stoffen zu beobachten, wobei Endkonzentrationen zwischen 0,9 und 1,0 mg/l erreicht wurden (siehe Abbildung 17).

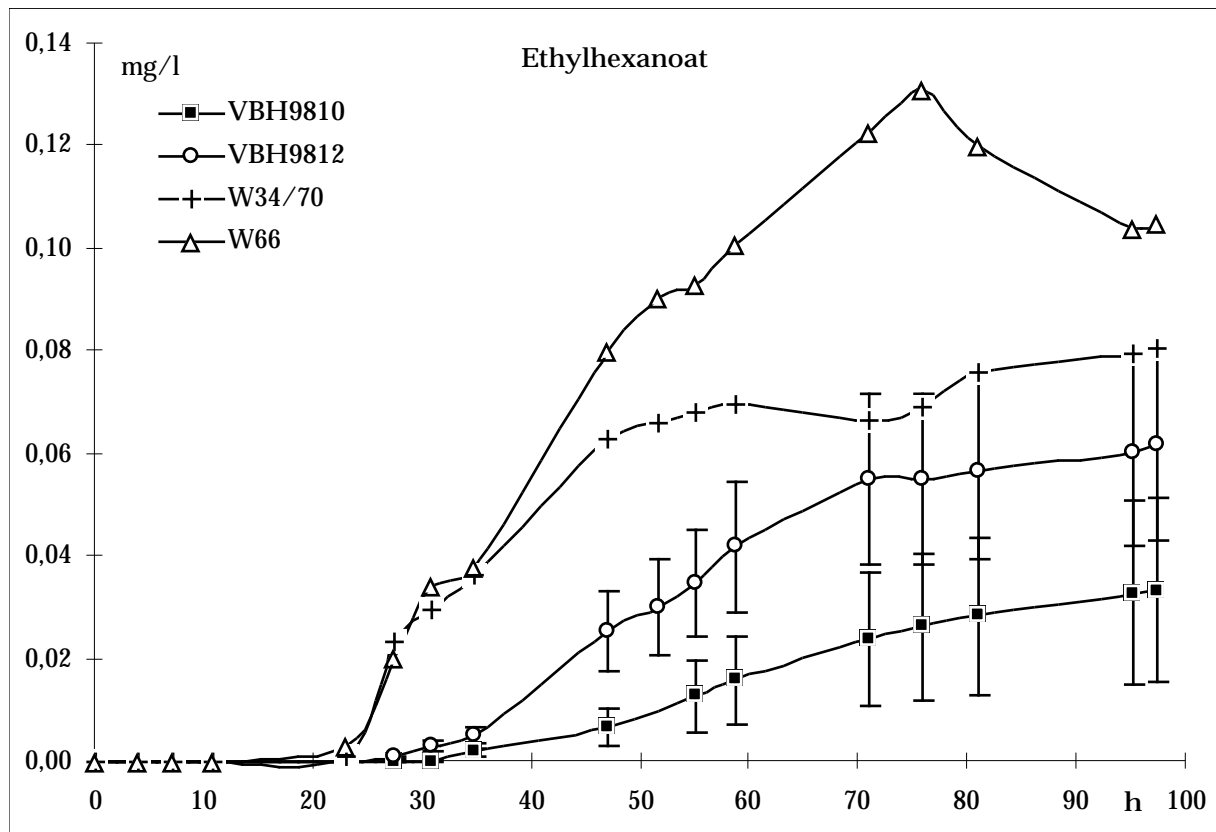


Abbildung 16: Die Entwicklung der Ethylhexanoat-Konzentration zeigte die größten Unterschiede in der frühen stationären Phase von VBH9810 (■) und VBH9812 (○). Bei W34/70 (+) und W66 (△) setzten sich diese Unterschiede bis zum Ende der Gärung fort.

#### 4.1.2.10. Isobutylacetat

Isobutylacetat war dagegen teilweise schon zu Beginn der Gärung mit ca. 0,025 mg/l nachweisbar und zeigte eine sehr uneinheitliche Entwicklung im Verlauf der Gärung. Die Werte des Isolats VBH9812 lagen insgesamt etwas höher und die der Vergleichsstämme nochmals über denen der Eigenisolate, aber die Variationen waren sehr groß, so daß sich keine sinnvollen Aussagen machen lassen. (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2.11. 2,3-Butandion

Bei den vicinalen Diketonen ließen sich sehr deutliche Unterschiede zwischen den beiden Isolaten und in noch höherem Maße im Vergleich zu den Referenzstämmen ablesen. Das 2,3-Butandion oder Diacetyl stieg in der exponentiellen Wachstumsphase von ca. 0,15 mg/l bis auf Werte von fast 13 mg/l bei Isolat VBH9810 an. Im weiteren Verlauf der Gärung sanken diese Werte wieder bis unter 10 mg/l ab.

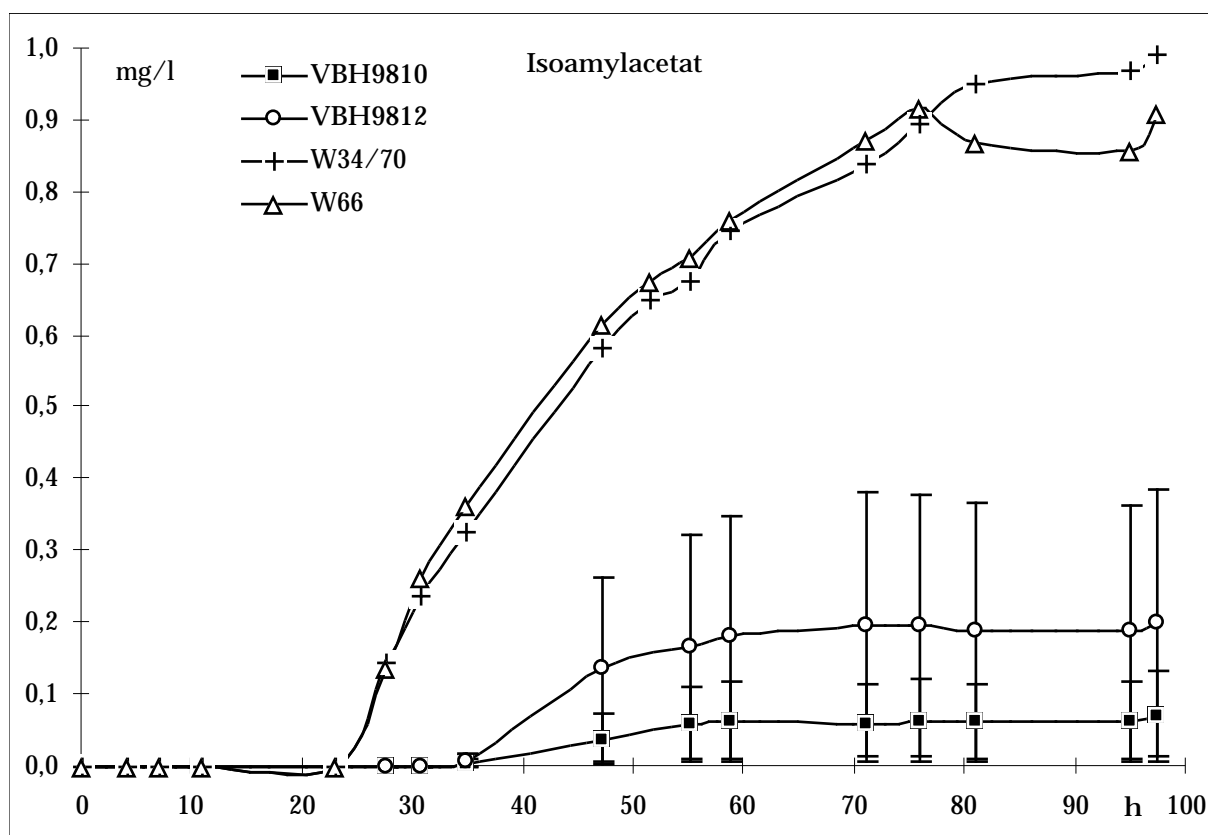


Abbildung 17: Auch die Entwicklung von Isoamylacetat ist durch große Unterschiede zwischen den Eigenisolaten (■ = VBH9810, ○ = VBH9812) und den Vergleichsstämmen (+ = W34/70, △ = W66) gekennzeichnet.

Dabei wies das Isolat VBH9810 stets deutlich höhere Konzentrationen auf und baute die Substanz auch langsamer wieder ab. Im Gegensatz dazu entstanden bei den Stämmen W34/70 und W66 maximal nur 0,44 mg/l dieser Substanz (siehe Abbildung 18).

#### 4.1.2.12. 2,3-Pentandion

Beim 2,3-Pentandion war die Entwicklung ähnlich, allerdings wurde es zum Ende der Gärung praktisch vollständig wieder abgebaut und die Unterschiede zwischen den beiden Isolaten traten hier noch deutlicher zu Tage. VBH9810 produzierte sehr viel mehr dieser Substanz und erreichte nach 30 Stunden eine Konzentration von etwa 7 mg/l, während VBH9812 nicht höher als 3 mg/l kam.

Allerdings verringerten sich die Unterschiede zum Ende der Gärung, so daß zu diesem Zeitpunkt beide Isolate wieder im gleichen Konzentrationsbereich von etwa 0,5 mg/l lagen. Die Referenzstämmen lagen mit höchstens 0,57 mg/l bei W34/70 weit unter diesen Konzentrationen (siehe Abbildung 19).

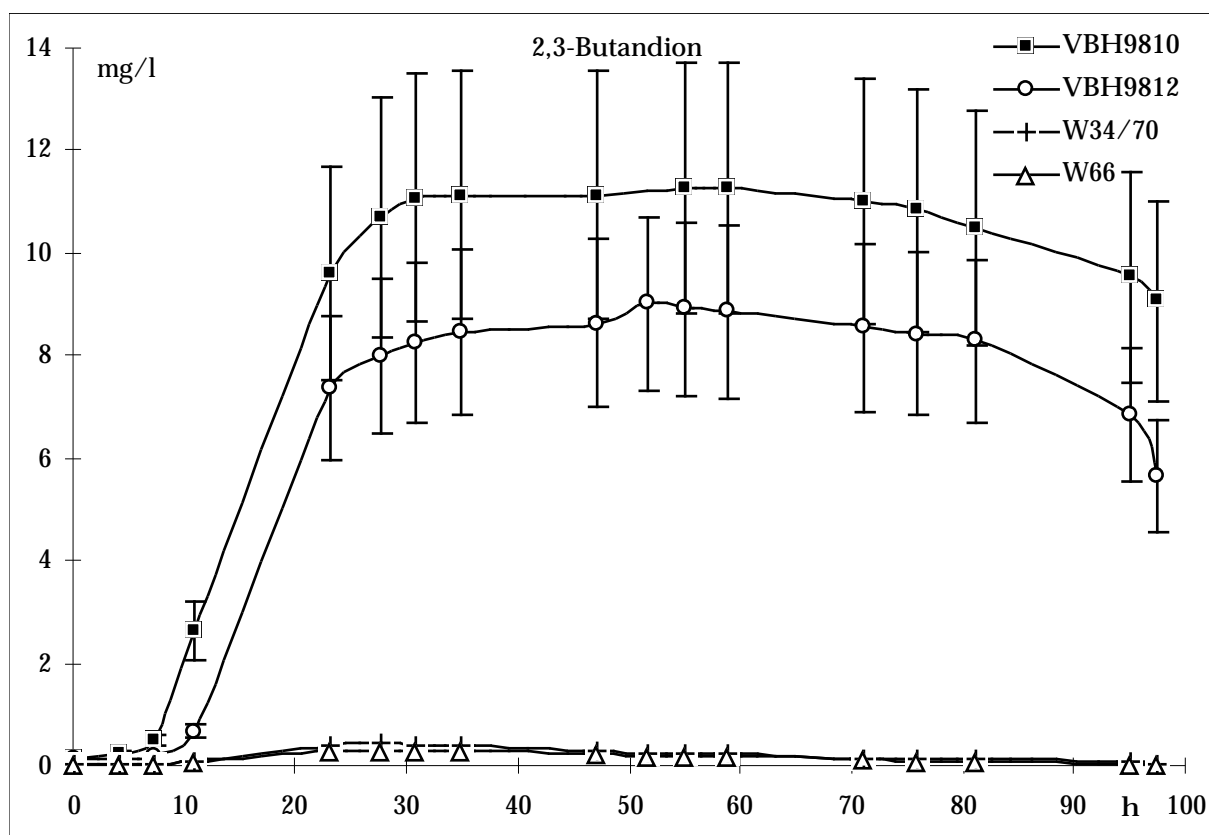


Abbildung 18: 2,3-Butandion wurde in der exponentiellen Wachstumsphase der Isolate VBH9810 (■) und VBH9812 (○) sehr stark gebildet und zum Ende der Gärung langsam wieder abgebaut. Die Konzentrationen bei den Referenzstämmen W34/70 (+) und W66 (Δ) blieben dagegen weit unter diesen Werten.

#### 4.1.2.13. Acetaldehyd

Als weitere Substanz wurde der Acetaldehyd analysiert, das schon zu Beginn der Gärung mit über 2 mg/l vorhanden war und innerhalb des ersten Tages bis auf etwa 10 mg/l anstieg.

Auf diesem Niveau blieb es bis kurz vor dem Ende der Gärung. Dann war ein leichter Rückgang der Konzentration zu erkennen. Die Isolate VBH9810 und VBH9812 zeigten dabei keine signifikanten Unterschiede und auch die Kontrollen entwickelten sich sehr ähnlich.

Nur beim Stamm W34/70 war zum Ende der Gärung ein starker Anstieg bis auf fast 26 mg/l zu verzeichnen (siehe Abbildung 20).

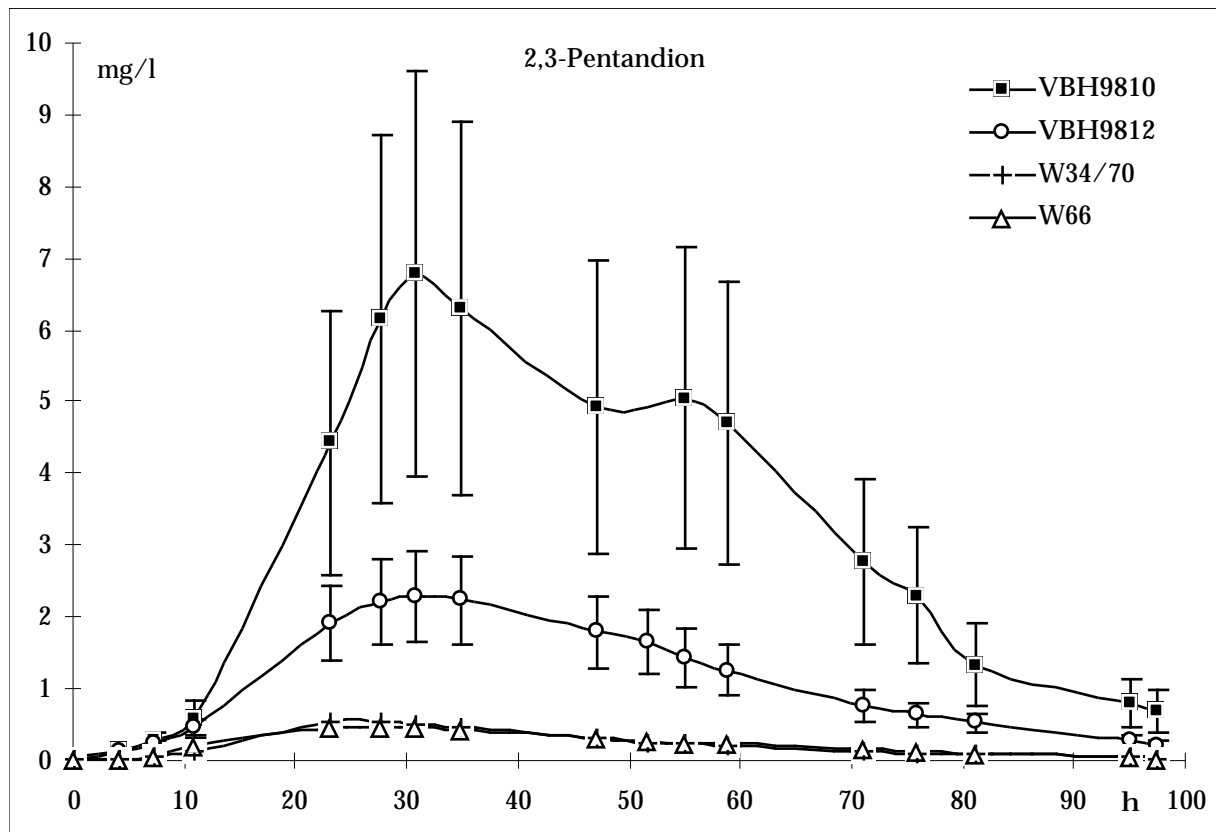


Abbildung 19: 2,3-Pentandion wird von beiden Isolaten in der exponentiellen Wachstumsphase gebildet und in der stationären Phase wieder abgebaut. Dabei erreicht VBH9810 (■) wesentlich höhere Konzentrationen als VBH9812 (○). W34/70 (+) und W66 (Δ) wiesen sehr viel geringere Konzentrationen auf.

#### 4.1.3. Entwicklung des pH-Wertes

Im Verlauf der Gärung kam es zu einer Absenkung des pH-Wertes, bei dem sich die beiden Isolate meßbar voneinander und auch von den Vergleichsstämmen unterscheiden.

So wies der Stamm VBH9810 mit einem Unterschied von 1,24 pH-Einheiten eine stärkere pH-Abnahme auf als der Stamm VBH9812 mit einem Unterschied von 1,15 Einheiten. Da der pH-Wert anfangs bei beiden Stämmen etwa identisch war, bedeutete dies eine pH-Absenkung auf 3,74 bei VBH9810 und auf 3,9 bei VBH9812. Die Stämme W34/70 und W66 zeigten eine deutlich geringere Absenkung des pH-Wertes auf 4,1 bis 4,2 (siehe Abbildung 21).

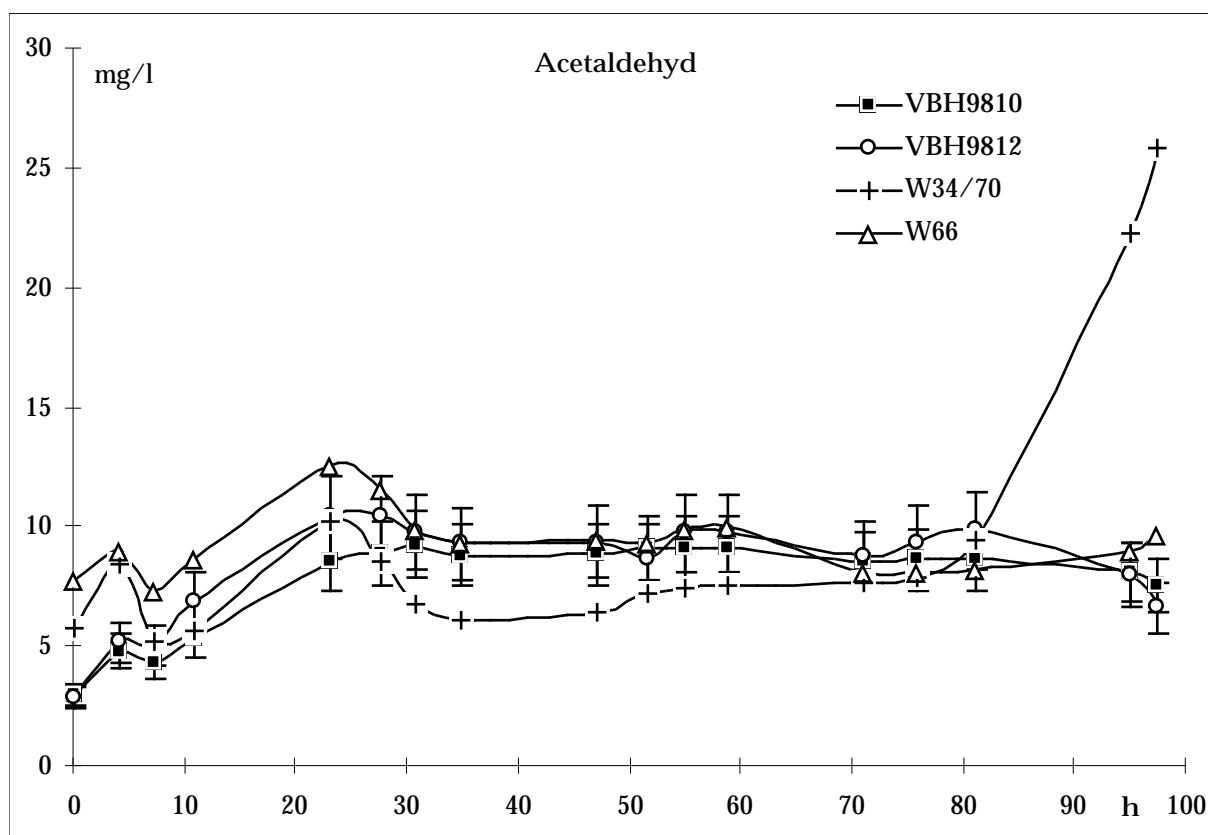


Abbildung 20: Die beiden Isolate VBH9810 (■) und VBH9812 (○) unterscheiden sich in der Entwicklung des Acetaldehyds kaum voneinander. Außer W34/70 (+) am Ende der Gärung entwickelten sich die Referenzen in vergleichbarer Weise ( $\Delta$  = W66).

#### 4.1.4. Bruchbildungsvermögen

Mit Hilfe des Helmtests (Helm *et al.*, 1952) ist es möglich, das Bruchbildungsvermögen eines Hefestammes grob zu quantifizieren, also die Eigenschaft der Zellen mancher Hefestämme, sich aneinander zu lagern und in Form sichtbarer Flocken zu sedimentieren. Eine Hefe mit dieser Eigenschaft bezeichnet man als Bruchhefe. Fehlt einem Stamm diese Fähigkeit, bezeichnet man ihn Staubhefe.

Die untersuchten Eigenisolate konnten mit diesem Test teilweise nicht eindeutig zugeordnet werden, da sich eine schwache Flockenbildung zeigte, wie sie für eine Bruchhefe typisch ist, das Sedimentationsverhalten im Helmtest aber dem einer Staubhefe entspricht (siehe Tabelle 13). Alle Analysen wurden jeweils in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

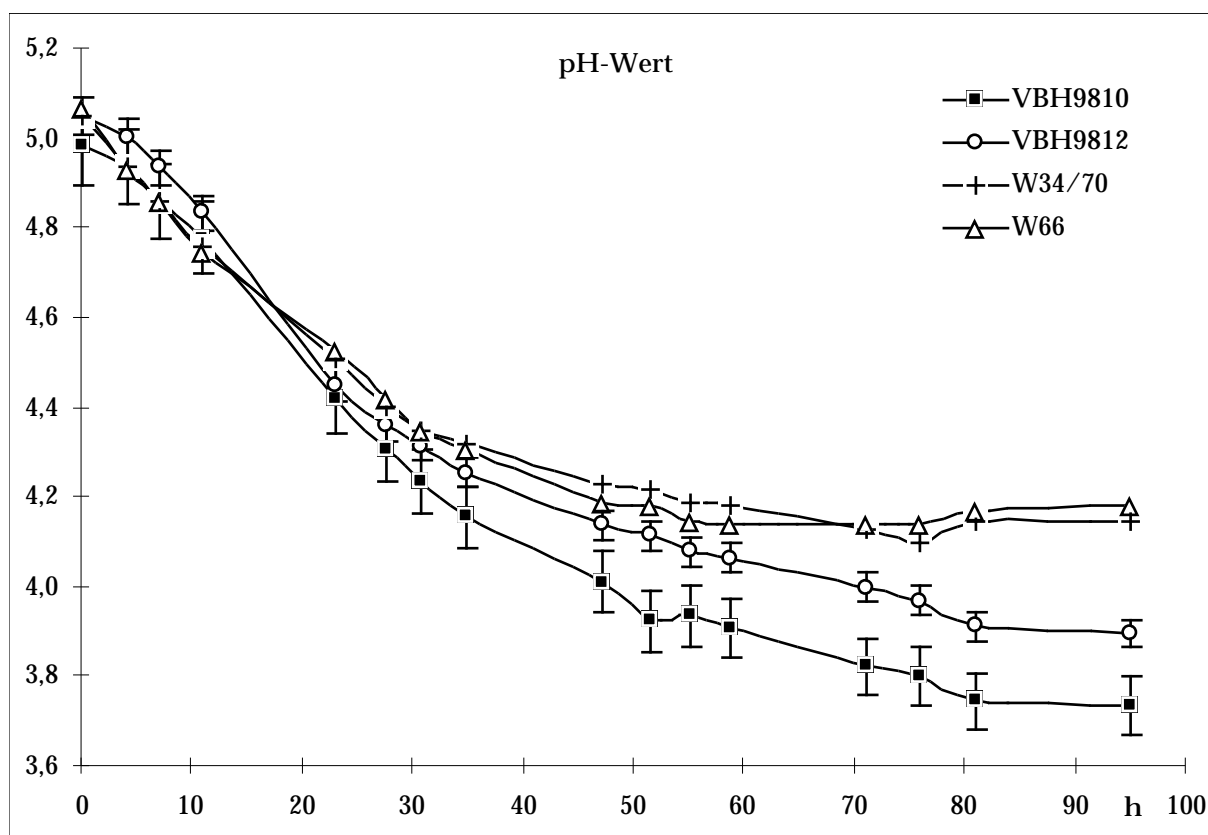


Abbildung 21: Die pH-Absenkung bei VBH9810 (■) ist deutlich stärker als bei VBH9812 (○), dies macht sich aber im Verlauf der stationären Phase erst bemerkbar. Im Vergleich ist die Absenkung des pH-Wertes bei den Referenzen W34/70 (+) und W66 (△) geringer.

Bezeichnung	Sediment nach 10 min	Sediment nach 2 h	Zuordnung
W34/70	3,0 - 4,0 ml	2,0 - 2,5 ml	Bruchhefe
W66	9,8 ml	0,4 / 8,5 ml	Staubhefe
VBH9810	9,5 ml	0,5 ml / 8,0 ml	Staubhefe
VBH9812	9,5 ml	0,4 / 8,5 ml	Staubhefe
VBH9901	3,0 - 3,5 ml	2,5 ml	Bruchhefe
VBH9902	9,0 ml	1,0 / 7,0 - 7,5 ml	Staubhefe
VBH9904	9,5 ml	1,4 / 7,0 - 7,5 ml	Staubhefe
VBH9907	9,5 ml	0,6 / 8,0 ml	Staubhefe
VBH9910	9,5 ml	0,9 / 7,0 - 7,5 ml	Staubhefe

Tabelle 13: Resultate der Helmtests (Sedimentbildung) und Zuordnung nach Bruch- und Staubhefe. Angegeben ist das Volumen der Hefesuspension unterhalb der Klarphase bzw. die Grenze des Zellsediments.



Bezeichnung	Sediment nach 10 min	Sediment nach 2 h	Zuordnung
VBH9913	9,5 ml	0,9 / 7,0 - 7,5 ml	Staubhefe
VBH9915	8,5 - 9,0 ml	1,4 / 6,5 - 7,0 ml	Staubhefe
DGV	4,0 - 5,0 ml	3,0 - 3,5 ml	Bruchhefe
DGV1	3,0 - 3,5 ml	2,0 - 2,5 ml	Bruchhefe
DWV1	3,5 ml	1,5 ml	Bruchhefe
DWV2	9,0 - 9,5 ml	1,0 ml	(obergärig)
DWV3	3,5 ml	2,0 ml	Bruchhefe
DWV4	3,0 ml	2,0 ml	Bruchhefe
DWV5	3,0 - 3,5 ml	1,5 ml	Bruchhefe
BDGH1	3,0 - 3,5 ml	1,0 ml	Bruchhefe
BDGH2	3,0 - 4,0 ml	1,5 ml	Bruchhefe
BDGH3	9,5 ml	0,5 / 8,5 ml	Staubhefe
BDGH4	9,5 ml	0,5 / 8,5 ml	Staubhefe
BDGH5	3,5 - 4,0 ml	1,5 ml	Bruchhefe
BDGH6	3,0 - 4,0 ml	1,5 ml	Bruchhefe
BDGH7	3,0 - 3,5 ml	1,2 ml	Bruchhefe

Tabelle 13: Fortsetzung

#### 4.1.5 Zuckerverwertung

Die unterschiedlich ausgeprägte Möglichkeit der Hefen, verschiedenartige Zucker als Substrate verwerten zu können, bildet ein wichtiges physiologisches Kriterium zu deren Unterscheidung.

Für das Zuckerspektrum der hier untersuchten Stämme und Isolate wurden 20 verschiedene Zucker des Identifikationssystems API 20 C AUX der Firma *BioMerieux* (Land *et al.* 1979, Smith *et al.* 1999, Verweij *et al.* 1999) eingesetzt (siehe Tabelle 14). Alle Proben wurden dabei in Dreifachbestimmungen untersucht, um ein abgesichertes Ergebnis zu erzielen.

Stamm	Glu	Gly	2KG	Ara	Xyl	Ado	Xlt	Gal	Ino	Sor
W34/70	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-
W66	X	X	O	-	-	-	-	X	-	-
VBH9810	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VBH9812	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VBH9901	X	O	-	-	-	-	-	X	-	-
VBH9907	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VBH9913	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DWV1	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-
DWV2	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-
DWV3	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-
DWV4	X	O	-	-	-	-	-	X	-	-
DWV5	X	O	-	-	-	-	-	X	-	-
BDGH1	X	O	-	-	-	-	-	X	-	-
BDGH2	X	O	-	-	-	-	-	X	-	-
BDGH3	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-
BDGH4	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BDGH5	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-
BDGH6	X	O	-	-	-	-	-	X	-	-

Tabelle 14: Wachstum der Hefestämme auf verschiedenen Kohlehydraten nach 6 Tagen. Glu = Glucose, Gly = Glycerol, 2KG = 2-Keto-D-Glutarat, Ara = L-Arabinose, Xyl = D-Xylose, Ado = Adonit, Xlt = Xylit, Gal = Galactose, Ino = Inosit, Sor = Sorbit; X = starkes Wachstum, O = schwaches Wachstum, - = kein Wachstum

Die meisten Hefen zeigten ein sehr einheitliches Verwertungsspektrum, wobei neben Glucose auch Galaktose, Maltose, Saccharose und Raffinose das Wachstum der Zellen ermöglichten.

Die Stämme W66, DWV1, DWV3 und BDHGH3 wuchsen zudem recht gut auf Glycerol, der obergärige Stamm DWV2 konnte auch auf  $\alpha$ -Methyl-D-Glucosamin und Melezitose wachsen.

Stamm	MDG	NAG	Cel	Lac	Mal	Sac	Tre	MLZ	RAF	Kon
W34/70	-	-	-	-	X	X	O	-	X	-
W66	-	-	-	-	X	X	X	-	X	-
VBH9810	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
VBH9812	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
VBH9901	-	-	-	-	X	X	X	-	X	-
VBH9907	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
VBH9913	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
DWV1	-	-	-	-	X	X	X	-	X	-
DWV2	X	-	-	-	X	X	X	X	X	-
DWV3	-	-	-	-	X	X	X	-	X	-
DWV4	-	-	-	-	X	X	O	-	X	-
DWV5	-	-	-	-	X	X	X	-	X	-
BDGH1	-	-	-	-	X	X	O	-	X	-
BDGH2	-	-	-	-	X	X	X	-	X	-
BDGH3	-	-	-	-	X	X	O	-	X	-
BDGH4	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
BDGH5	-	-	-	-	X	X	O	-	X	-
BDGH6	-	-	-	-	X	X	X	-	X	-

Tabelle 14 : Fortsetzung. MDG =  $\alpha$ -Methyl-D-Glucosamin, NAG = N-Actyl-D-Glucosamin, Cel = Cellobiose, Lac = Lactose, Mal = Maltose, Sac = Saccharose, Tre = Trehalose, MLZ = Melezitose, Raf = Raffinose, Kon = Kontrolle; X = starkes Wachstum, O = schwaches Wachstum, - = kein Wachstum

Die Isolate VBH9810, VBH9812, VBH9907 und VBH9913 sowie der Stamm BDGH4 waren allerdings lediglich auf Glucose und schwach auf Saccharose angewachsen.

Weitere Unterschiede im Wachstum der Hefen waren sehr gering und ließen sich nicht weiter differenzieren.

## 4.2. Genetische Typisierung der Hefestämme

Für die Typisierung der Hefen im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs verschiedene genetische Methoden auf ihre Eignung geprüft. Bei der ersten Methode, der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) werden die Zellen unter Erhaltung der vollständigen Chromosomen aufgeschlossen und die intakten Chromosomen anschließend elektrophoretisch in einem wechselnden elektrischen Feld aufgetrennt. So entsteht ein Bandenmuster entsprechend der Größe der einzelnen Chromosomen. Bestehen nun Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen bezüglich Anzahl und Größe der Chromosomen, können diese zur Differenzierung nutzbar gemacht werden.

Eine weitere Methode ist die Größenanalyse von DNA-Fragmenten, wie sie bei der Restriktion mit bestimmten Endonukleasen entstehen, die sequenzabhängig Schnitte in den DNA-Strang einfügen. Diese sogenannten Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP), die ebenfalls mittels elektrophoretischer Auftrennung analysiert werden, ermöglichen teilweise eine genauere Zuordnung als die PFGE, insbesondere, wenn die gewonnenen Fragmente mittels Hybridisierung nachgewiesen werden. Eine Analyse der Mikrosatelliten, d.h. kurzen, sich wiederholenden Sequenzen, die meistens in nicht-codierenden Bereichen des Genoms der Hefe verteilt sind, ist mit Hilfe geeigneter PCR-Primer möglich. Hier treten ebenfalls Längenunterschiede auf, die bei der Replikation der Mikrosatelliten durch ein Verrutschen der DNA-Polymerase auf dem Matrizenstrang entstehen. Auch durch verschiedene Allele der polyploiden oder aneuploiden Industriehefen kommen hier Unterschiede vor.

Eine Hybridisierung von durch Restriktionsenzyme geschnittener DNA mit spezifischen Sonden aus markierten DNA-Abschnitten funktioniert ähnlich wie die Restriktionsanalyse, kann aber durch einen wesentlich sensibleren Nachweis ein komplexeres Muster von DNA-Banden bringen, die sonst in einem Gel nicht erkennbar wären.

Mit der Methode der DNA-Sequenzierung kann die Abfolge der vier Basen bestimmt werden und ermöglicht so einen direkten Vergleich zwischen den untersuchten Organismen. Zudem bildet sie, wenn entsprechende Sequenzunterschiede gefunden werden, auch eine sehr gute Grundlage für das Design von PCR-Primern, die für die untersuchten Organismen spezifisch sind, d.h. im Optimalfall nur mit diesen ein PCR Produkt bilden. Allerdings können im normalen Rahmen nur begrenzte Abschnitte des Genoms untersucht werden und das Auffinden von Unterschieden ist nicht garantiert.

Schließlich ermöglicht die AFLP genannte Amplifizierung von Restriktionsfragmenten mit Hilfe der PCR, durch die Wahl von Primern mit geeigneter Spezifität, einen großen Teil des Genoms auf differenzierende Marker zu untersuchen.

#### 4.2.1. Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Für die zu Beginn durchgeführten PFGE-Analysen wurden eine Auswahl von Betriebshefe-Isolaten sowie die Stämme der Firma *Doemens* herangezogen. Zur Auswahl von Isolaten für die physiologische Charakterisierung wurden zunächst 16 Betriebshefe-Isolate analysiert (bezeichnet mit VBH9801 bis VBH9816).

Die Elektrophorese erfolgte bei diesem Gel über 44 h mit 170 V und variabler Stromstärke mit einer Pulszeit von 95s. Bei dieser Auftrennung sind etwa 14 Banden erkennbar, und in zwei Bereichen treten Unterschiede zwischen den Proben auf.

Mustervariationen im Bereich der größten Banden waren schwer zu interpretieren und wurden daher für diese Analysen nicht berücksichtigt. Die Proben ließen sich aber anhand einer deutlich unterscheidbaren Chromosomenbande in zwei Gruppen differenzieren, je nach dem, ob sie diese bestimmte Bande im oberen Drittel des Musters aufwiesen oder nicht (siehe Abbildung 22).

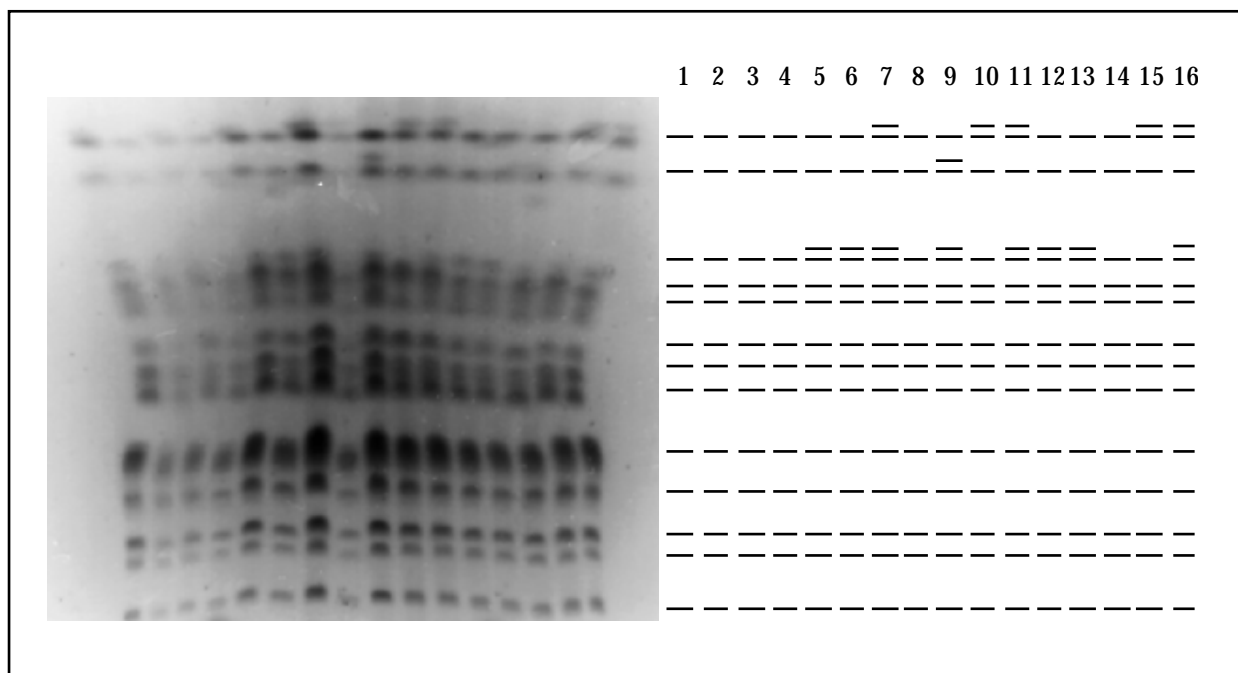


Abbildung 22: PFGE-Bandenmuster der Betriebshefe-Isolate VBH9801 bis VBH9816. Differenzen im Bandenmuster sind nur im oberen Drittel zu erkennen.

Weiterhin wurden von der Betriebshefe folgende, teilweise später gewonnene Isolate untersucht: VBH9810, VBH9812, VBH9903, VBH9907, VBH9909 und VBH9914. Hinzu kamen zudem die Kontrollstämme W34/70 und W66 der Hefebank Weihenstephan. Beim Referenzstamm W34/70 sind mit den im Methodenteil angegebenen Laufparametern im Pulsfeld-Gel insgesamt 20 Banden erkennbar (Abbildung 23).

Innerhalb der Betriebshefe-Isolate sind von diesem Muster weder in Anzahl noch in Größe der Banden Abweichungen zu erkennen. Lediglich der zweite Kontrollstamm, die Staubhefe W66, ist durch eine Verschiebung der beiden größten Banden gekennzeichnet, die weiter wandern als die der anderen Stämme. In anderen Größenbereichen konnten aber auch hier keine Unterschiede festgestellt werden.

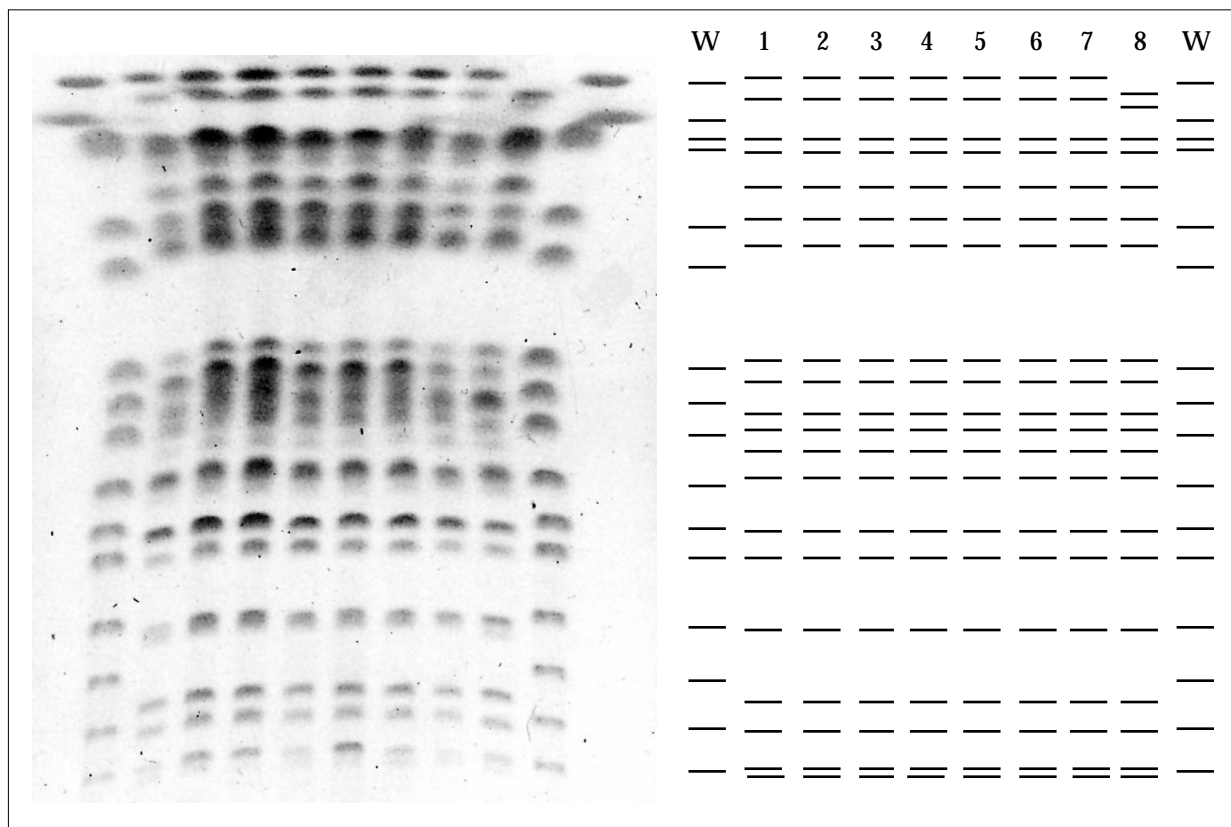


Abbildung 23: PFGE-Gel der Isolate VBH9903, VBH9907, VBH9909, VBH9914, VBH9810 und VBH9812 sowie der Stämme W34/70 und W66 (v.l.n.r.). W = Größenstandard

Die Untersuchung der Hefestämme, die von den Doemens-Lehranstalten zur Verfügung gestellt wurden, erbrachte auch bei dem Stamm DWV2, einer obergärigen Hefe, eine deutlich andere Bandenabfolge (Abbildung 24).

Dieser Stamm zeigt ein weit weniger komplexes Chromosomenmuster als die untergärigen Proben, innerhalb derer sich ansonsten keine auswertbaren Unterschiede finden ließen.

#### 4.2.2. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen

Für die Analyse der Hefen mit der RFLP-Methode wurden zunächst in mehreren Vorversuchen eine Reihe von Endonukleasen auf ihre Eignung getestet, um anhand der erzielten Bandenmuster eine Auswahl der am besten funktionierenden Restriktionsen-

zyme treffen zu können. Mit dieser Auswahl wurden anschließend die weiteren Untersuchungen im Detail durchgeführt.

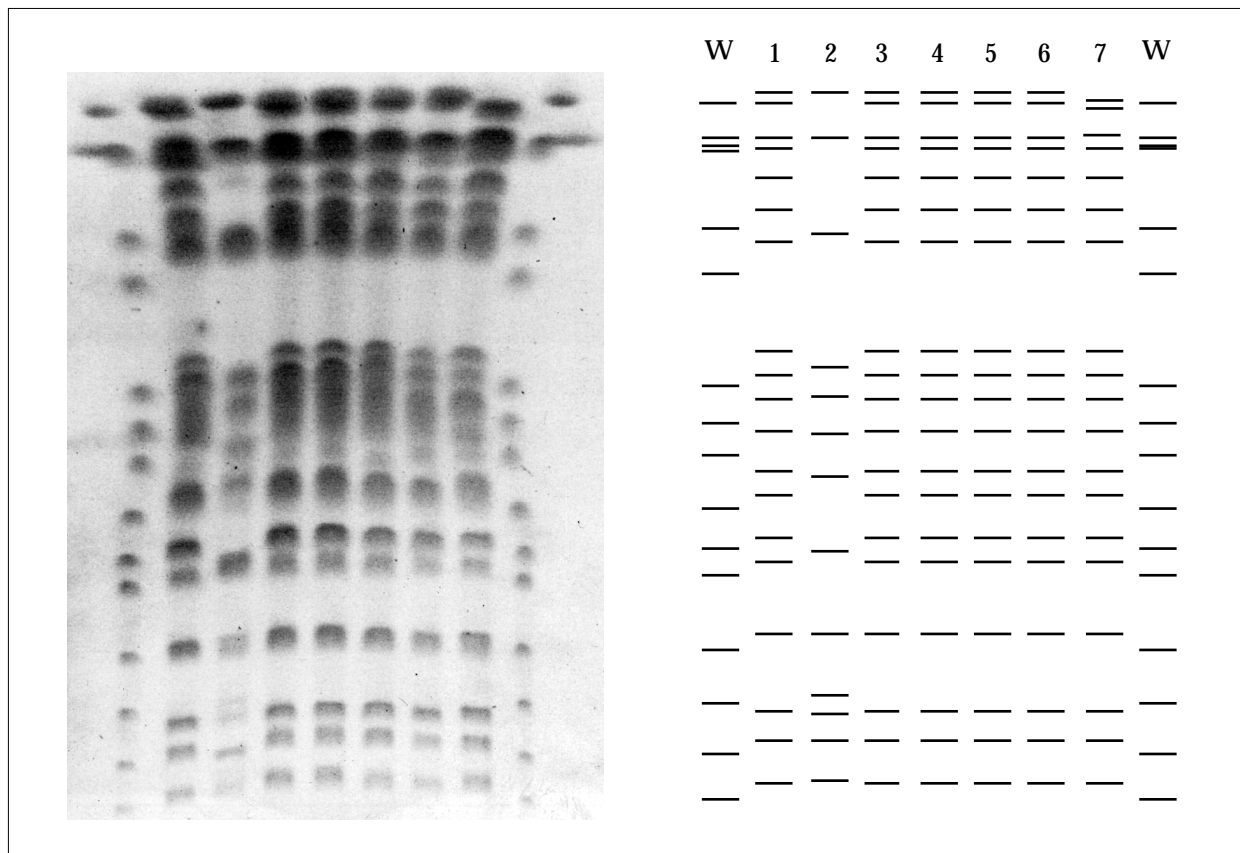


Abbildung 24: PFGE-Gel der Stämme DWV1, DWV2, DWV3, DWV4 und DWV5 sowie der Referenzen W34/70 und W66 (v.l.n.r.). W = Größenstandard

#### 4.2.2.1. Auswahl der geeigneten Restriktionsenzyme

In den Vorversuchen stellte sich heraus, daß unter den fünfzehn primär eingesetzten Endonukleasen die Enzyme *SacII* und *SmaI* die besten Restriktionsmuster ergaben. Ausschlaggebend war dabei ein möglichst komplexes und deutliches Bandenmuster, ohne daß dabei die Auswertung durch einen zu starken Hintergrund erschwert wurde. Im einzelnen ergab sich bei den Enzymen folgendes Bild.

*BamHI* schnitt die DNA gleichmäßig, d.h. es blieb keine Bande mit kaum geschnittenen, großen Fragmenten übrig. Im Bandenmuster waren allerdings nur einige sehr große Banden und kaum welche mit geringerer Größe zu erkennen. Bei einer Probe (VBH9810) erschien eine sehr helle, starke Bande mit einer Größe von etwa 2 kb, die bei keinem anderen Stamm zu sehen war (siehe Abbildung 25).

*BspCI* trennte vier Banden mit Größen zwischen ca. 3 kb und 9,4 kb aus der DNA, wobei nur ein geringer Hintergrund entstand. Musterunterschiede zwischen den Stämmen konnten dabei nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 25).

*BssHII* schnitt lediglich drei im Gel sichtbare Banden aus der DNA heraus, die ohne erkennbaren Hintergrund auftraten. Die Fragmentgrößen lagen hier bei etwa 3,5 bis 9,4 kb. Auch hier waren keine Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen erkennbar (siehe Abbildung 25).

*CfoI* schnitt die DNA komplett und gleichmäßig, so daß ein sehr starker Hintergrund zu sehen war, aus dem etwa vier Banden im Bereich von 0,5 bis 4 kb hervortraten, ohne daß anhand dessen eine Unterscheidung der Hefen möglich war (siehe Abbildung 25).

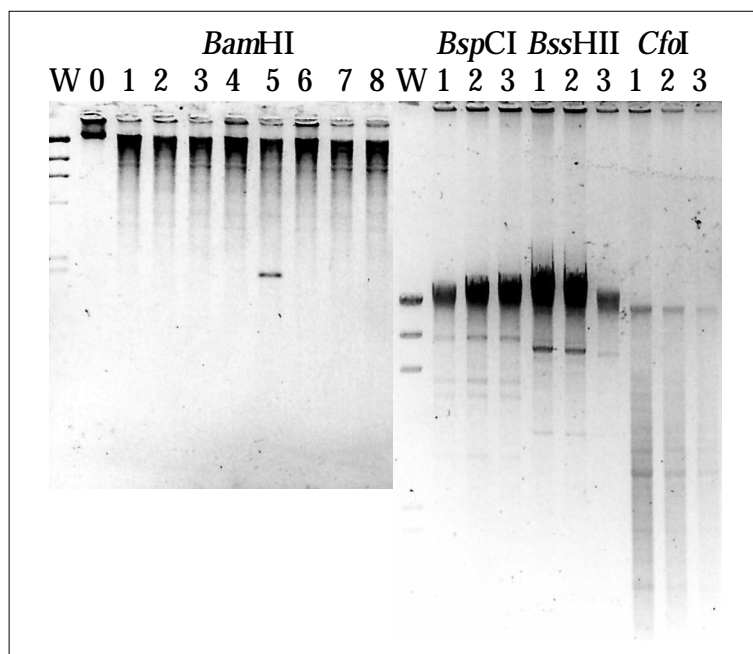


Abbildung 25: Restriktionsmuster der Enzyme *Bam*HI (links), *Bsp*CI, *Bss*HII und *Cfo*I (rechts). W = Größenstandard, 0 = ungeschnitten; linkes Bild: 1 = VBH9903, 2 = VBH9907, 3 = VBH9909, 4 = VBH9914, 5 = VBH9810, 6 = VBH9812, 7 = W34/70, 8 = W66; rechte Seite: 1 = DWV3, 2 = DWV4, 3 = W34/70.

*Eco*RI produzierte bei vollständigem Verdau meist ein komplexes Muster aus etwa 11 deutlichen Banden von ca. 2 bis 20 kb, hatte aber auch einen sehr starken Hintergrund (siehe Abbildung 26).

*Fok*I verdaute die DNA sehr gleichmäßig, so daß keine Bande mit „ungeschnittener“ DNA verblieb, der Verdau ergab etwa 14 teilweise sehr schwache Banden mit einer Größe von bis zu 9,5 kb vor einem deutlichen Hintergrund (siehe Abbildung 27).



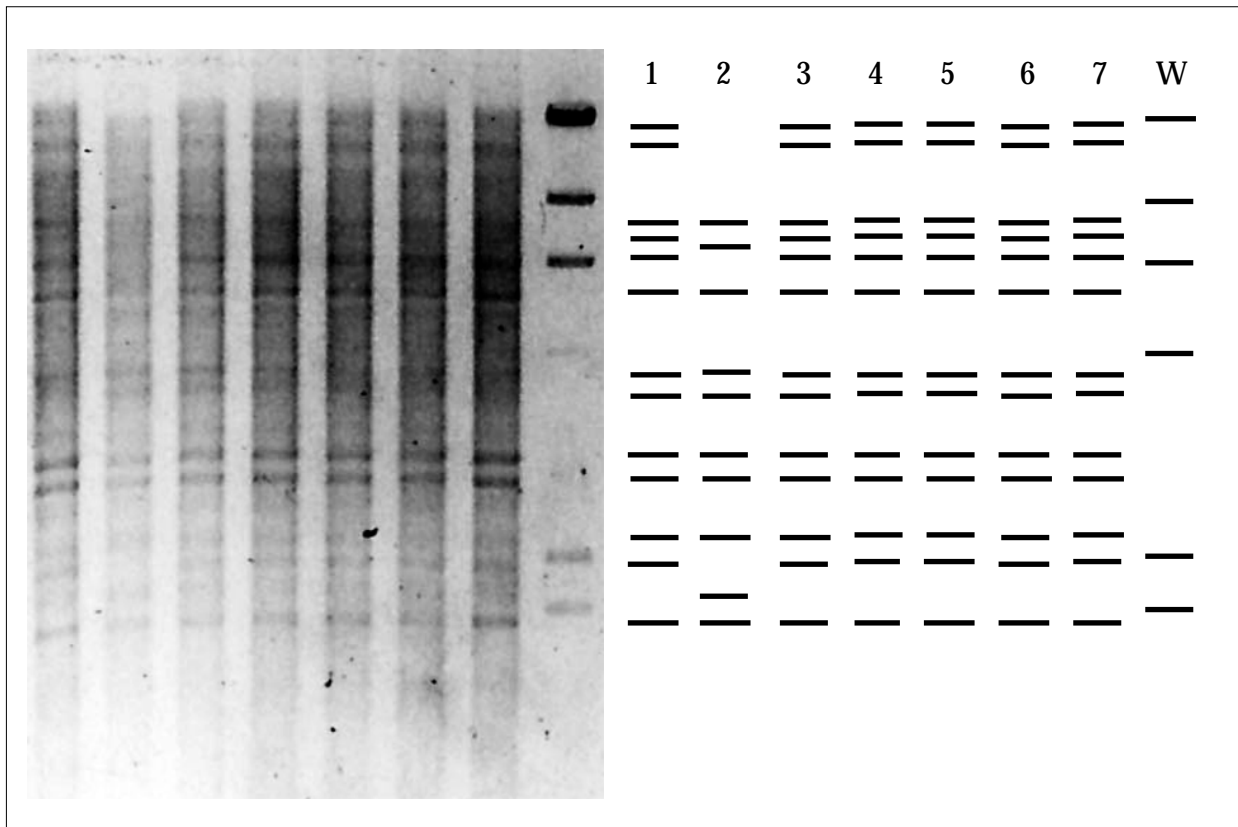


Abbildung 26: Das Restriktionsmuster von *EcoRI* läßt im Agarosegel bei allen Stämmen eine Abfolge aus 13 Banden erkennen. Zur Verdeutlichung sind die Bandenmuster rechts schematisiert dargestellt. 1 = DWV1, 2 = DWV2, 3 = DWV3, 4 = DWV4, 5 = DWV5, 6 = W34/70, 7 = W66, W = Größenstandard

*PvuII* verdaute die DNA vollständig und erbrachte eine Abfolge aus elf erkennbaren Banden über einen weiten Größenbereich, wobei der Hintergrund allerdings sehr stark war, was eine Auswertung erschwerte (siehe Abbildung 27).

*RsrII* konnte nur zwei erkennbare Banden aus der DNA herausschneiden, der weitaus größte Teil blieb weitgehend ungeschnitten. Dementsprechend war aber auch kein Hintergrund zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

*SacII* erbrachte ein klar differenziertes Restriktionsmuster mit bis zu 19 Banden in einem weiten Größenbereich, zudem war nur im Bereich der größten Banden Hintergrund zu erkennen (siehe Abbildung 27).

*SalI* erzeugte im Bereich der größeren Fragmente einen deutlichen Hintergrund und nur drei unterscheidbare, große Banden. Im Bereich der kleineren Fragmente war keine Bande auf dem Gel zu sehen (Daten nicht gezeigt).

*Sau3A* schnitt die DNA vollständig und zumeist in kleinere Fragmente, so daß im unteren Teil des Gels ein starker Hintergrund entstand. Es waren zumeist neun Banden mit einer Größe bis etwa 10 kb erkennbar. Bei einer der untersuchten Proben (VBH9810) zeigte sich allerdings eine etwa 2 kb große, sehr starke Bande, die bei *Bam*HI ebenfalls zu sehen war. (*Sau3A* hat eine Erkennungssequenz, die der von *Bam*HI sehr ähnelt, sie ist nur um 2 Basen kürzer) (siehe Abbildung 28).

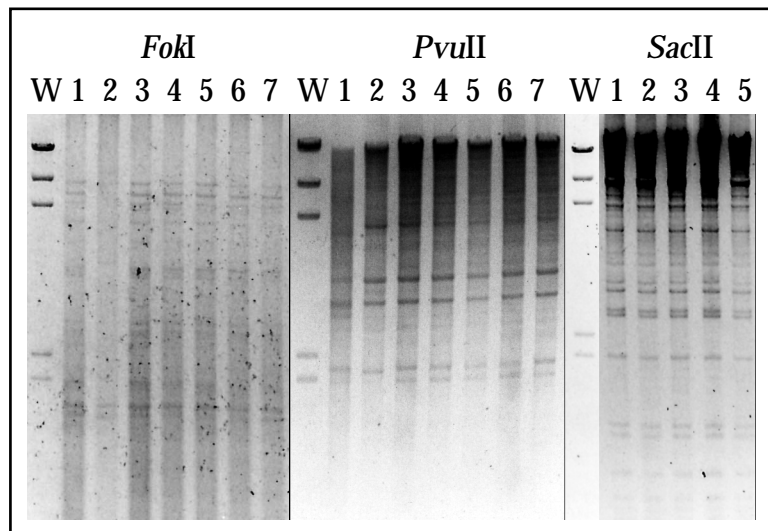


Abbildung 27: Restriktionsmuster der Enzyme *Fok*I (links), *Pvu*II (Mitte) und *Sac*II (rechts). W = Größenstandard, 1 = DWV1, 2 = DWV2, 3 = DWV3, 4 = DWV4, 5 = DWV5, 6 = W34/70, 7 = W66.

*Sfi*I schnitt nur vier unterscheidbare Banden ohne Hintergrund aus der DNA. Ähnlich wie bei *Sma*I gab es bei den Stämmen VBH9907, VBH9810 und VBH9812 innerhalb der untergärigen Hefen abweichende Bandenmuster. Bei dem Stamm VBH9810 entstand, ähnlich wie bei *Bam*HI und *Sau3A*, eine starke Bande im Bereich von 2 kb, die mit den vorgenannten aber nicht größengleich war. (siehe Abbildung 28).

*Sma*I ergab ein sehr umfangreiches Bandenmuster mit bis zu 18 Banden in einem weiten Größenbereich und dabei kaum erkennbarem Hintergrund. Bei den untersuchten Stämmen ließen sich ohne weiteres fünf verschiedene Bandenmuster ansprechen (siehe Abbildung 29).

*Xba*I erzeugte durch vollständigen Verdau ein Muster mit acht sichtbaren Banden, wobei die meisten aber als größere Fragmente (> 4 kb) vor einem starken Hintergrund auftraten (siehe Abbildung 28).

*Xma*I ist ein Isoschizomer von *Sma*I, es hat die gleiche Erkennungssequenz, schneidet aber mit 5'-überhängenden Enden (statt blunt-end bei *Sma*I) und hat eine andere Sensi-

tivität gegenüber DNA-Modifikation (Methylierungen). Es wurde zur Kontrolle der *SmaI*-Restriktionen eingesetzt und produzierte stets die gleichen Muster wie *SmaI* (Daten nicht gezeigt).

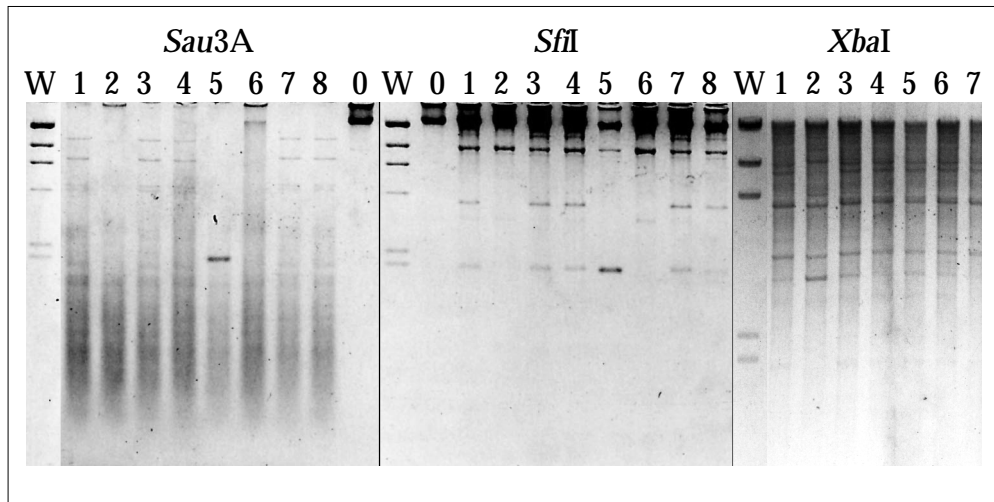


Abbildung 28: Restriktionsmuster der Enzyme *Sau3A* (links), *SfiI* (Mitte) und *XbaI* (rechts). W = Größenstandard; links und Mitte: 0 = ungeschnittene DNA, 1 = VBH9903, 2 = VBH 9907, 3 = VBH 9909, 4 = VBH9914, 5 = VBH9810, 6 = VBH9812, 7 = W34/70, 8 = W66; rechts: 1 = DWV1, 2 = DWV2, 3 = DWV3, 4 = DWV4, 5 = DWV5, 6 = W34/70, 7 = W66.

#### 4.2.2.2. Restriktionspolymorphismen mit *SmaI* und *SacII*

Im einzelnen wurden mit *SmaI* achtzehn Isolate aus der Betriebshefe, fünf Stämme der Doemens-Lehranstalt und sieben Druckgärhefen der VLB Berlin sowie die Stämme W34/70 und W66 der Stammsammlung Weihenstephan untersucht.

Die DNA der meisten dieser Stämme zeigte nach der Restriktion mit *SmaI* ein Restriktionsmuster aus insgesamt 15 Banden (siehe Abbildung 29).

Von diesem „Standardmuster“ zeigten die Isolate VBH9907, VBH9913, VBH9810, VBH9812 sowie die obergärige Hefe DWV2 deutliche Abweichungen (siehe Abbildungen 29 und 30). Auch die Druckgärhefe BDGH4 unterschied sich in ihrem Bandenmuster und entsprach dem des Stammes VBH9907 (Daten nicht gezeigt).

Während VBH9810 und VBH9913 ein Vierer-Muster mit Banden in etwa der gleichen Stärke produzierten, entstand bei VBH9907 und BDGH4 ein Muster mit zwei sehr starken und einigen schwachen Banden.

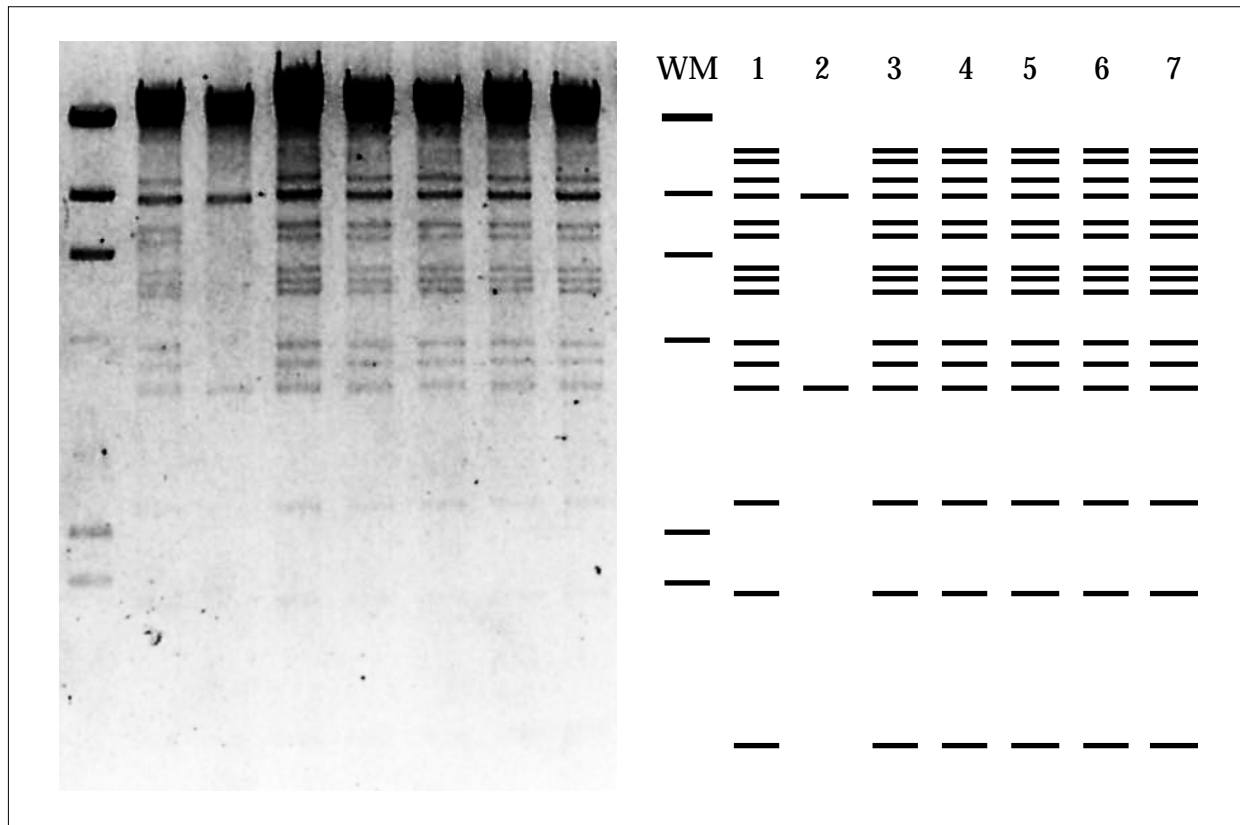


Abbildung 29: Das Restriktionsmuster von *SmaI* erzeugte bei den untergärigen Hefen 15 Banden, die obergärige Kontrolle DWV2 ergab lediglich zwei Banden. WM = Größenstandard, 1 = DWV1, 2 = DWV2, 3 = DWV3, 4 = DWV4, 5 = DWV5, 6 = W34/70, 7 = W66.

Das Muster des Isolates VBH9812 wich von allen anderen ab, es hatte die gleichen schwachen Banden wie bei VBH9907, aber ihm fehlte die kleinere der starken Banden. Die obergärige Hefe DWV2 ließ nur zwei Banden von größeren DNA-Fragmenten erkennen.

Um die Restriktionsmuster dieses Enzyms zusätzlich zu verifizieren, wurde ein Isoschizomer eingesetzt, das die gleiche Erkennungssequenz besitzt wie *SmaI*. Lediglich in der Art des Schnittes und in der Sensitivität gegenüber Modifikationen der DNA (Methylierungen) unterscheiden sich die Enzyme funktionell.

Die Restriktionsmuster dieses Enzyms namens *XmaI* waren mit denen von *SmaI* identisch (siehe Abbildung 31).

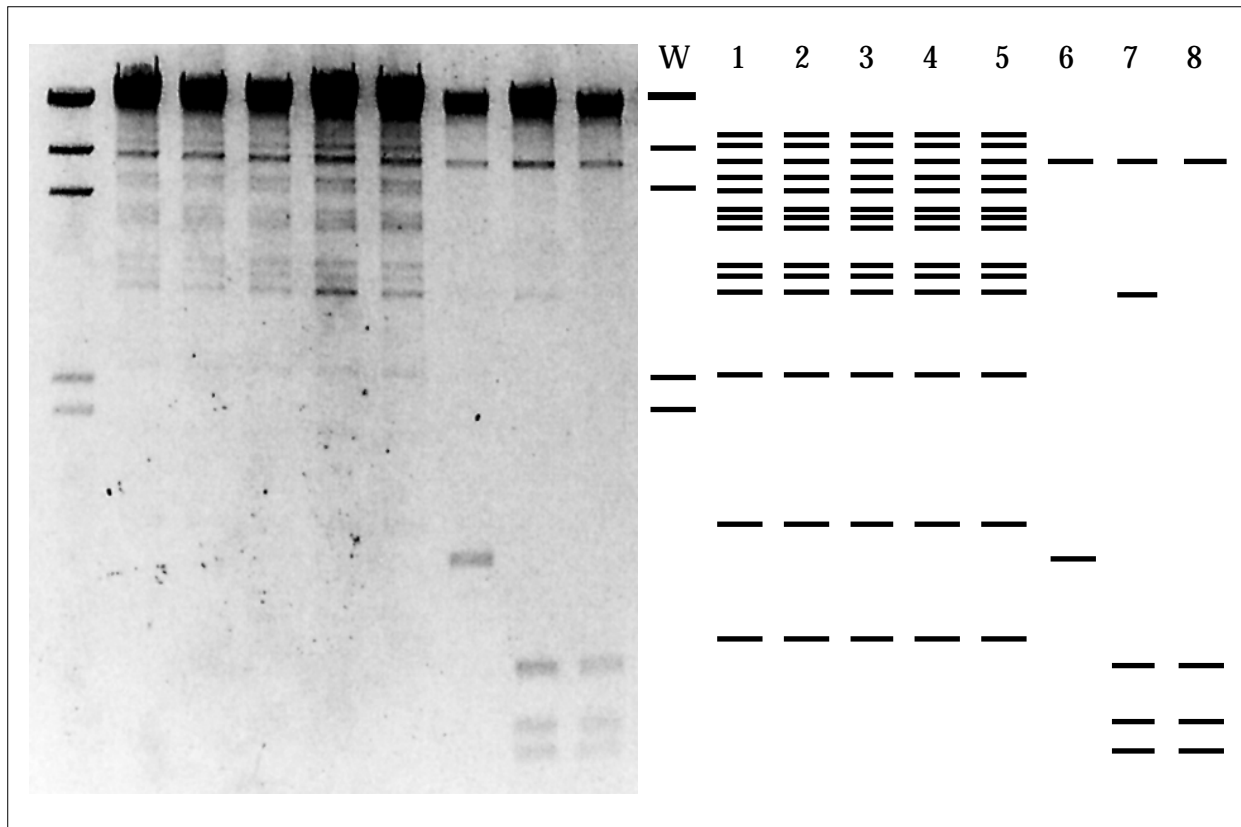


Abbildung 30: Das Restriktionsmuster von *SmaI* bei ausgewählten Betriebshefe-Isolaten zeigt deutliche Unterschiede bei drei Proben. WM = Größenstandard, 1 = VBH9901, 2 = VBH9905, 3 = VBH9908, 4 = VBH9911, 5 = VBH9916, 6 = VBH9907, 7 = VBH9913, 8 = VBH9810

### Restriktion mit *SacII*

Das „Grundmuster“ der *SacII*-Restriktionen bestand aus 15 Banden, die über einen weiten Größenbereich verteilt waren. Bei den Eigenisolaten konnten nur drei Stämme von den anderen unterschieden werden. Alle übrigen besaßen das oben bereits erwähnte „Grundmuster“.

VBH9810, VBH9812, VBH9907 und VBH9913 ließen sich, ähnlich wie mit *SmaI*, anhand der Bandenverteilung gut differenzieren. Unter den Stämmen von Doemens konnte nur die obergärige Hefe DWV2 durch ein Muster mit sieben Banden von den übrigen unterschieden werden (siehe Abbildung 32).

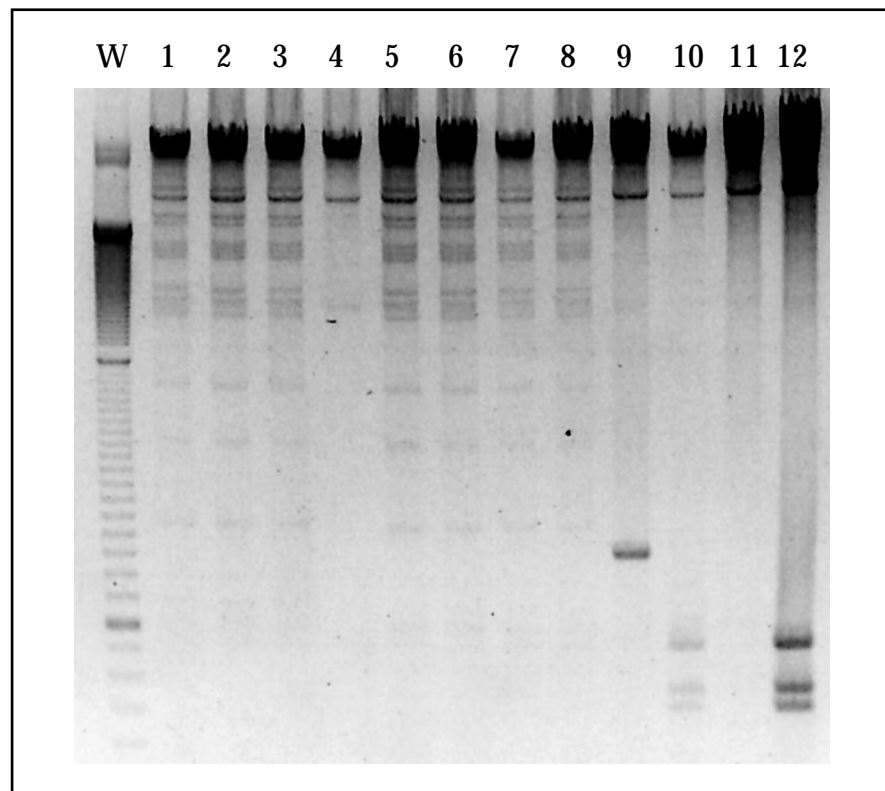


Abbildung 31: Das Restriktionsenzym *XmaI* bildet die gleichen Bandenmuster wie sein Isoschizomer *SmaI*. W = Größenstandard, 1 = W34/70, 2 = W66, 3 = DWV1, 4 = DWV2, 5 = DWV3, 6 = DWV4, 7 = DWV5, 8 = VBH9901, 9 = VBH9907, 10 = VBH9913, 11 = VBH9810, 12 = VBH9812

#### 4.2.2.3. Doppelverdaue mit zwei Restriktionsenzymen

Aus den oben aufgeführten Restriktionsenzymen konnten einige in Kombination eingesetzt werden. Dazu mußten die Puffer übereinstimmen und die Einzel-Restriktionen durften keinen zu starken Hintergrund bilden.

Hier kamen die Paarungen von *SacII* und *SmaI* sowie *BssHII* und *SfiI* in Frage. Ein Verdau mit *SacII* und *SmaI* ergab ein sehr umfangreiches Muster mit 14 Banden in recht gleichmäßigen Abständen (siehe Abbildung 33).

Allerdings konnten dadurch keine weiteren Differenzierungen innerhalb der untergäri- gen Stämme erreicht werden.

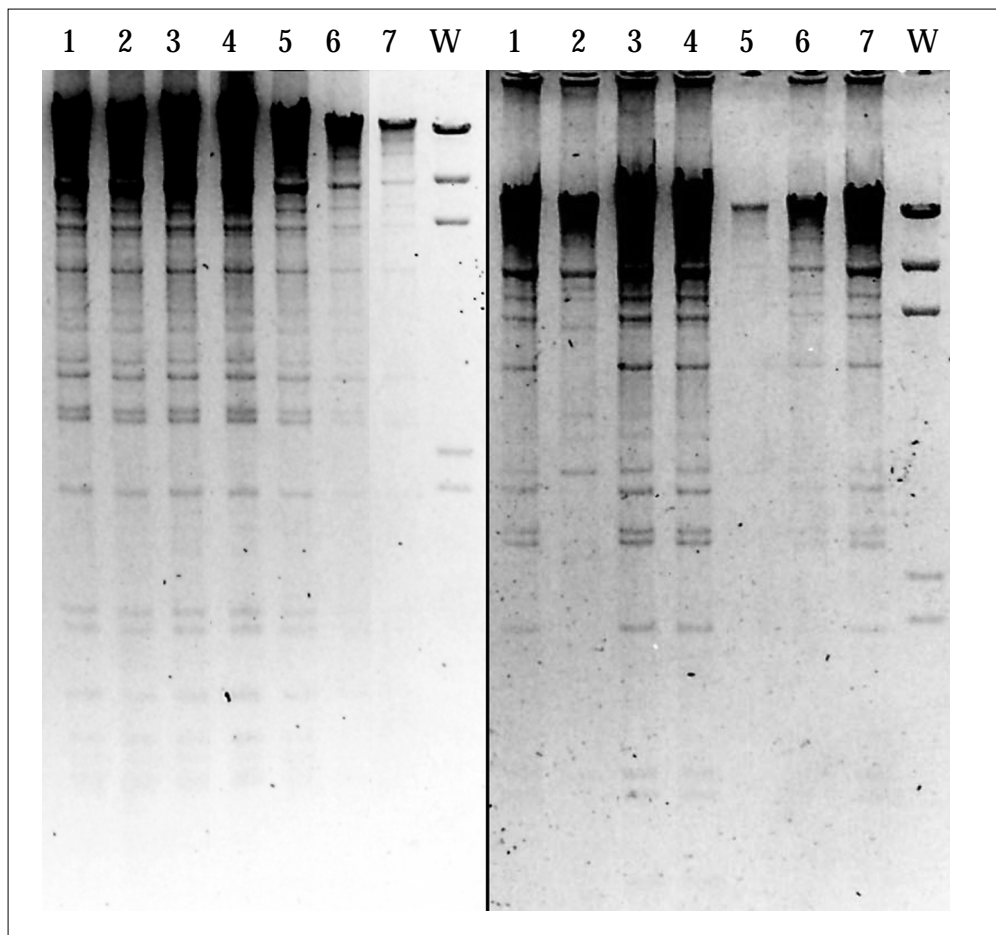


Abbildung 32: Restriktionsmuster mit dem Enzym *SacII*. W = Größenstandard, links: 1 = VBH9902, 2 = VBH9904, 3 = VBH9906, 4 = VBH9910, 5 = VBH9912, 6 = VBH9915, 7 = W34/70; rechts: 1 = DWV1, 2 = DWV2, 3 = DVW3, 4 = DWV4, 5 = DWV5, 6 = W34/70, 7 = W66.

Der Doppelverdau mit *BssHIII* und *SfiI* wurde lediglich an den beiden Betriebsfeststämmen DWV3 und DWV4 sowie der Referenz W34/70 durchgeführt und erbrachte bei allen drei Proben ein einheitliches Muster aus sechs Banden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.3. Hybridisierung von Restriktionsfragmenten mit DIG-markierten DNA-Sonden

Die Hybridisierung der mit Restriktionsenzymen behandelten DNA sollte eine bessere Auswertung der RFLP, vor allem bei den schwer auswertbaren, häufig schneidenden Enzymen, ermöglichen. Daher wurden vornehmlich Restriktionen von *EcoRI* und *CfoI* untersucht.





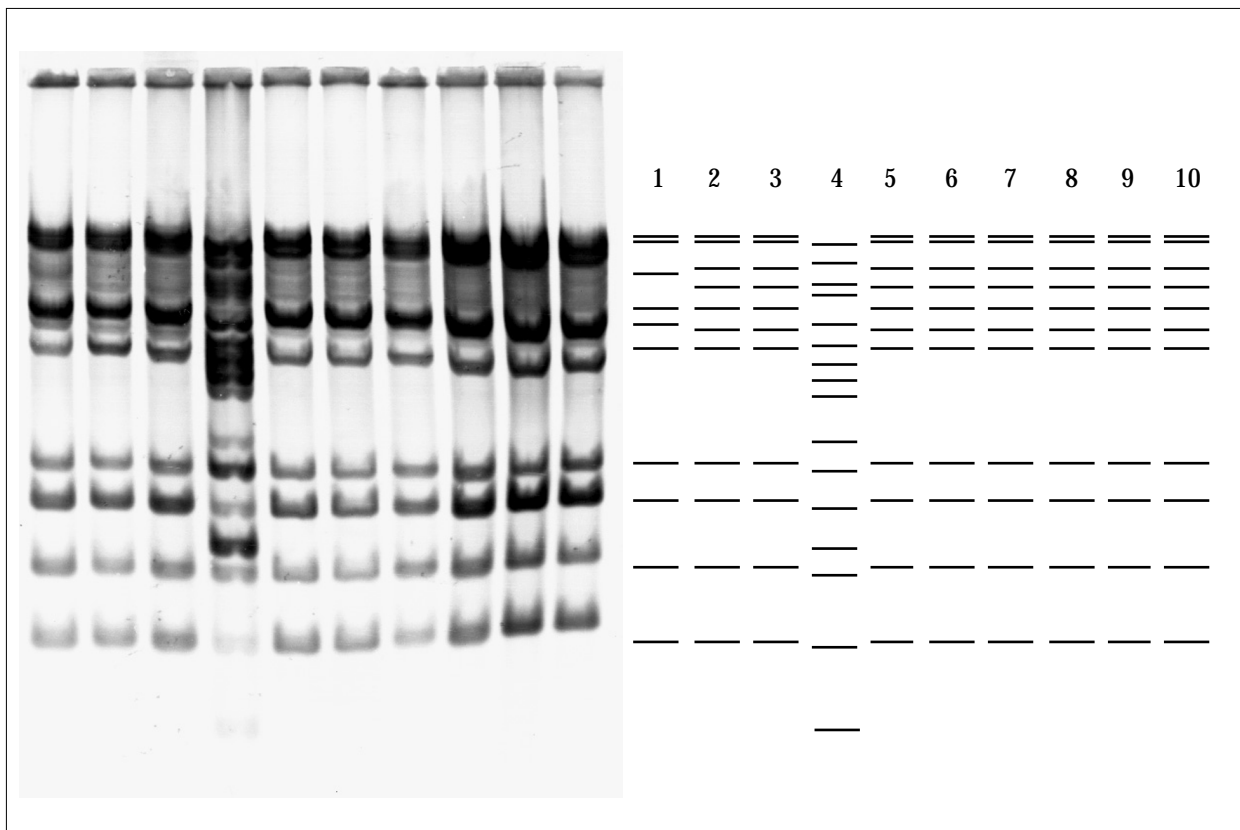


Abbildung 34: Hybridisierung *EcoRI*-verdauter DNA mit der Ty1-15-Sonde. Neben dem Bild der Membran ist ein Schema der Bandenmuster abgebildet. 1 = W66, 2 = W34/70, 3 = DWV1, 4 = DWV2, 5 = DWV3, 6 = DWV4, 7 = DWV5, 8 = VBH9901, 9 = VBH9810, 10 = VBH9812.

Bei der Verwendung des Restriktionsenzym *CfoI* waren zehn bis zwölf Banden erkennbar, von denen einige, besonders die im oberen Größenbereich, jedoch nur sehr schwach waren. Die Bandenmuster ermöglichten es ebenfalls, insgesamt drei Gruppen zu differenzieren. Sie stimmten mit denen der *EcoRI*-Hybridisierung überein (siehe Abbildung 35):

Gruppe 1: W34/70, DWV1, DWV3, DWV4, DWV5, VBH9916, VBH9810, VBH9812

Gruppe 2: W66

Gruppe 3: DWV2

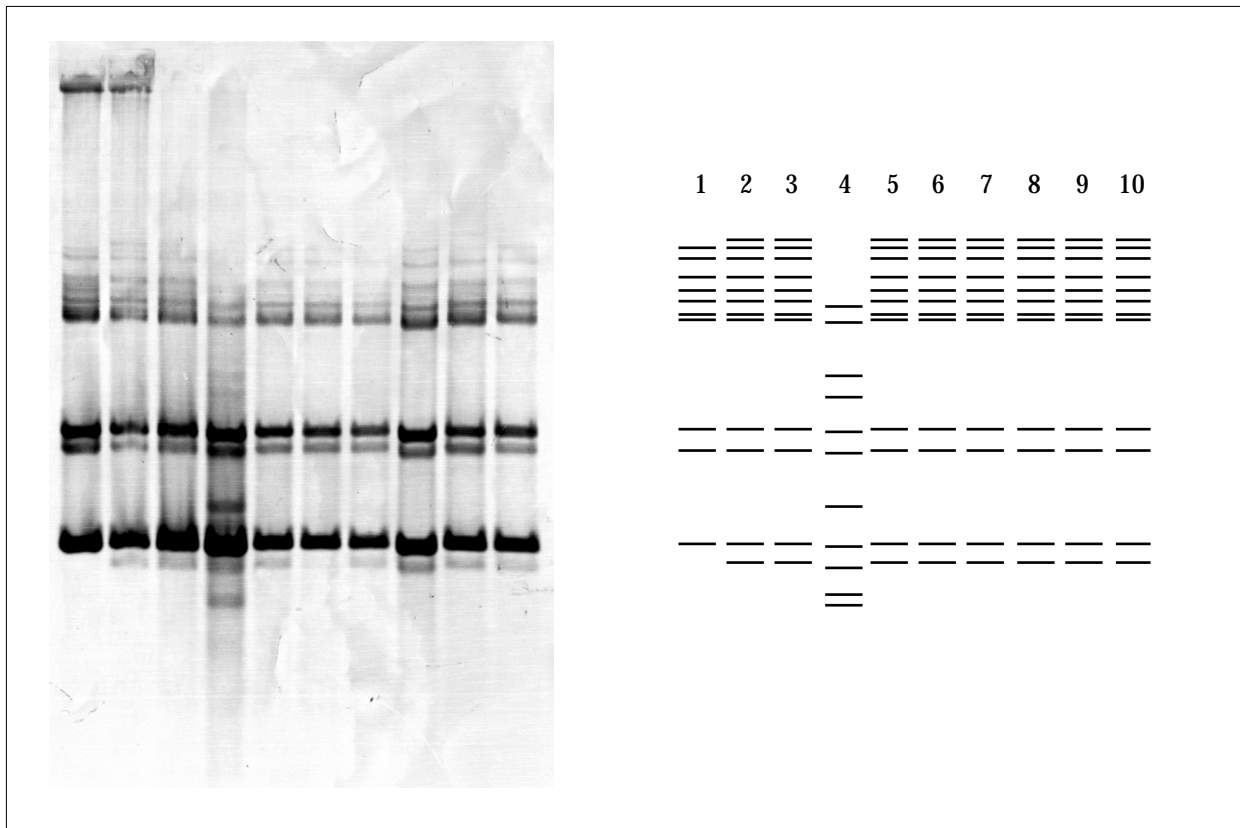


Abbildung 35: Hybridisierung *CfoI*-verdauter DNA mit der Ty1-15-Sonde. Neben dem Bild der Membran ist ein Schema der Bandenmuster abgebildet. 1 = W66, 2 = W34/70, 3 = DWV1, 4 = DWV2, 5 = DWV3, 6 = DWV4, 7 = DWV5, 8 = VBH9916, 9 = VBH9810, 10 = VBH9812.

#### 4.2.4. Mikrosatellitentypisierung

Als Mikrosatelliten bezeichnet man kurze, sich tandemartig wiederholende Sequenzen im Genom (z.B. TTATTATTATTA...), die sich meistens in nicht codierenden Bereichen befinden und daher, insbesondere in eukaryotischen Genomen, nur einem sehr geringen Selektionsdruck ausgesetzt sind. Diese monotonen Sequenzen können durch Fehler bei der DNA Replikation (sogenanntes "slippage" der DNA-Polymerase) mutieren, wodurch sich Veränderungen in der Länge der gesamten Sequenz ergeben.

Da diese Veränderungen im Verhältnis zu Mutationen im übrigen Genom häufiger auftreten, kann man sie sich zur Differenzierung nahe miteinander verwandter Organismen zunutze machen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Mikrosatelliten im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* wurden mit Hilfe einer BLAST-Suche in der *Saccharomyces* Genome Database (SGD) der Stanford University, California, USA ausfindig gemacht, indem die intergenischen, also nicht codierenden Bereiche nach den typischen, sich wiederholenden Sequenzen durchsucht wurden, die einen Mikrosatelliten ausmachen.

Abschnitte mit geeigneter Größe und Sequenz wurden herausgesucht und in deren unmittelbar flankierende Bereiche passende Primer für eine PCR gesetzt. Auf diese Weise wurden insgesamt 12 Primersets für Mikrosatelliten entwickelt. Davon lagen acht in intergenischen Bereichen von Chromosom IV, VI, VII, VIII, XII, XIII und XV, weitere vier in der mitochondrialen DNA. Einige Charakteristika der Mikrosatelliten sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Chromosom	Motiv(e)	Wiederholungen*	Länge (bp)*
IV	TTA	34	193
IV	TA / TG	34 / 17	196
VI	GT	36	135
VII	TTA	31	216
VIII	TTA / TAG	33 / 12	230
XII	GA / TAA	44 / 5	176
XIII	TTA	43	227
XV	TAA / TGA / TAG	20 / 7 / 7	195
mito	TA	47	189
mito	TTA / TA / ATA	57 / 43 / 6	393
mito	TA / TTA / TAA	80 / 28 / 9	416
mito	(T) <sub>3-5</sub> A / TAA / TA	20 / 19 / 10	272

Tabelle 15: Angaben zu den untersuchten Mikrosatelliten. Römische Zahlen bezeichnen die Chromosomen. mito = mitochondriale DNA.

\* Die Angaben beziehen sich auf die bei der SGD hinterlegten Sequenzen.

Durch die teilweise sehr geringen Längenunterschiede der Mikrosatelliten sind Differenzierungen durch eine Agarose- oder normale Polyacrylamid-Gelelektrophorese innerhalb der Gruppe der untergärigen Hefen zumeist nur sehr unzureichend.

Bei einigen der untersuchten Motive ist eine solche Möglichkeit allerdings dennoch gegeben, wobei hier insbesondere das Motiv auf Chromosom XIII bei den Stämmen BDGH1 bis BDGH7 hervorzuheben ist (siehe Abbildung 36).

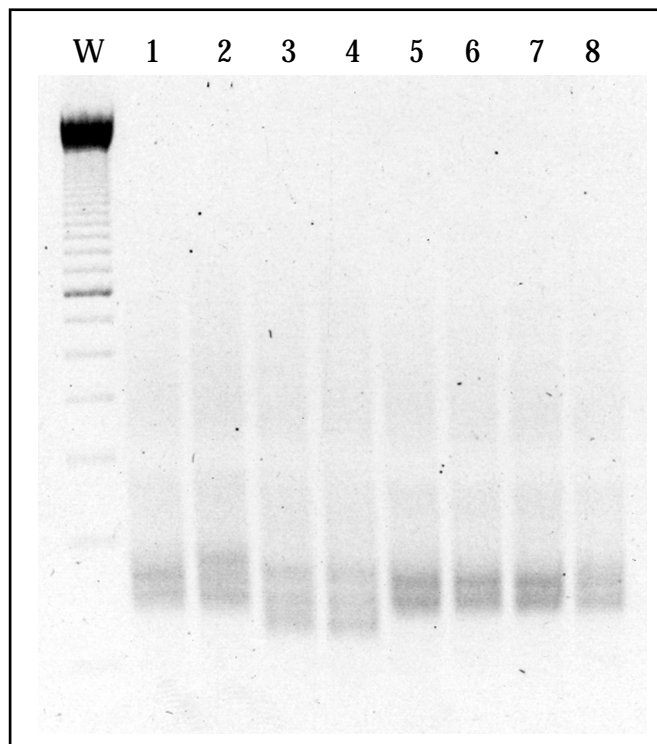


Abbildung 36: Mikrosatelliten-Muster des Motivs chr13-tta bei den Berliner Referenzstämmen in einem 4 %-igen Agarosegel (Elektrophorese: 2 h mit 110 V). W = Größenstandard, 1 = BDGH1, 2 = BDGH2, 3 = BDGH3, 4 = BDGH4, 5 = BDGH5, 6 = BDGH6, 7 = BDGH7, 8 = W34/70.

Die Motive der mitochondrialen DNA ergaben teilweise nur bei sehr geringen Annealing-Temperaturen von unter 50°C und auch nicht bei allen Hefeproben ein PCR Produkt.

So fehlten die DNA-Banden bei den Stämmen VBH9810, VBH9812, VBH9907, VBH9913 und BDGH4 (siehe Abbildung 37). Durch die Schwierigkeiten mit diesen Motiven wurden sie für die weiteren Analysen nicht mehr berücksichtigt.

Eine genaue Untersuchung der Muster gelingt erst durch die Auftrennung der PCR Produkte in einem Polyacrylamid-Sequenziergel, das in der Lage ist, auch Längendifferenzen von nur einer Base aufzutrennen.

Durch diese Analysenmethode war auch eine bessere Beurteilung der Differenzierungsfähigkeit der einzelnen Motive möglich. So tritt bei einigen Motiven nur eine geringe Anzahl von Banden auf, die entsprechend nur eine relativ grobe Differenzierung zulassen. Die Motive, die nur eine geringe Differenzierung erwarten ließen, wurden daher nicht eingehender untersucht (siehe Abbildung 38).

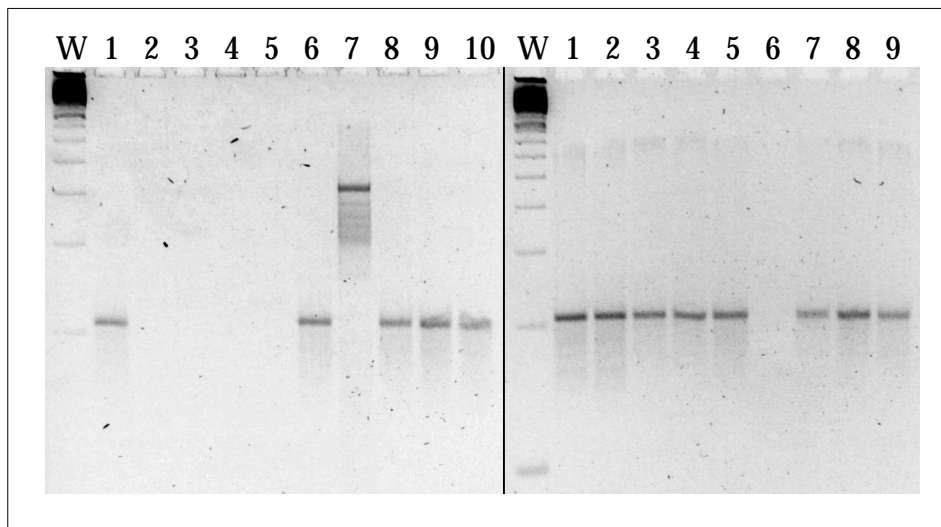


Abbildung 37: Mikrosatelliten-PCR des Motivs mito03 in einem 4 %-igen Agarosegel (Laufbedingungen: 2 h mit 110 V). W = Größenstandard; links: 1 = VBH9901, 2 = VBH9907, 3 = VBH9913, 4 = VBH9810, 5 = VBH9812, 6 = DWV1, 7 = DWV2, 8 = DWV3, 9 = DWV4, 10 = DWV5; rechts: 1 = W34/70, 2 = W66, 3 = BDGH1, 4 = BDGH2, 5 = BDGH3, 6 = BDGH4, 7 = BDGH5, 8 = BDGH6, 9 = BDGH7.

Aufgrund dieser Auswertung wurden umfangreichere Identifizierungsversuche mit vier der Mikrosatelliten-Motive durchgeführt, die im Folgenden genauer betrachtet werden. In allen Fällen waren die Muster bei Kontrollversuchen sehr gut reproduzierbar.

Auch bei den vier genauer untersuchten Motiven waren deutliche Unterschiede in der Differenzierungsfähigkeit erkennbar. Während eines der Motive lediglich in zwei Varianten vorkam, konnten bei anderen deutlich mehr Muster unterschieden werden.

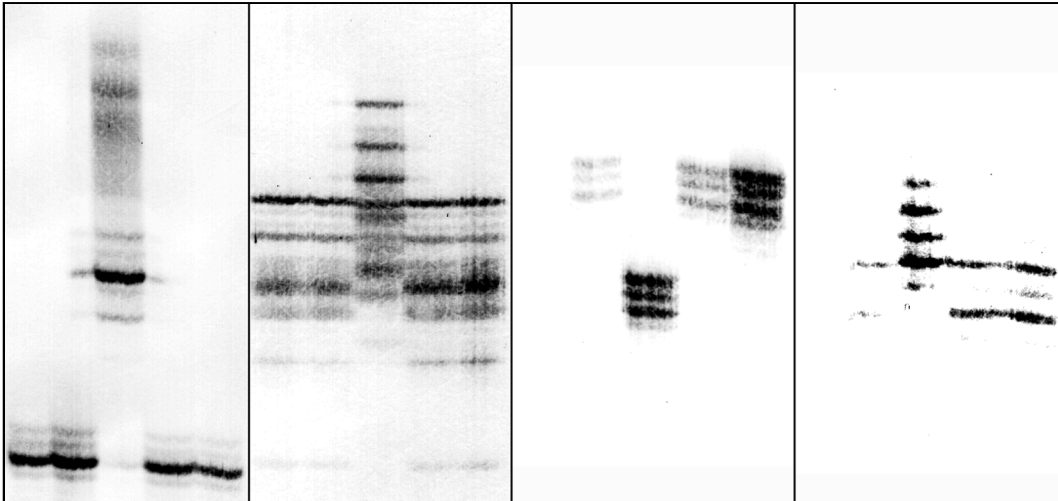


Abbildung 38: Mikrosatelliten-Muster der Motive chr04-ta, chr06-gt, chr08-taa und chr12-ga mit den Proben W34/70, W66, DWV2, DWV3 und DWV4 (v.l.n.r.).

#### 4.2.4.1. Mikrosatelliten-Muster bei ausgewählten Betriebshefe-Isolaten und Referenzstämmen

Es wurden aus den zwölf ursprünglich getesteten Motiven vier ausgesucht, bei denen die PCR zuverlässig verlief und deren Bandenmuster ausreichend komplex war. Dies waren die Motive TA/TG auf Chromosom IV und TTA auf Chromosom VII sowie das Motiv TTA auf Chromosom XIII und schließlich Chromosom XV mit dem sehr komplexen Motiv TAA/TGA/TAG.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden detaillierter erläutert.

## Chromosom IV, Motiv TA/TG

Das zweite der auf Chromosom IV untersuchten Motive ergab ein verhältnismäßig kompaktes Muster aus etwa sechs Banden im Größenbereich von etwa 180 bp, wobei sich aber auch innerhalb der untergärigen Hefen einige charakteristische Unterschiede ergaben. Die obergärige Kontrolle DWV2 zeigte ein deutlich abweichendes Muster. Mit Hilfe dieses Motives ließen sich die 30 untersuchten Stämme in neun Mustergruppen unterteilen (siehe Abbildung 39 und Tabelle 16).

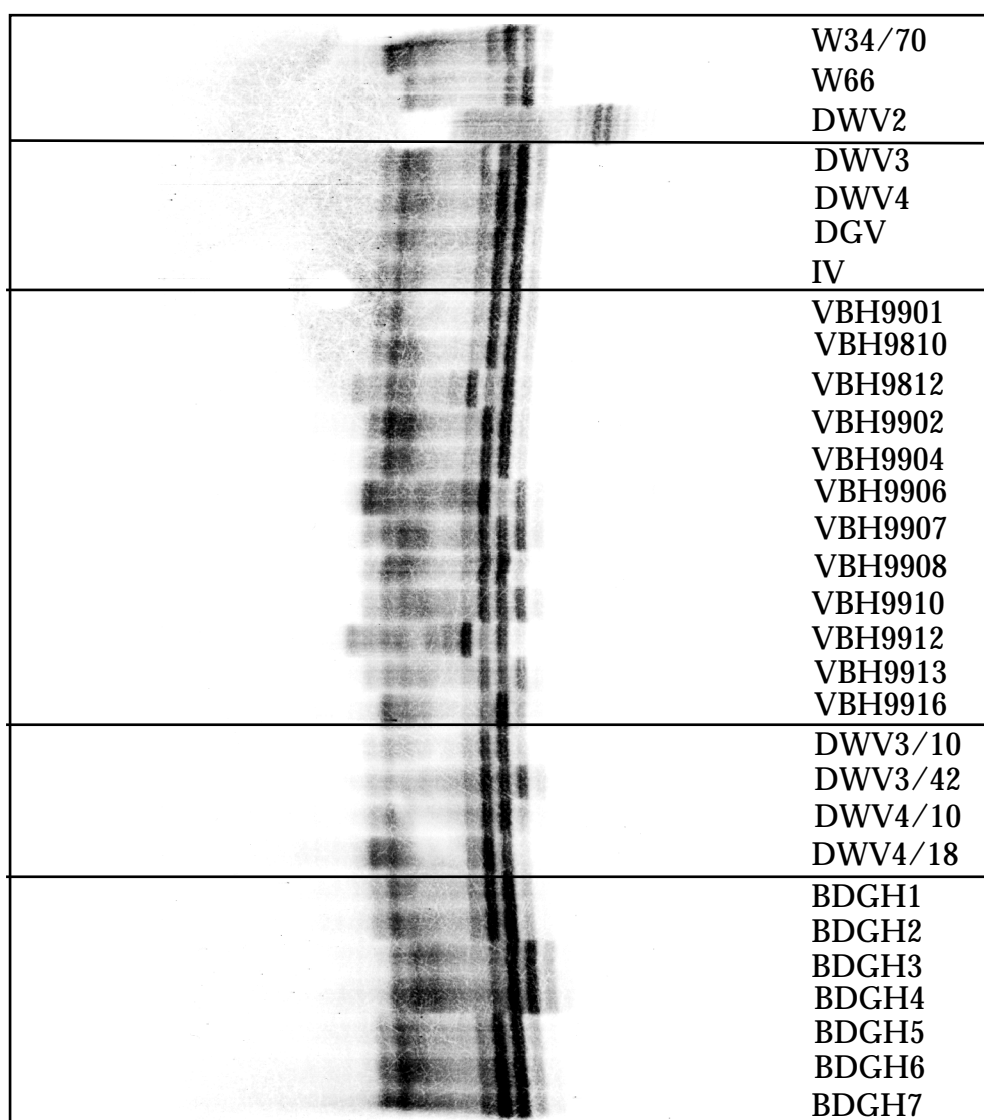


Abbildung 39: Mikrosatelliten-Muster des Motivs chr04-ta.

## Chromosom VII, Motiv TTA

Das Bandenmuster dieses Motivs bestand bei den untergärigen Hefen durchgehend aus maximal acht Banden, die sich in zwei Vierergruppen mit einer Größe von etwa 160 bzw. 180 Basenpaaren aufteilten.

Auffallend war hierbei, daß der einzige Unterschied innerhalb dieser Gruppe in dem kompletten Fehlen der vier größeren Banden bestand und ansonsten keine Unterschiede in Größe und Anzahl der Banden auftraten.

Lediglich die obergärige Kontrollhefe DWV2 zeigte eine Positionsveränderung bei den vier größeren Banden, so daß insgesamt nur drei Mustergruppen unterscheidbar waren (siehe Abbildung 40 und Tabelle 16).

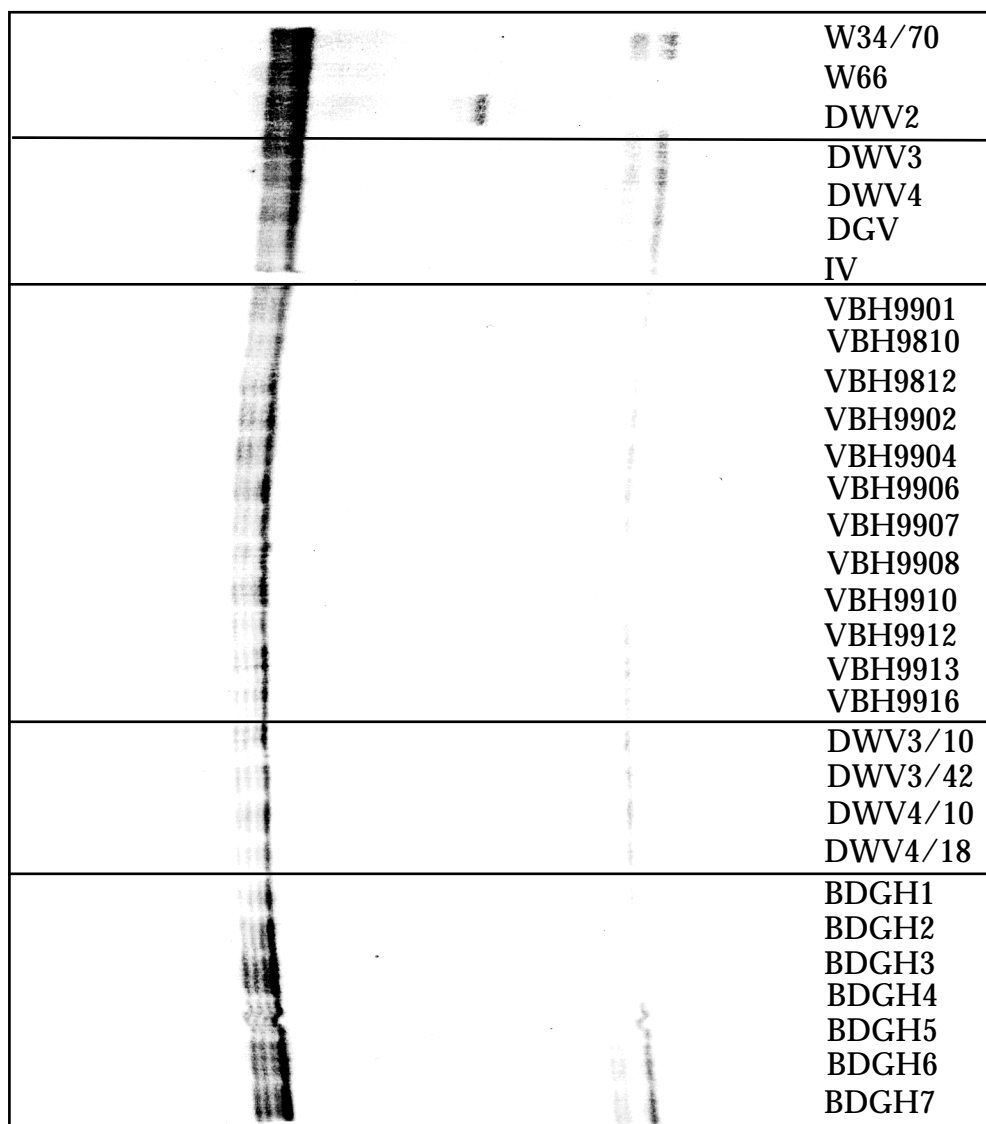


Abbildung 40: Mikrosatelliten-Muster des Motivs chr07-tta.



## Chromosom XIII, Motiv TTA

Das Motiv auf Chromosom XIII ergab ein sehr komplexes Muster aus bis zu neun Banden mit einer Größe von etwa 260 bis 270 Basenpaaren, wodurch zwölf Gruppen bei den 30 Proben differenziert werden konnten. Auch innerhalb der untergärtigen Stämme waren die Unterschiede in den Mustern sehr groß.

Und auch in diesem Fall war das Muster des Referenzstammes DWV2 deutlich anders als alle Muster der untergärtigen Hefen (siehe Abbildung 41 und Tabelle 16). Aufgrund von zum Teil sehr schwachen Banden war dieses Muster allerdings auch schwierig auszuwerten.

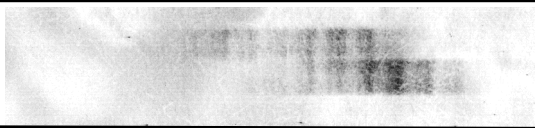
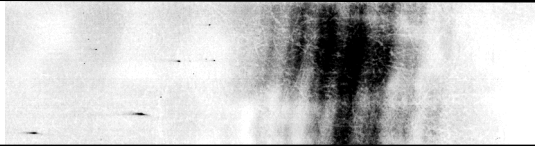
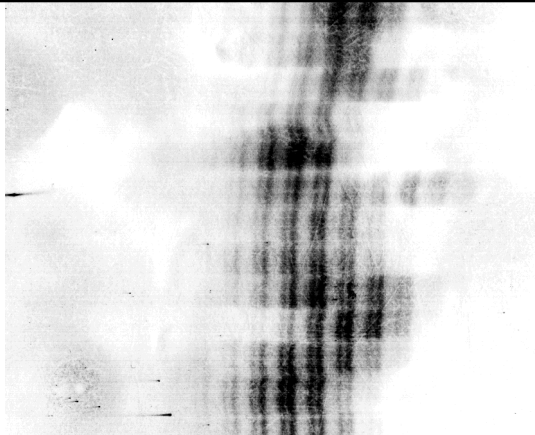
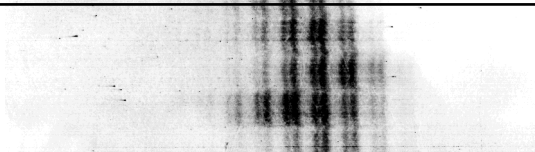
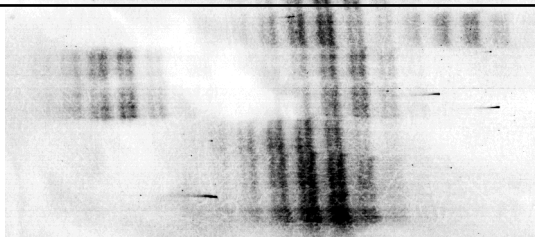
	W34/70 W66 DWV2
	DWV3 DWV4 DGV IV
	VBH9901 VBH9810 VBH9812 VBH9902 VBH9904 VBH9906 VBH9907 VBH9908 VBH9910 VBH9912 VBH9913 VBH9916
	DWV3/10 DWV3/42 DWV4/10 DWV4/18
	BDGH1 BDGH2 BDGH3 BDGH4 BDGH5 BDGH6 BDGH7

Abbildung 41: Mikrosatelliten-Muster des Motivs chr13-tta.

## Chromosom XV, Motiv TAA/TGA/TAG

Das umfangreichste Muster mit bis zu zwölf sehr deutlichen und scharfen Banden im Größenbereich von 300 bis 350 bp erbrachte dieses Motiv. Dabei waren die Unterschiede in etwa ebenso groß wie bei dem Motiv von Chromosom XIII, so daß auch hier eine ähnliche Anzahl von zehn Mustergruppen unterschieden werden konnte.

Wie bei allen anderen Motiven war auch hier die obergärige Hefe DWV2 anhand der großen Unterschiede zu den Mustern der untergärigen Stämme direkt ansprechbar (siehe Abbildung 42 und Tabelle 16).

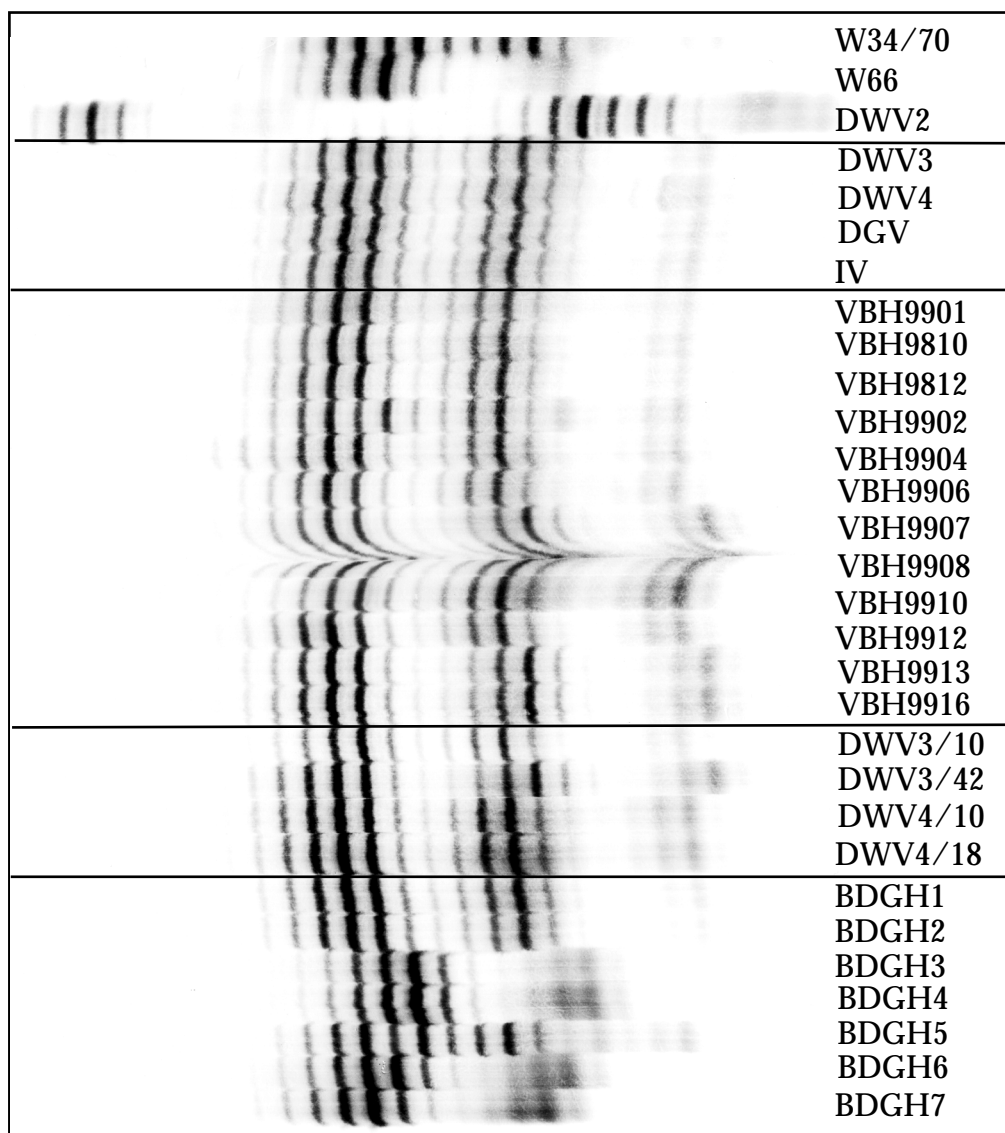


Abbildung 42: Mikrosatelliten-Muster des Motivs chr15-taa.

Bezeichnung	IV	VII	XIII	XV	Gruppe
W34/70	A	A	A	A	1
W66	B	B	B	B	2
DWV2	C	C	C	C	3
DWV3	A	A	D	D	4
DWV4	A	A	D	D	4
DGV	A	A	D	D	4
IV	A	A	D	D	4
VBH9901	D	A	D	D	5
VBH9810	A	A	D	D	4
VBH9812	E	A	E	D	6
VBH9902	A	A	F	E	7
VBH9904	A	A	F	D	8
VBH9906	F	A	G	D	9
VBH9907	G	A	H	F	10
VBH9908	A	A	H	D	11
VBH9910	G	A	D	D	12
VBH9912	E	B	E	D	13
VBH9913	G	A	H	F	10
VBH9916	H	A	F	F	14
DWV3/10	A	A	F	D	8
DWV3/42	G	A	I	F	15
DWV4/10	A	A	I	D	16
DWV4/18	A	A	H	D	11
BDGH1	A	A	J	D	17
BDGH2	A	A	K	D	18
BDGH3	I	B	L	G	19
BDGH4	I	B	L	G	19
BDGH5	A	A	I	H	20
BDGH6	A	A	I	I	21
BDGH7	A	A	I	J	22

Tabelle 16: Auswertung der Mikrosatelliten-Muster von vier Loci in Betriebshefe Isolaten und Referenzstämmen. Jeder Buchstabe bezeichnet ein anderes Bandenmuster. Von dreißig untersuchten Proben konnten anhand der vier Bandenmuster 22 in separate Gruppen aufgeschlüsselt werden.

#### 4.2.4.2. Analyse von Stämmen der Hefebank Weihenstephan

Zur weiteren Kontrolle der bis dahin gewonnenen Ergebnisse und einer generellen Überprüfung der Methode wurden zusätzlich 14 Stämme der Hefebank Weihenstephan analysiert.

Davon waren acht Bruchhefen, drei Staubhefen und drei obergärige Hefen. Die Mikrosatelliten-Analyse mit den vier Motiven ergab eine Unterteilung in 13 Gruppen, wobei nur zwei der obergärigen Stämme eine gemeinsame Gruppe bildeten (siehe Abbildung 43 und 44 sowie Tabelle 17).

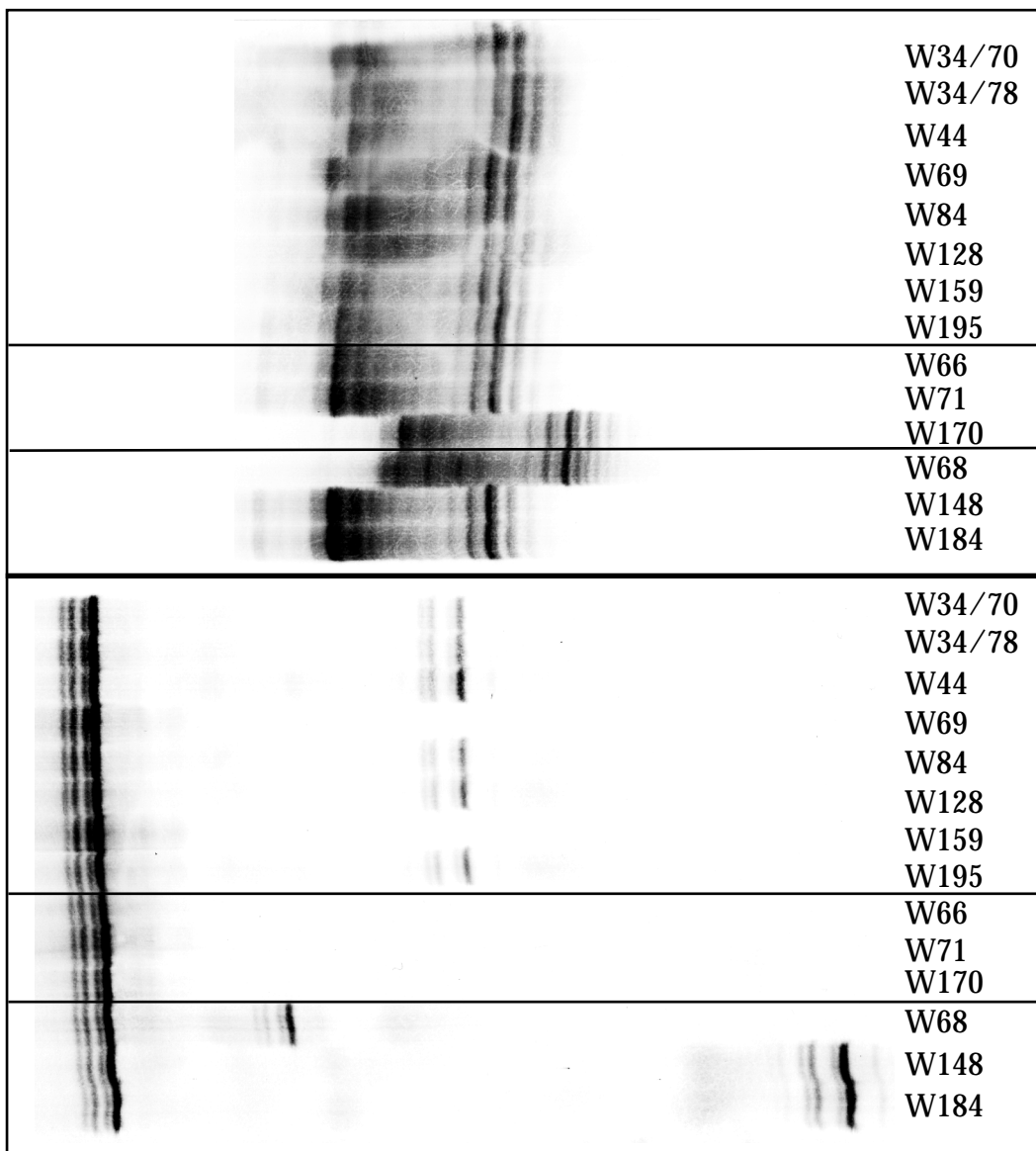


Abbildung 43: Bandenmuster der Mikrosatelliten-Motive von Chromosom IV (oben) und VII (unten).

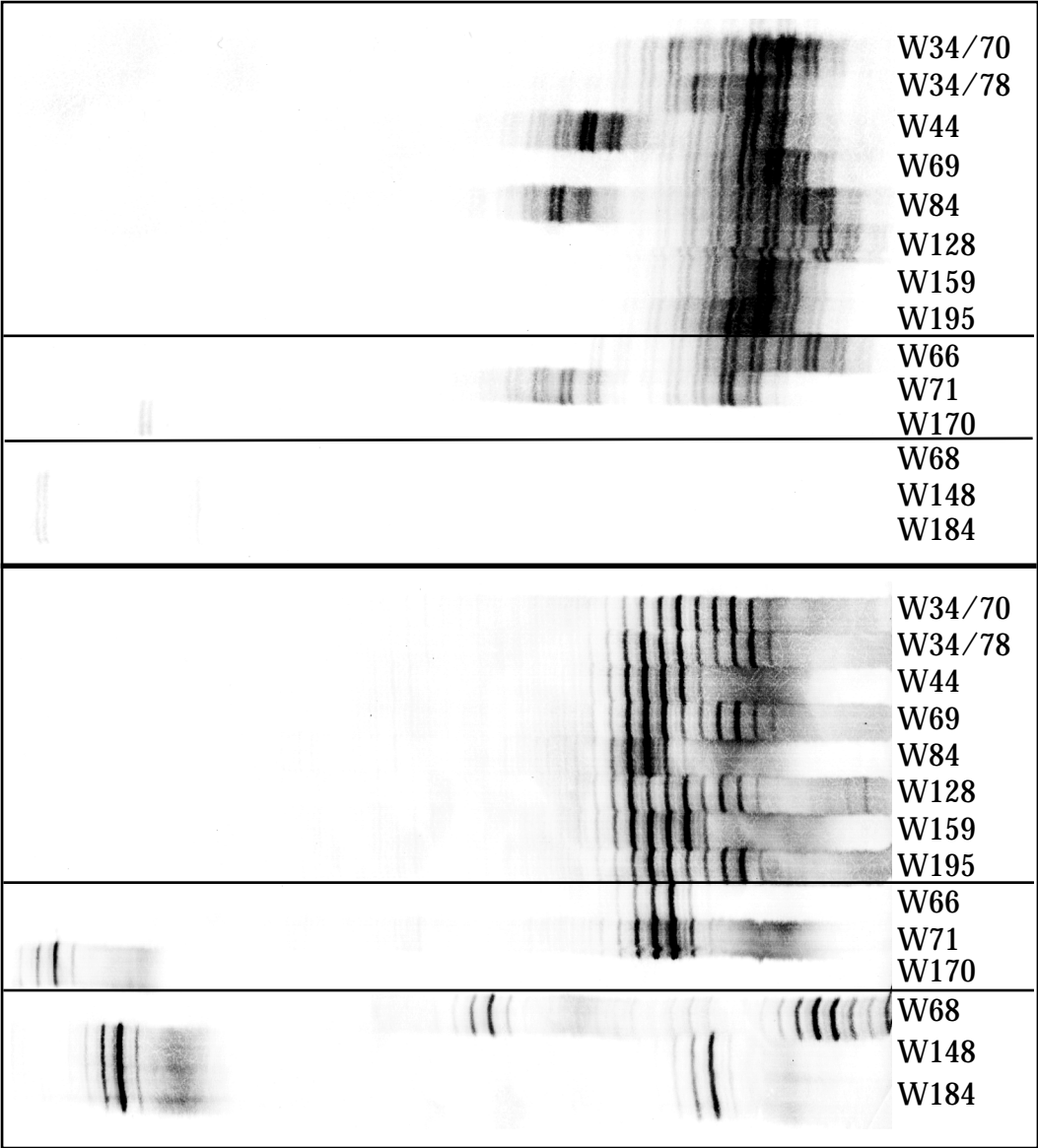


Abbildung 44: Bandenmuster der Mikrosatelliten-Motive von Chromosom XIII (oben) und XV (unten).

Bezeichnung	IV	VII	XIII	XV	Gruppe
34/70	A	A	A	A	1
34/78	B	A	B	A	2
44	C	A	C	B	3
69	A	B	D	A	4
84	A	A	E	C	5
128	D	A	F	D	6
159	A	B	D	B	7
195	C	A	D	D	8
66	C	B	F	B	9
71	C	B	C	B	10
170	E	B	G	E	11
68	E	C	H	F	12
148	C	D	I	G	13
184	C	D	I	G	13

Tabelle 17: Differenzierung von 14 Stämmen der Hefebank Weihenstephan mit vier Mikrosatelliten-Motiven. Eine Differenzierung von 13 Gruppen ist möglich.

#### 4.2.4.3. Analyse von weiteren Betriebshefe-Isolaten

Neben den unter Punkt 4.2.3.1. bereits beschriebenen Betriebshefe-Isolaten wurden weitere 30 Isolate untersucht. Diese bestanden jeweils aus zehn Klonen der Kultur DGV, zehn aus der Kultur IV und zehn aus der Betriebshefe selbst. Die Isolate aus der Betriebshefe wurden als DGH01 bis DGH10 bezeichnet.

Diese Analysen sollten detailliertere Aussagen über die Zusammensetzung der Betriebshefe ermöglichen, die durch die Verschiedenartigkeit der ersten zwanzig Isolate (aus verschiedenen Jahren und mit Originalstämmen) nicht optimal möglich waren. Innerhalb dieser Gruppe ließen sich insgesamt 15 Varianten unterscheiden, fünf davon in den DGV-Isolaten, vier in den IV-Isolaten und weitere sechs in der Betriebshefe (siehe Tabelle 18).

Die Muster waren insgesamt, trotz der gefundenen Unterschiede, sehr gleichmäßig, d.h. sie unterschieden sich meistens lediglich durch das Vorhandensein oder Fehlen einzelner Banden, anders als beispielsweise die Berliner Druckgärhefen BDGH1 bis BDGH7, bei denen durchaus sehr verschiedenartige Muster aufgetreten sind (vgl. Abbildung 42).

Bezeichnung	IV	VII	XIII	XV	Gruppe
DGV01	A	A	A	A	1
DGV02	A	A	A	B	2
DGV03	A	A	A	B	2
DGV04	B	A	A	C	3
DGV05	A	B	A	B	4
DGV06	A	A	B	B	5
DGV07	A	A	B	B	5
DGV08	A	A	B	B	5
DGV09	A	A	B	B	5
DGV10	A	A	-	-	-
IV01	A	A	B	D	6
IV02	A	A	B	B	5
IV03	A	A	B	D	6
IV04	A	A	B	B	5
IV05	A	A	B	B	5
IV06	A	C	C	E	7
IV07	A	A	B	F	8
IV08	A	A	B	F	8
IV09	A	A	B	F	8
IV10	A	A	D	F	9
DGH01	A	A	B	G	10
DGH02	A	A	E	F	11
DGH03	A	A	B	H	12
DGH04	A	A	B	H	12
DGH05	A	A	B	H	12
DGH06	A	A	B	D	6
DGH07	A	A	F	D	13
DGH08	A	A	B	B	5
DGH09	B	A	B	B	14
DGH10	B	A	B	G	15

Tabelle 18: Auswertung der Mikrosatelliten-Muster von vier Loci in Isolaten der Stämme DGV, IV und der Betriebshefe. Jeder Buchstabe bezeichnet ein anderes Bandenmuster. - = kein auswertbares Muster.

#### 4.2.5. Sequenzanalysen

Eine weitere Möglichkeit, Hefestämme zu unterscheiden, ist die direkte Sequenzierung von geeigneten DNA-Abschnitten. Da die Sequenzen der Gene als solche eher konserviert sind, um die Funktionen der Hefezelle aufrecht zu erhalten, sind die Bereiche, die

zwischen codierenden Abschnitten liegen, ein besserer Ansatzpunkt, um durch Sequenzierung nahe miteinander verwandte Organismen unterscheiden zu können. Hierbei werden die sogenannten ITS-Sequenzen (internal transcript spacer) häufig herangezogen, da dort kein Selektionsdruck für eine Beibehaltung der Sequenz sorgt und es daher schneller zu Veränderungen kommen kann.

Diese ITS-Sequenzen liegen zwischen Genen, die die ribosomale RNA codieren und aus diesem Grund hochkonservierte Bereiche darstellen, da deren Funktion unmittelbar mit der Sequenz zusammenhängt. Im Vergleich dazu steht bei "normalen" Genen der Translationsschritt zum Protein zwischen Sequenz und Funktion. Dabei müssen durch Redundanzen nicht alle Sequenzveränderungen zu einem anderen Protein führen. Für die Sequenzierung einiger ausgesuchter Hefen wurden daher zwei dieser "genetischen Abstandhalter" herangezogen, die auf den Chromosomen XIII und XV von *Saccharomyces cerevisiae* lokalisiert sind. In den folgenden Abbildungen 45 und 46 sind die Alignments zu diesen Sequenzierungen zusammengestellt.

---

					↓	
S288C	1	<u>GATTAGAACG</u>	TTTATTCTTA	TTTCTGAGGT	TTTTAATTAG	CAATAAAGAA
DWV2	1	<u>GATTAGAACG</u>	TTTATTCTTA	TTTCTGAGGT	TTTTAATTAG	CAGTAAAGAA
W3470	1	<u>GATTAGAACG</u>	TTTATTCTTA	TTTCTGAGGT	TTTTAATTAG	CAATAAAGAA
W66	1	<u>GATTAGAACG</u>	TTTATTCTTA	TTTCTGAGGT	TTTTAATTAG	CAATAAAGAA
DWV31	1	<u>GATTAGAACG</u>	TTTATTCTTA	TTTCTGAGGT	TTTTAATTAG	CAATAAAGAA
DWV32	1	<u>GATTAGAACG</u>	TTTATTCTTA	TTTCTGAGGT	TTTTAATTAG	CAATAAAGAA
DWV41	1	<u>GATTAGAACG</u>	TTTATTCTTA	TTTCTGAGGT	TTTTAATTAG	CAATAAAGAA
DWV42	1	<u>GATTAGAACG</u>	TTTATTCTTA	TTTCTGAGGT	TTTTAATTAG	CAATAAAGAA
				↓		
S288C	51	GAAAAAACTG	AAAGGAAAAG	TCTAAATAGA	AATACAGTAG	TATTTCTTCA
DWV2	51	GAAAAAACTG	AAAGGAAAAG	TCTAGATAGA	AATACAGTAG	TATTTCTTCA
W3470	51	GAAAAAACTG	AAAGGAAAAG	TCTAGATAGA	AATACAGTAG	TATTTCTTCA
W66	51	GAAAAAACTG	AAAGGAAAAG	TCTAGATAGA	AATACAGTAG	TATTTCTTCA
DWV31	51	GAAAAAACTG	AAAGGAAAAG	TCTAGATAGA	AATACAGTAG	TATTTCTTCA
DWV32	51	GAAAAAACTG	AAAGGAAAAG	TCTAGATAGA	AATACAGTAG	TATTTCTTCA
DWV41	51	GAAAAAACTG	AAAGGAAAAG	TCTAGATAGA	AATACAGTAG	TATTTCTTCA
DWV42	51	GAAAAAACTG	AAAGGAAAAG	TCTAGATAGA	AATACAGTAG	TATTTCTTCA

---

Abbildung 45: Alignment der Sequenzierung auf Chromosom XIII, die Sequenz des Stammes S288C (ATCC Nummer: 204508) stammt aus der *Saccharomyces* Genome Database (SGD) der *Stanford University*. Primersequenzen sind unterstrichen.



---

S288C	101	ATTTCTCTGC	TCTCCTTTCA	TTTACCACAC	CCATTTCAAT	TTTCTTTTTA
DWV2	101	ATTTCTCTGC	TCTCCTTTCA	TTTACCACAC	CCATTTCAAT	TTTCTTTTTA
W3470	101	ATTTCTCTGC	TCTCCTTTCA	TTTACCACAC	CCATTTCAAT	TTTCTTTTTA
W66	101	ATTTCTCTGC	TCTCCTTTCA	TTTACCACAC	CCATTTCAAT	TTTCTTTTTA
DWV31	101	ATTTCTCTGC	TCTCCTTTCA	TTTACCACAC	CCATTTCAAT	TTTCTTTTTA
DWV32	101	ATTTCTCTGC	TCTCCTTTCA	TTTACCACAC	CCATTTCAAT	TTTCTTTTTA
DWV41	101	ATTTCTCTGC	TCTCCTTTCA	TTTACCACAC	CCATTTCAAT	TTTCTTTTTA
DWV42	101	ATTTCTCTGC	TCTCCTTTCA	TTTACCACAC	CCATTTCAAT	TTTCTTTTTA
S288C	151	TTCCATATTT	ATTCAAAGGT	GTTTGTTTCAT	ATGATGATTA	TAACAAAAAC
DWV2	151	TTCCATATTT	ATTCAAAGGT	GTTTGTTTCAT	ATGATGATTA	TAACAAAAAC
W3470	151	TTCCATATTT	ATTCAAAGGT	GTTTGTTTCAT	ATGATGATTA	TAACAAAAAC
W66	151	TTCCATATTT	ATTCAAAGGT	GTTTGTTTCAT	ATGATGATTA	TAACAAAAAC
DWV31	151	TTCCATATTT	ATTCAAAGGT	GTTTGTTTCAT	ATGATGATTA	TAACAAAAAC
DWV32	151	TTCCATATTT	ATTCAAAGGT	GTTTGTTTCAT	ATGATGATTA	TAACAAAAAC
DWV41	151	TTCCATATTT	ATTCAAAGGT	GTTTGTTTCAT	ATGATGATTA	TAACAAAAAC
DWV42	151	TTCCATATTT	ATTCAAAGGT	GTTTGTTTCAT	ATGATGATTA	TAACAAAAAC
S288C	201	<u>AAAAG</u>				
DWV2	201	<u>AAAAG</u>				
W3470	201	<u>AAAAG</u>				
W66	201	<u>AAAAG</u>				
DWV31	201	<u>AAAAG</u>				
DWV32	201	<u>AAAAG</u>				
DWV41	201	<u>AAAAG</u>				
DWV42	201	<u>AAAAG</u>				

---

Abbildung 45: Fortsetzung

---

S288C	1	<u>TGGTGTAATT</u>	TTGCTTCACT	TTTCTGAATT	CAAATGGAAA	TAGAAGTAAA
DWV2	1	<u>TGGTGTAATT</u>	TTGCTTCACT	TTTCTGAATT	CAAATGGAAA	TAGAAGTAAA
W3470	1	<u>TGGTGTAATT</u>	TTGCTTCACT	TTTCTGAATT	CAAATGGAAA	TAGAAGTAAA
W66	1	<u>TGGTGTAATT</u>	TTGCTTCACT	TTTCTGAATT	CAAATGGAAA	TAGAAGTAAA
DWV31	1	<u>TGGTGTAATT</u>	TTGCTTCACT	TTTCTGAATT	CAAATGGAAA	TAGAAGTAAA
DWV32	1	<u>TGGTGTAATT</u>	TTGCTTCACT	TTTCTGAATT	CAAATGGAAA	TAGAAGTAAA
DWV41	1	<u>TGGTGTAATT</u>	TTGCTTCACT	TTTCTGAATT	CAAATGGAAA	TAGAAGTAAA
DWV42	1	<u>TGGTGTAATT</u>	TTGCTTCACT	TTTCTGAATT	CAAATGGAAA	TAGAAGTAAA
S288C	51	AATGGGCAGA	AAAGTTACCT	CATGCTTTAA	ATATACTCAA	CTTTTCTCTA
DWV2	51	AATGGGCAGA	AAAGTTACCT	CATGCTTTAA	ATATACTCAA	CTTTTCTCTA
W3470	51	AATGGGCAGA	AAAGTTACCT	CATGCTTTAA	ATATACTCAA	CTTTTCTCTA
W66	51	AATGGGCAGA	AAAGTTACCT	CATGCTTTAA	ATATACTCAA	CTTTTCTCTA
DWV31	51	AATGGGCAGA	AAAGTTACCT	CATGCTTTAA	ATATACTCAA	CTTTTCTCTA
DWV32	51	AATGGGCAGA	AAAGTTACCT	CATGCTTTAA	ATATACTCAA	CTTTTCTCTA
DWV41	51	AATGGGCAGA	AAAGTTACCT	CATGCTTTAA	ATATACTCAA	CTTTTCTCTA
DWV42	51	AATGGGCAGA	AAAGTTACCT	CATGCTTTAA	ATATACTCAA	CTTTTCTCTA
		↓				
S288C	101	CCGACAGTAG	GAGCCCTAAG	AGATAAAGCG	AAAAATTTTC	ACAGCGCGCT
DWV2	101	CCGACAGTAG	GAGCCCTAAG	AGATAAAGCG	AAAAATTTTC	ACAGCGCGCT
W3470	101	CCGACAGTAG	GAGCCCTAAG	AGATAAAGCG	AAAAATTTTC	ACAGCGCGCT
W66	101	CCGACAGTAG	GAGCCCTAAG	AGATAAAGCG	AAAAATTTTC	ACAGCGCGCT
DWV31	101	CCGACAGTAG	GAGCCCTAAG	AGATAAAGCG	AAAAATTTTC	ACAGCGCGCT
DWV32	101	CCGACAGTAG	GAGCCCTAAG	AGATAAAGCG	AAAAATTTTC	ACAGCGCGCT
DWV41	101	CCGACAGTAG	GAGCCCTAAG	AGATAAAGCG	AAAAATTTTC	ACAGCGCGCT
DWV42	101	CCGACAGTAG	GAGCCCTAAG	AGATAAAGCG	AAAAATTTTC	ACAGCGCGCT
S288C	151	CCTTGGTGCG	GCGAGGGTAT	AAAAGGCGAT	TTCATTTCAA	TTCTTTGAAC
DWV2	151	CCTTGGTGCG	GCGAGGGTAT	AAAAGGCGAT	TTCATTTCAA	TTCTTTGAAC
W3470	151	CCTTGGTGCG	GCGAGGGTAT	AAAAGGCGAT	TTCATTTCAA	TTCTTTGAAC
W66	151	CCTTGGTGCG	GCGAGGGTAT	AAAAGGCGAT	TTCATTTCAA	TTCTTTGAAC
DWV31	151	CCTTGGTGCG	GCGAGGGTAT	AAAAGGCGAT	TTCATTTCAA	TTCTTTGAAC
DWV32	151	CCTTGGTGCG	GCGAGGGTAT	AAAAGGCGAT	TTCATTTCAA	TTCTTTGAAC
DWV41	151	CCTTGGTGCG	GCGAGGGTAT	AAAAGGCGAT	TTCATTTCAA	TTCTTTGAAC
DWV42	151	CCTTGGTGCG	GCGAGGGTAT	AAAAGGCGAT	TTCATTTCAA	TTCTTTGAAC

---

Abbildung 46: Alignment der Sequenzierung auf Chromosom XV, die Sequenz des Stammes S288C (ATCC Nummer: 204508) stammt aus der *Saccharomyces* Genome Database (SGD) der *Stanford University*. Primersequenzen sind unterstrichen.

---

↓

S288C	201	TTACTTCATT	TGCAGGATCC	TTCAGGATAA	GAAAACCATC	ATTCAATAAA
DWV2	201	TTACTTCATT	TGCAGGATCC	TTCAGGATAA	GAAAACCATC	ATTCAATAAA
W3470	201	TTACTTCATT	TGCAGGACCC	TTCAGGATAA	GAAAACCATC	ATTCAATAAA
W66	201	TTACTTCATT	TGCAGGACCC	TTCAGGATAA	GAAAACCATC	ATTCAATAAA
DWV31	201	TTACTTCATT	TGCAGGACCC	TTCAGGATAA	GAAAACCATC	ATTCAATAAA
DWV32	201	TTACTTCATT	TGCAGGACCC	TTCAGGATAA	GAAAACCATC	ATTCAATAAA
DWV41	201	TTACTTCATT	TGCAGGACCC	TTCAGGATAA	GAAAACCATC	ATTCAATAAA
DWV42	201	TTACTTCATT	TGCAGGACCC	TTCAGGATAA	GAAAACCATC	ATTCAATAAA

S288C	251	<u>CTGATCTTCC</u>	<u>GGATTA</u>
DWV2	251	<u>CTGATCTTCC</u>	<u>GGATTA</u>
W3470	251	<u>CTGATCTTCC</u>	<u>GGATTA</u>
W66	251	<u>CTGATCTTCC</u>	<u>GGATTA</u>
DWV31	251	<u>CTGATCTTCC</u>	<u>GGATTA</u>
DWV32	251	<u>CTGATCTTCC</u>	<u>GGATTA</u>
DWV41	251	<u>CTGATCTTCC</u>	<u>GGATTA</u>
DWV42	251	<u>CTGATCTTCC</u>	<u>GGATTA</u>

---

Abbildung 46: Fortsetzung

In den gesamten untersuchten Sequenzen ergaben sich nur sehr wenige Unterschiede. Im Alignment von Chromosom XIII erkennt man zwei Sequenzabweichungen. Eine charakterisiert die obergärige Kontrolle DWV2 an Position 43, die andere kennzeichnet die Sequenz der Referenz der SGD, Stamm S288C, und liegt an Position 75. Abgesehen von diesen beiden Basenaustauschen sind die Sequenzen von Chromosom XIII identisch.

Das Alignment der Sequenz von Chromosom XV zeigt anhand von zwei Veränderungen an den Positionen 105 und 218 eine Differenzierung zwischen den untergärigen Stämmen und der obergärigen Referenz DWV2 sowie der SGD-Sequenz. Insgesamt ist es durch diese Sequenzierung also möglich, drei Gruppen von Hefestämmen zu definieren, wobei der Referenzstamm S288C, dessen Sequenz in der SGD abgelegt ist, der obergärige Kontrollstamm DWV2 und die untergärigen Stämme jeweils eine Gruppe bilden. Durch die zusätzlichen Sequenzabweichungen bei Chromosom XV kann man zudem sagen, daß die untergärigen Stämme genetisch weiter von den beiden anderen Stämmen abweichen als diese untereinander.

#### 4.2.6. Hefedifferenzierung mit der AFLP

Bei der Amplified Fragment Length Polymorphism-Methode wird die genomische DNA zunächst mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten (in diesem Fall *EcoRI* und *MseI*), wobei eines häufig schneidet (*MseI* hat eine vier Basen lange Erkennungssequenz) und das andere seltener (*EcoRI* erkennt ein Motiv aus sechs Basen). Der nächste Schritt besteht darin, die Fragmente mit sogenannten Adaptoren zu versehen, kurzen Abschnitten doppelsträngiger DNA, die genau an die Restriktionsschnittstellen passen.

Diese werden mittels einer Ligase kovalent an die Fragmente gebunden. In einer anschließenden PCR, bei denen die Primer sich an die Adapter anlagern, werden nur die Fragmente amplifiziert, die zwischen einer *EcoRI*- und einer *MseI*-Erkennungssequenz liegen. Aus dieser Grundmenge werden in einer zweiten, spezifischen PCR nur eine Auswahl von Fragmenten amplifiziert. Dies geschieht durch den Einsatz von selektiven Primern, die durch ein bis drei zusätzliche Nukleotide verlängert sind.

Je nach Genomgröße wählt man mehr oder weniger dieser zusätzlichen Nukleotide. Für die Analyse des Hefegenoms haben sich drei selektive Nukleotide (eines am *EcoRI*-Primer, zwei am *MseI*-Primer) als geeignet erwiesen. Für den *MseI* Primer wurden die Nukleotidkombinationen -A/N und -G/N verwendet.

##### 4.2.6.1. Analyse ausgewählter Betriebshefeisolate und Referenzstämme

Zunächst wurde mit dieser Methode eine Auswahl der Betriebshefe-Isolate und die Stämme der Firma *Doemens* zusammen mit einigen Referenzstämmen analysiert. Die Auswertung der sehr umfangreichen AFLP-Muster von 32 verschiedenen Primerkombinationen ergab eine sehr deutliche Unterscheidung des obergärigen Kontrollstammes DWV2 von den untergärigen Stämmen. Innerhalb dieser waren die Referenzen W34/70 und W66 sowohl untereinander als auch zu den Betriebshefe-Isolaten deutlich abzugrenzen (siehe Tabelle 19).

Die Betriebshefe-Isolate zeigten untereinander in den meisten Fällen ein sehr homogenes Bild, lediglich bei einigen Kombinationen mit dem *EcoRI*+C-Primer waren einige Unterschiede zu erkennen, so daß zunächst neben den drei Referenzen vier Gruppen innerhalb der Betriebshefe unterschieden werden konnten (siehe Tabelle 19). Allerdings beziehen sich die Unterschiede innerhalb der Betriebshefe auf lediglich vier Primerkombinationen (siehe Abbildung 47). Die vollständigen Bandenmuster sind im Anhang unter Punkt 8.2. dargestellt.

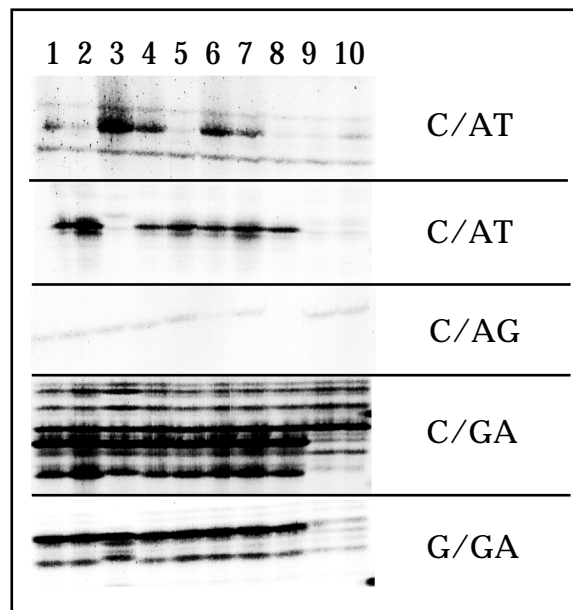


Abbildung 47: Musterunterschiede innerhalb der Betriebshefen bei der AFLP-Analyse mit 32 Primerkombinationen. Rechts sind die Kombinationen der EcoRI/MseI-Primer angegeben. 1 = W34/70, 2 = W66, 3 = DWV2, 4 = DWV3, 5 = DWV4, 6 = DGV, 7 = IV, 8 = VBH9901, 9 = VBH9810, 10 = VBH9812.

#### 4.2.6.2. Kontrolle der AFLP durch Analyse von Hefebank-Stämmen

Um die Differenzierungsmöglichkeiten der AFLP innerhalb der Brauhefen besser einschätzen zu können, wurden neben den Referenzen W34/70 und W66 noch zwölf weitere Stämme der Hefebank Weihenstephan untersucht.

Bei diesen Analysen wurden vierzehn Primerkombinationen verwendet, die bei der ersten Versuchsserie (siehe Punkt 4.2.6.1.) bereits ein gut auswertbares Muster mit sehr vielen Unterschieden produziert haben.

Von diesen Hefen waren acht untergärige Bruchhefen (W34/70, W34/78, W44, W69, W84, W128, W159 und W195), drei untergärige Staubhefen (W66, W71 und W170) und drei obergärige Hefen (W68, W148 und W184), davon eine Weißbierhefe (W68).

Stamm	34/70	66	DWV2	DWV3	DWV4	DGV	IV	VBH 9901	VBH 9810	VBH 9812
A/AA	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
A/AC	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
A/AG	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
A/AT	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
A/GA	A	B	C	A	A	A	A	A	A	A
A/GC	A	B	C	D	D	D	D	D	D	D
A/GG	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
A/GT	A	B	C	B	B	B	B	B	B	B
C/AA	A	B	C	D	D	D	D	D	D	D
C/AC	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
C/AG	A	A	B	A	A	A	A	C	A	A
C/AT	A	A	B	A	C	A	A	C	D	D
C/GA	A	A	B	A	A	A	A	A	C	C
C/GC	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
C/GG	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
C/GT	A	B	C	D	D	D	D	D	D	D
G/AA	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
G/AC	A	B	C	A	A	A	A	A	A	A
G/AG	A	B	C	D	D	D	D	D	D	D
G/AT	A	B	C	A	A	A	A	A	A	A
G/GA	A	B	C	A	A	A	A	A	D	D
G/GC	A	B	C	B	B	B	B	B	B	B
G/GG	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
G/GT	A	B	C	A	A	A	A	A	A	A
T/AA	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
T/AC	A	B	C	B	B	B	B	B	B	B
T/AG	A	B	C	A	A	A	A	A	A	A
T/AT	A	B	C	A	A	A	A	A	A	A
T/GA	A	B	C	A	A	A	A	A	A	A
T/GC	A	B	C	D	D	D	D	D	D	D
T/GG	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
T/GT	A	B	C	A	A	A	A	A	A	A
Gruppe	1	2	3	4	5	4	4	6	7	7

Tabelle 19: Die Musteraufschlüsselung der AFLP-Analyse von Betriebshefe-Isolaten und Referenzen ergibt insgesamt sieben Mustergruppen. Jedem neuen Muster innerhalb einer Primerkombination wurde dabei ein neuer Buchstabe zugeordnet.

Mit der AFLP konnten alle untergärigen Hefen voneinander unterschieden werden, bei den obergärigen Stämmen waren zwei (W148 und W184) absolut identisch (siehe Tabelle 20). Die vollständigen Bandenmuster sind im Anhang unter Punkt 8.2. dargestellt.

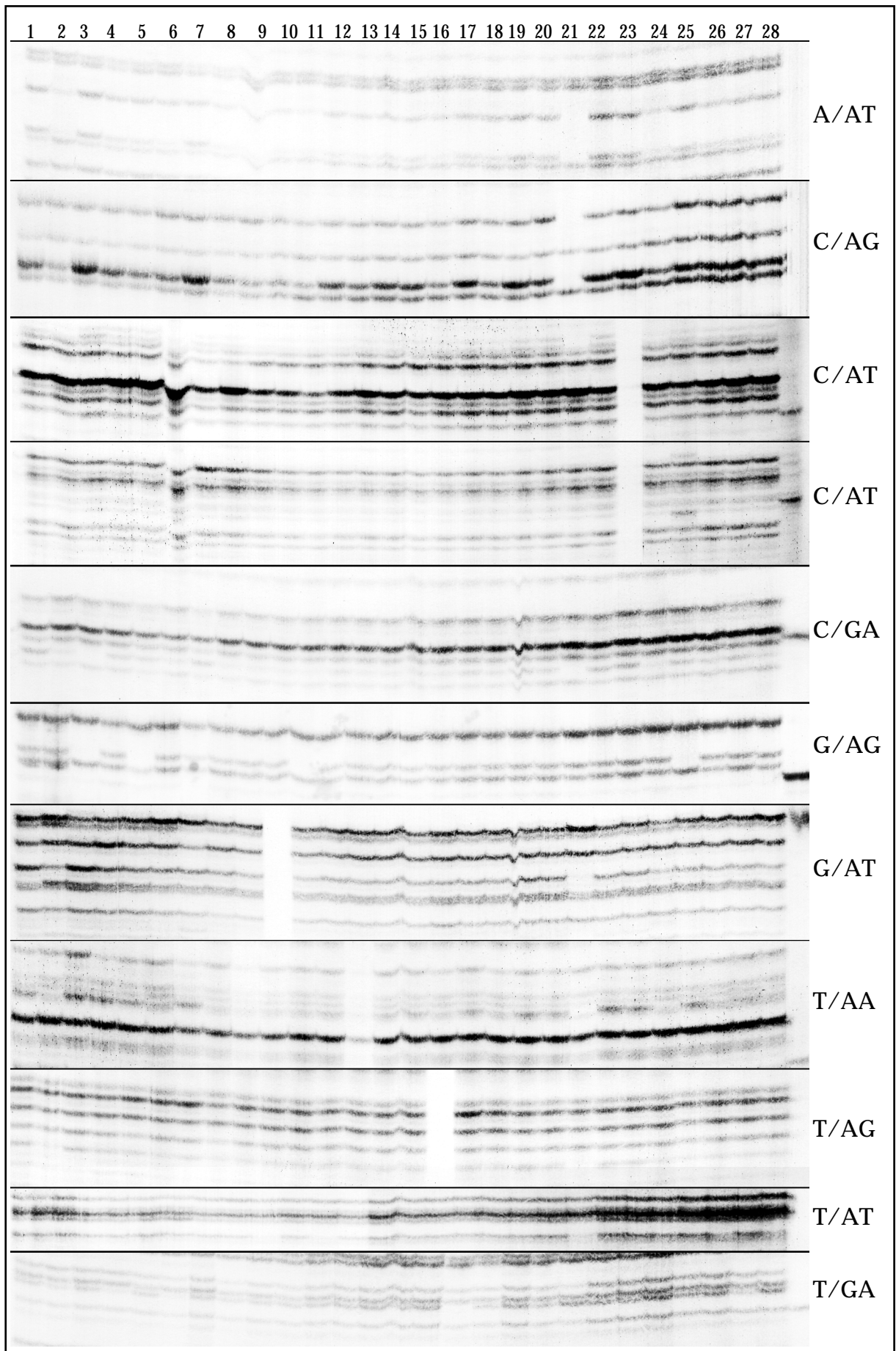
Stamm	34/70	34/78	44	69	84	128	159	195	66	71	170	68	148	184
A/AG	A	A	B	C	A	-	A	A	A	-	D	E	F	F
A/AT	A	B	A	A	A	A	A	A	A	C	D	E	F	F
A/CG	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	B	C	D	D
A/GT	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	C	D	D
C/AG	A	B	A	A	A	A	A	B	A	B	C	D	E	E
C/AT	A	B	C	D	B	B	B	D	-	E	F	G	H	H
C/GA	A	B	C	A	-	A	A	D	A	E	F	G	H	H
G/AG	A	A	B	A	B	A	A	A	B	B	C	D	E	E
G/AT	A	B	C	A	A	C	A	A	A	D	E	F	G	G
G/GT	A	-	B	A	A	A	A	A	C	D	E	F	G	G
T/AA	A	B	C	A	A	D	A	B	A	A	E	F	G	G
T/AG	A	A	B	A	A	A	A	C	A	D	E	F	G	G
T/AT	A	A	B	-	A	A	A	A	A	C	D	E	F	F
T/GA	A	B	A	A	A	A	A	A	A	C	D	E	F	F
Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	13

Tabelle 20: Die AFLP-Muster von 14 Stämmen der Hefebank Weihenstephan erlauben eine Aufgliederung in 13 Mustergruppen. Jedem neuen Muster innerhalb einer Primerkombination wurde dabei ein neuer Buchstabe zugeordnet. - = nicht auswertbares Muster.

#### 4.2.6.3. Analyse von weiteren Betriebshefe-Isolaten

Um einen besseren Einblick in die Beschaffenheit der Betriebshefe zu bekommen, wurden zwanzig Isolate (bezeichnet mit VBH0101 bis VBH0120) neu aus der Betriebshefe vereinzelt und analysiert, wobei zwölf verschiedene Primerkombinationen zum Einsatz kamen. Parallel dazu wurden die acht Bruchhefen der Hefebank Weihenstephan erneut getestet, um die Reproduzierbarkeit der Methode beurteilen zu können und einen direkten Vergleich mit den Betriebshefe-Isolaten zu bekommen.

Abbildung 48 (Seite 94): AFLP-Musterunterschiede bei untergärigen Kontrollstämmen (Nr. 1 bis 8) und zwanzig Betriebshefe-Isolaten (Nr. 9 bis 28). Auf der rechten Seite sind die entsprechenden Primerkombinationen angegeben. Die Reihenfolge der Proben entspricht der in Tabelle 21.





Stamm	A/AG	A/AT	C/AG	C/AT	C/GA	G/AG	G/AT	G/GT	T/AA	T/AG	T/AT	T/GA	Gruppe
W34/70	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	1
W34/78	B	B	A	B	B	A	B	B	A	A	A	A	2
W44	C	C	A	C	C	B	A	C	B	B	A	A	3
W69	D	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	4
W84	C	A	A	C	A	B	A	A	A	A	A	A	5
W128	C	A	A	C	D	A	A	A	C	A	A	A	6
W159	D	A	A	C	A	C	C	A	D	A	A	B	7
W195	C	A	A	C	A	A	A	A	A	C	A	A	8
VBH0101	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
VBH0102	C	A	A	D	A	A	-	A	C	A	B	A	10
VBH0103	C	A	A	D	A	D	A	A	C	A	A	A	11
VBH0104	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	B	A	10
VBH0105	C	A	A	D	A	A	A	A	-	A	A	A	9
VBH0106	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
VBH0107	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
VBH0108	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
VBH0109	C	A	A	D	E	A	D	A	C	A	A	B	12
VBH0110	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
VBH0111	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
VBH0112	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
VBH0113	-	D	B	E	F	A	E	A	E	D	C	C	13
VBH0114	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
VBH0115	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
VBH0116	C	A	A	D	F	A	A	A	C	A	A	A	14
VBH0117	-	A	A	F	A	D	A	A	C	A	A	A	15
VBH0118	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
VBH0119	C	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
VBH0120	-	A	A	D	A	A	A	A	C	A	A	A	9
Muster	3	4	2	6	6	4	5	3	5	4	3	3	48

Tabelle 21: Die Musteraufschlüsselung der AFLP-Analyse von zwanzig Betriebshefe Isolaten und acht Referenzen ergibt insgesamt 15 Mustergruppen. Jedem neuen Muster innerhalb einer Primerkombination wurde dabei ein neuer Buchstabe zugeordnet. - = nicht auswertbares Muster.

Insgesamt konnte die Unterscheidung der acht Bruchhefen aus dem ersten Versuch (vgl. Punkt 4.2.6.2.) bestätigt werden, wenn auch die Muster nicht vollständig miteinander übereinstimmten und manche der anfangs zur Unterscheidung geeigneten Banden nicht wieder aufgetreten sind (siehe Abbildung 48 und Tabelle 21).

Bei den Betriebshefe-Isolaten VBH0101 bis VBH0120 zeigten sich sieben verschiedene Mustergruppen, wobei der vorherrschende Typus (Muster 9) etwa zwei Drittel (13 Proben) der Hefen ausmachte. Ein Typ (Muster 10) war mit zwei Proben detektierbar, der Rest (Muster 11 bis 15) mit je einer Probe (siehe Tabelle 21).

Die Muster 10, 11 und 14 unterschieden sich dabei nur sehr wenig vom Muster 9, während die übrigen drei Typen größere Differenzen zum vorherrschenden Muster aufwiesen. Die vollständigen Bandenmuster sind im Anhang unter Punkt 8.2. dargestellt.

## 5. Diskussion

Die Qualität eines Bieres hängt, neben vielen anderen Faktoren, wesentlich von der in der Gärung eingesetzten Hefe ab (Donhauser 1995). Vor allem im Hinblick auf die Sicherung einer gleichbleibend hohen Qualität ist es im Interesse der Brauerei, den eingesetzten Hefestamm identifizieren und charakterisieren zu können. Während die physiologische Charakterisierung von Brauhefen schon seit längerer Zeit durch verschiedene Methoden möglich ist, war eine eindeutige Stammdifferenzierung auf der Basis genetischer Eigenschaften, insbesondere bei den sehr einheitlichen untergärigen Hefen, bisher nur schwer erreichbar.

Neben einer Analyse der wichtigsten physiologischen Eigenschaften einer Betriebshefe wurde im Rahmen dieser Arbeit auch nach einer zuverlässigen Methode gesucht, Hefestämme auf der Basis ihrer genetischen Konstitution eindeutig bestimmen zu können. Hier stand insbesondere die Frage im Raum, aus wie vielen Stämmen sich die in der betrachteten Brauerei verwendete Hefe tatsächlich zusammensetzt und wie sie sich unterscheiden lassen. Um diese Fragen beantworten zu können, wurden mehrere Isolate aus der Betriebshefe zusammen mit einer Reihe von Referenzstämmen sowohl physiologisch als auch genetisch analysiert.

### 5.1. Physiologische Charakterisierung

Zunächst wurden die physiologischen Eigenschaften von zwei Isolaten aus der Betriebshefe (VBH9810 und VBH9812) im Vergleich zu zwei Referenzstämmen aus der Hefebank Weihenstephan untersucht. Dabei lag der Analysenschwerpunkt auf der Bestimmung von Gärungsnebenprodukten, da aufgrund eines dafür zur Verfügung stehenden Headspace-Gaschromatographen eine Vielzahl von Substanzen parallel analysiert werden konnte (Mändl *et al.* 1974, Mändl *et al.* 1975, Narziß *et al.* 1982). Daneben wurden die Entwicklung der Zellzahl, weitere Wachstumsparameter und der Verlauf des pH-Wertes in einer Reihe von Probevergärungen untersucht.

Als Ergebnis dieser Analysen zeigten sich zwischen den beiden Isolaten einige deutliche Abweichungen bei den Gärungseigenschaften, während die Parameter Hefezellzahl, Lebendzellanteil und mittleres Zellvolumen im Verlauf einer Gärung sehr weit übereinstimmten. Noch größer waren allerdings die Unterschiede im Vergleich zu den als Referenzen mitgetesteten Stämmen W34/70 und W66 der Hefebank Weihenstephan. So war zunächst die pH-Absenkung stärker als bei den beiden Kontrollstämmen, wobei VBH9810 die größte pH-Absenkung verursachte. Bei den Gärungsnebenprodukten zeigte sich ein sehr vielfältiges Bild.

Die Betriebshefen produzierten unter den gewählten Bedingungen größere Mengen von 1-Propanol, 2-Methyl-1-propanol, 2,3-Butandion (Diacetyl) und 2,3-Pentandion als die Vergleichshefen. Umgekehrt war die Situation bei den Substanzen Ethylacetat, 2-Methyl-1-butanol, Ethylbutyrat, Ethylhexanoat und Isoamylacetat. Kaum Unterschiede oder indifferentes Verhalten hingegen war beim Acetaldehyd, Ethylpropionat und 3-Methyl-1-butanol zu beobachten. Auch zwischen den beiden Isolaten waren teilweise größere Abweichungen zu verzeichnen, die über die festgestellten Schwankungen bei den dreifach durchgeführten Analysen hinausgingen. Beispiele hierfür sind das 1-Propanol, Ethylhexanoat und Pentandion. Tabelle 22 zeigt eine Übersicht der Gärungsprofile in Relation zum Stamm W34/70.

Parameter	W34/70	W66	VBH9810	VBH9812
pH-Absenkung	o	o	++	+
1-Propanol	o	o	++	+
2-Methyl-1-propanol	o	o	++	++
2-Methyl-1-butanol	o	o	--	-
3-Methyl-1-butanol	o	o	o	o
Ethylacetat	o	o	--	--
Ethylpropionat	o	o	+	-
Ethylbutyrat	o	+	--	--
Ethylhexanoat	o	+	--	-
Isoamylacetat	o	o	--	--
Isobutylacetat	o	o	--	-
2,3-Butandion	o	o	++	++
2,3-Pentandion	o	o	++	+
Acetaldehyd	o	o	o	o

Tabelle 22: Profile der pH-Veränderung und der Gärungsnebenprodukte (halbquantitative Auswertung) relativ zu W34/70 als Referenz. o = Referenzwert (W34/70), + = mehr, ++ = viel mehr, - = weniger, -- = viel weniger

Insgesamt setzen sich die beiden Betriebshefe-Isolate deutlich von den Referenzstämmen W34/70 und W66 ab. Die Abweichungen der beiden Isolate untereinander sind im Verhältnis dazu geringer. So kann man insgesamt von einem, im Vergleich zu den eingesetzten Kontrollen, eigenständigen Profil von Gärungsnebenprodukten sprechen,

das die Betriebshefe auszeichnet. Hinzu kommt noch die verhältnismäßig starke pH-Absenkung, die die Betriebshefe verursacht. Es zeigte sich bei diesen Untersuchungen aber auch, daß die Schwankungen der gebildeten Substanzmengen teilweise sehr groß sind. Dies tritt insbesondere dann auf, wenn es sich um nur im Spurenbereich vorhandene Stoffe handelt, wie z.B. Dimethylsulfid und Isobutylacetat. Doch auch der sehr hohe Gehalt an vicinalen Diketonen zeigte größere Abweichungen in den Mehrfachbestimmungen.

In diesen Fällen war teilweise kaum eine Entwicklung in der Konzentration über den Verlauf der Gärung auszumachen, so daß eine Interpretation dieser Ergebnisse hinsichtlich der Charakteristik des Stammes nicht sinnvoll ist. Denn während der Einfluß des Hefestammes auf die Zusammensetzung und Menge der Gärungsnebenprodukte unbestritten ist (Wellhoener 1966, Mändl *et al.* 1974, Geiger und Piendl 1975, Geiger und Piendl 1976, Narziß *et al.* 1983a, Narziß *et al.* 1983b, Narziß *et al.* 1984), zeigen sich auch viele andere Einflußgrößen. Dazu gehören Parameter wie Temperatur und Druck (Miedaner *et al.* 1974), der Rohstoff Gerste (Narziß und Miedaner 1970a) und dessen Verarbeitung (Narziß und Miedaner 1970b), was sich wesentlich auf die Zusammensetzung der Würze auswirkt. Die Belüftung und die Menge der Hefegabe (Mändl *et al.* 1974, Anderson und Kirsop 1975a, Anderson und Kirsop 1975b, Geiger und Piendl 1975, Geiger und Piendl 1976) beeinflussen die Gärungsnebenprodukte ebenfalls. Bei Versuchen mit Pilotanlagen konnte zudem eine Beeinflussung durch das Rühren der Würze festgestellt werden (Sendra *et al.* 1994).

Durch Untersuchungen von Äyräpää (1968) konnte gezeigt werden, daß die Bildung von höheren Alkoholen durch verschiedene Hefestämme von der Verfügbarkeit von Aminosäuren im Medium abhängig ist. In zweiter Linie waren Temperatureinflüsse, insbesondere bei Stickstofflimitierung, zu beobachten (Äyräpää 1970). So spielt vor allem die Würze als Wachstumsmedium eine sehr wesentliche Rolle, denn dieses Medium hat keine definierte Zusammensetzung, sondern variiert stark, abhängig von den Rohstoffen, dem Sudverfahren und natürlich der jeweiligen Rezeptur einer Brauerei. Insbesondere der Gehalt an Spurenelementen wie Zink und Mangan (Wagner *et al.* 1983, McLaren *et al.* 1999) hat einen sehr starken Einfluß auf das Wachstum der Hefe.

Daher kann man die physiologischen Eigenschaften eines Hefestammes nicht generalisieren, sondern kann sie nur vor dem Hintergrund der gewählten Bedingungen interpretieren und daraus gewisse Tendenzen ableiten. Ein standardisiertes System zur Charakterisierung der Gärungseigenschaften von Hefestämmen müßte daher neben festgelegten physikalischen Parametern und der Form und Größe der Gefäße auch auf ei-

nem definierten, sprich künstlichen Medium aufbauen, was aber wiederum die Besonderheiten der Würze unberücksichtigt läßt.

Aber auch ein definiertes Modellsystem kann beim Vergleich verschiedener Hefen keine allgemeingültigen Aussagen erbringen, da die Gärverfahren in den Brauereien wiederum völlig andere Bedingungen für die Hefen schaffen, die sich natürlich sehr unterschiedlich auf deren Gärungsverhalten auswirken würden. Durch diese Problematik werden wahrscheinlich immer nur begrenzte, auf einer bestimmten Fragestellung basierende Analysen möglich sein.

Andere Eigenschaften der Hefe sind dennoch auch allgemeingültiger zu erfassen. Zu diesen Eigenschaften gehört die Fähigkeit der Hefe, sich am Ende der Gärung zu Flocken zusammenzuschließen und auf den Boden des Gärgefäßes abzusinken, die sogenannte Bruchbildung oder Flockulation (Helm *et al.* 1952, González *et al.* 1996, Soares 1997, D'Hautcourt und Smart 1999). Dieser Parameter wurde bei den in den Gärungsversuchen eingesetzten Isolate zusammen mit neu gewonnenen Klonen und weiteren Referenzstämmen untersucht. Die in den Gärungsversuchen zunächst gemachte Beobachtung, daß es sich bei dem Isolat VBH9812 um eine bruchbildende Hefe handelt, während VBH9810 eine Staubhefe ist, konnte durch den später durchgeführten Helmtest allerdings nicht verifiziert werden. Hierbei zeigten beide Isolate einheitlich ein Staubhefe-Verhalten.

Die beiden direkt aus der Stammhaltung von Doemens zur Verfügung gestellten, originalen Betriebshefe-Stämme DWV3 und DWV4 sowie die später zusätzlich analysierten Proben DGV (entspricht DWV3) und IV (entspricht DWV4) waren jedoch eindeutig als Bruchhefen charakterisierbar. Innerhalb der im Jahr 1999 gewonnenen Betriebshefe-Isolate traten beide Phänotypen auf, wobei die meisten als Staubhefe charakterisiert werden konnten. Dieses Phänomen ließ zunächst zwei mögliche Schlußfolgerungen zu, nämlich eine nicht einheitliche Hefekultur, in der beide Typen auftraten, oder eine hinsichtlich dieser Eigenschaft instabile Hefe, die sich im Verlauf der Zeit (wahrscheinlich verstärkt durch die Isolierung von Einzelkolonien und deren Stammhaltung auf Agarplatten) verändert.

Die Ergebnisse eines Tests zur Verwertung von verschiedenen Zuckern mit Hilfe des API-Systems fügten sich ebenfalls in dieses Bild. Während die meisten Hefen, auch die untergärigen Referenzstämmen, hier sehr einheitliche Profile ergaben, waren innerhalb der Betriebshefe-Isolate einige, die sehr langsam wuchsen und nur wenige Zucker verwerten konnten. Zu diesen gehörten auch die beiden für die Gärungsversuche eingesetzten Isolate VBH9810 und VBH9812. Die hiermit durch ein stark vermindertes

Wachstum charakterisierten Stämme zeigen auch bei der Kultivierung auf Festmedium bei gleichem Alter eine deutlich verringerte Koloniegröße (siehe Abbildung 49). Auf der Basis der bis hierher gefundenen Ergebnisse konnte insgesamt noch keine schlüssige Aussage zur Zusammensetzung der Betriebshefe gemacht werden. Die ursprünglichen Kulturen waren Bruchhefen, Isolate der Betriebshefe vergoren unterschiedlich zu bekannten Referenzstämmen und verloren wahrscheinlich relativ leicht ihr Bruchbildungsvermögen. Eine weitere Analyse dieses Phänomens war nun allein mit physiologischen Methoden nicht mehr zu leisten.

### 5.2. Genetische Differenzierung von Betriebshefe-Isolaten und Referenzstämmen

Durch die zu Beginn eingesetzte Pulsfeld-Gelelektrophorese konnten zunächst eine Reihe von Isolaten der Betriebshefe in zwei Gruppen unterscheiden werden. In einer späteren Wiederholung dieser Untersuchung, war es aber auch mit variierenden Laufparametern nicht möglich, diese Unterschiede zu reproduzieren. Hinzu kommt, daß diese Methode nur eine relativ grobe Unterscheidung anhand der Chromosomengröße ermöglicht und viele weitere genetische Variationsmöglichkeiten unberücksichtigt läßt. Als weitere Möglichkeit wurde daher die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen-Analyse (RFLP) näher betrachtet und zunächst eine Reihe von Restriktionsenzymen auf ihre Eignung getestet. Prinzipiell eignen sich eine große Anzahl dieser Endonukleasen für diesen Zweck. Allerdings ist die Auftrennung der so gewonnenen Fragmente im Agarosegel im Normalfall der Schwachpunkt dieser Methode. Aus diesem Grund müssen die Enzyme gut auswertbare Muster liefern können. So blieben von 15 getesteten Endonukleasen schließlich nur zwei übrig, deren Muster in einem Agarosegel ausreichend komplex für eine Differenzierung waren und zufriedenstellend ausgewertet werden konnten.

Insbesondere das Enzym *Sma*I zeigte ein relativ klares und komplexes Muster und deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Betriebshefe-Isolaten. Sehr augenfällig war, daß es sich bei den Isolaten, deren Muster deutlich von dem der Referenzstämmen abwich, auch um diejenigen handelte, die Defizite in der Zuckerverwertung und ein retardiertes Wachstum hatten. So war durch diese Ergebnisse ein erster Hinweis auf einen Zusammenhang dieser Phänomene gegeben. Dieser wurde durch eine anschließende Hybridisierung von durch Restriktionsenzyme geschnittener DNA mit genomischen DNA-Sonden weiter konkretisiert. Obwohl sich die Restriktionsmuster bei einigen Enzymen sehr stark unterschieden, konnten keine Abweichungen bei den Hybridisierungen innerhalb der Betriebshefe-Stämme ausgemacht werden, auch wenn hier verschiedene Restriktionsenzyme zum Einsatz kamen. Lediglich Unterschiede zu den

Referenzstämmen waren hierdurch erkennbar. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß die Unterschiede in den Restriktionsmustern nicht auf Veränderungen der Chromosomen, sondern auf Aberrationen extrachromosomaler, sprich mitochondrialer DNA beruhten.

Diese These wird auch durch einen Vergleich der rechnerischen Fragmentzahl einer Restriktion zu der Zahl an erkennbaren Banden im Agarosegel unterstützt. Das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* ist so groß, daß die immense Anzahl einzelner Fragmente, die bei einer Restriktion entstehen, nicht mehr in einem einfachen Agarosegel aufgetrennt werden können. Hinzu kommt, daß bei einer gegebenen DNA-Menge das Verhältnis von Fragmenten einer Größe zu der Gesamtzahl an Fragmenten sehr gering ist und so die Ausprägung dezidierter Banden erschwert wird. Man erhält stattdessen einen durchgehenden, schwachen "Fragmentschleier" im Gel, aus dem nur die DNA-Abschnitte als erkennbare Banden hervorstechen, die in sehr großer Anzahl vorliegen. Einen weiteren Hinweis auf Veränderungen in der mitochondrialen DNA ergab der Test von vier Mikrosatelliten-Sequenzen in der mitochondrialen DNA. Bei den Isolaten mit abweichendem RFLP-Muster waren keine PCR-Produkte nachweisbar, wobei die übrigen Proben hier Banden im Gel zeigten.

Da die im Agarosegel sichtbaren Banden mit hoher Wahrscheinlichkeit aus mitochondrialer DNA bestanden und daher für eine Differenzierung wenig geeignet waren, mußte ein Weg gefunden werden, Fragmente der genomischen DNA sichtbar zu machen. Eine Methode, die dies ermöglicht, ist die Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA mit genomischen DNA-Sonden. Dazu wird die DNA auf eine spezielle Membran übertragen (Southern-Blotting) und die Sonde an die homologen Sequenzen der Restriktionsfragmente gebunden. Mittels immunologischer Nachweismethoden kann anschließend die Position der Sonde auf der Membran sichtbar gemacht werden.

Die Wahl einer geeigneten Sonde fiel auf das *Ty1-15*-Transposon, da Transposons zu meist häufiger in einem Genom auftreten und damit die Wahrscheinlichkeit ansteigt, viele Fragmente sichtbar zu machen und dadurch feinere Unterscheidungen zu ermöglichen. Durch die Hybridisierung von *EcoRI* und *CfoI*-behandelter DNA mit diesen Sonden konnte allerdings, außer dem obergärigen Kontrollstamm DWV2 und der untergärigen Referenz W66, keiner der untersuchten Stämme und Betriebshefe-Isolate voneinander differenziert werden.

Diese Methode ist somit sehr wahrscheinlich für eine Stammdifferenzierung zu "grob", obwohl natürlich nicht ausgeschlossen werden kann, daß einige Stämme mit bestimmten Restriktionsenzymen und eventuell anderen DNA-Sonden doch unterscheidbar



sind. Allerdings ist hierbei die Suche nach geeigneten Kombinationen sehr aufwendig. Es zeigt sich aber auch, daß die deutlichen Unterschiede in den RFLP-Mustern sich nicht in der Organisation der genomischen DNA niederschlagen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Hefen deuten damit auf eine weitgehende "Umorganisation" der mitochondrialen DNA in einigen der Stämme bzw. Isolate hin. Zunächst ist die große Abweichung der RFLP-Muster mit dem Restriktionsenzym *SmaI* bei einigen Stämmen überraschend. Die sehr deutlichen Restriktionsmuster dieses Enzyms deuten auf eine vielfach vorliegende DNA-Sequenz hin, wie sie in den Mitochondrien vorkommt. Vergleicht man die Restriktionen mit Hybridisierungen mit einer genomischen Sonde (*Ty1-15*-Transposon), so findet man dort ein sehr homogenes Bandenmuster, das diese Veränderung nicht wiedergibt sowie einen großen Unterschied in der Bandenverteilung. Während die RFLP-Banden mit *SmaI* relativ gleichmäßig im Größenspektrum verteilt sind, kommen nur sehr große Hybridisierungs-Banden vor. Weitere Beobachtungen unterstützen diese These zusätzlich: Alle Hefen mit dem stark abweichenden *SmaI*-Muster zeigen nur noch ein sehr schwaches aerobes Wachstum (siehe Abbildung 49). Weiterhin zeigen diese Stämme bei einer PCR-Analyse mit mitochondrialen Primern, daß die zu erwartenden Banden fehlen.

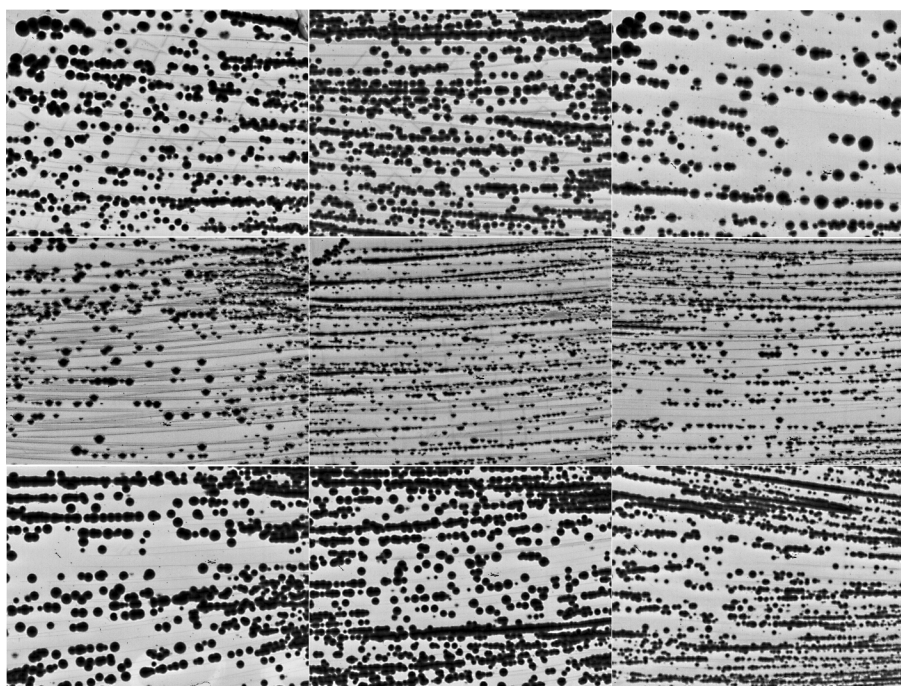


Abbildung 49: Wuchsbilder einiger Hefestämme auf YPG-Medium. Alle Ausstriche sind gleich alt. V.l.n.r.: obere Reihe: W34/70, W66, DWV2, mittlere Reihe: VBH9810, VBH9812, VBH9913, untere Reihe: DGV, IV, DWV5. Deutlich ist die geringere Koloniegröße bei den Stämmen in der mittleren Reihe zu erkennen.

Der instabile Charakter der mitochondrialen DNA bei einigen Hefestämmen ist auch aus anderen Untersuchungen bekannt (Watari *et al.* 2000). Zudem scheint die Gegenwart von Ethanol einen negativen Einfluß auf die langfristige Stabilität der mtDNA zu haben (Ibeas und Jiminez 1997). In diesem Phänomen könnte eine Erklärung für den veränderlichen Charakter der Betriebshefe-Isolate zu finden sein.

Als eine weitere Möglichkeit, nahe miteinander verwandte Hefetypen voneinander unterscheiden zu können, wurde die Sequenzierung von intergenischen DNA-Abschnitten getestet. Zu diesem Zweck wurde willkürlich ein Bereich zwischen zwei Leserahmen (ORFs) auf Chromosom XIII und Chromosom XV ausgewählt. In den meisten Fällen wird für solche Zwecke allerdings die sehr variable Sequenz der ITS-Sequenzen zwischen rRNA-Genen herangezogen. Zu dem Zeitpunkt war eine solche Analyse jedoch bereits durch einen externen Dienstleister durchgeführt worden, so daß diese alternative Möglichkeit zusätzlich getestet werden sollte.

Diese Sequenzierung von zwei intergenischen DNA-Abschnitten bei vier Isolaten der Stämme DWV3 und DWV4 der Firma *Doemens* und den Referenzen W34/70, W66 und DWV2 zeigte dabei eine sehr große Ähnlichkeit der Hefestämme untereinander. Hierdurch konnten nur die Kontrollen DWV2 (obergärige Hefe) und die bei der SGD hinterlegte Sequenz des Stammes S288C von den untergärigen Betriebshefe-Isolaten unterschieden werden.

### 5.3. Externe Analysen der Betriebshefe

Um noch besser abgesicherte Aussagen zur Identität der Hefen treffen zu können, wurden zusätzliche genetische Analysen der Betriebshefe durch eine externe Stelle durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Untersuchung der Stämme DWV1 bis DWV5 mit Hilfe von PFGE, RAPD-PCR, rDNA-ITS-Sequenzanalyse sowie einer Mikrosatellit-Längen-Polymorphismen (MLP)-Typisierung. Mit Hilfe dieser vier Methoden konnten die Stämme in vier bis fünf Gruppen aufgeteilt werden. Die RAPD-PCR mit sechs verschiedenen Primerpaaren erlaubte lediglich eine Unterteilung in obergärige und untergärige Stämme.

Durch die PFGE konnten die untergärigen Stämme weiter aufgeschlüsselt werden, wobei sich DWV1 als eigene Gruppe von den übrigen drei Stämmen unterschied. Durch die Sequenzierung eines 1,3 kb großen Abschnittes von ITS-Sequenzen der rDNA konnte der Referenzstamm der SGD sowie der obergärige Stamm DWV2 deutlich durch das Fehlen von bis zu sieben Basen in einem Poly-T-Stretch sowie der untergärige Stamm DWV4 anhand eines einzigen fehlenden Nukleotids im selben Poly-T-Stretch differenziert werden. Letzteres ist aber aufgrund des extrem geringen Unterschieds

und wegen möglicher Sequenzierungsfehler kein verlässliches Differenzierungsmerkmal. Daneben treten an Unterschieden nur ein weiteres fehlendes Thymidin, das die untersuchten Stämme von der SGD-Sequenz unterscheidet sowie eine Transversion (Thymidin anstelle eines Cytidin), die den Stamm DWV2 kennzeichnet, auf (Daten nicht gezeigt). Alle anderen untersuchten Stämme waren identisch. Die Mikrosatelliten-Analyse erlaubte schließlich eine Division in drei Gruppen, wobei die Stämme DWV3 und DWV4 das gleiche Muster wie der Stamm DGV der Firma *Doemens* aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 23 zusammengefaßt.

Methode	DWV1	DWV2	DWV3	DWV4	DWV5
PFGE	A	B	A	A	C
RAPD-PCR	A	B	A	A	A
rDNA-ITS-Sequenzierung	A	B	A	C	A
MLP	A	B	C	C	A

Tabelle 23: Differenzierung der Stämme von der Firma *Doemens* mit vier molekulargenetischen Methoden. Die Buchstaben bezeichnen die drei unterschiedlichen Gruppen.

Zur Kontrolle der Eigenisolate mit den abweichenden Restriktionsmustern wurden danach auch eine Auswahl der Eigenisolate auf gleichem Weg durch die rDNA Sequenzierung und die Mikrosatelliten-Analyse untersucht. Dadurch sollte zusätzlich ausgeschlossen werden, daß es sich bei diesen Isolaten, insbesondere denen mit dem abweichenden RFLP-Bandenmuster, um versehentlich eingetragene Fremdhefen handelt.

Die Sequenzierung erbrachte zunächst die Gewißheit, daß es sich um untergärrige Kulturhefen handelte. Diese konnten durch die Mikrosatelliten-Längen-Polymorphismen genauer differenziert werden. Dabei zeigten VBH9810 und VBH9812 ein identisches Muster und konnten noch dazu den "Elternstämmen", also den Stämmen DGV und IV der Firma *Doemens* zugeordnet werden. Die drei Betriebshefe-Isolate VBH9901, VBH9907 und VBH9913 fielen in eine neue, bisher unbekannte Gruppe.

Zusammen mit diesen Ergebnissen konnte zunächst die Vermutung verifiziert werden, daß es sich bei der untersuchten Betriebshefe wahrscheinlich nur um einen einzigen Stamm handelt, der verstärkt zu Mutationen in der mitochondrialen DNA neigt. Dieses Phänomen wurde auch von Piskur *et al.* (1998) beschrieben. So kann unter anderem

Alkohol (Ibeas und Jiminez 1997) sowie eine Reihe anderer Agenzien (Ferguson und von Borstel 1992) sogenannte "petite"-Mutationen in *Saccharomyces cerevisiae* hervorrufen, deren respirativer Stoffwechsel nicht mehr funktioniert. Die durch Ethanol verursachten Mutationen gehen dabei auf eine Schädigung der Mitochondrienmembranen zurück (Ingram und Buttke 1984, Querol *et al.* 1992) und beeinflussen nicht direkt die DNA (Ristow *et al.* 1995).

Eine weitere Mikrosatelliten-Analyse von fünf verschiedenen Motiven (PP3, PP4, PP6, PP7 und PP9) mit dreißig Isolaten der Betriebshefe (identisch mit den in Punkt 4.2.4.3. untersuchten Proben) durch einen zweiten Dienstleister erbrachte 17 verschiedene Mustergruppen, sechs in den DGV-Isolaten, sieben in den IV-Isolaten und vier in der Betriebshefe, hier mit DGH bezeichnet (siehe Tabelle 24).

#### 5.4. Genetische Analyse der Hefe mit hochauflösenden Methoden

Dennoch war die genetische Differenzierung der Betriebshefe mit den bis hierhin getesteten Methoden noch nicht zufriedenstellend. Da sich die untergärigen Brauhefen untereinander sehr ähnlich zu sein schienen, mußte entweder an hochvariablen Stellen im Genom angesetzt werden oder eine Methode verwendet werden, die eine Vielzahl von Loci abdeckt, um auch geringere Unterschiede detektieren zu können. Für den ersten Fall eignen sich dabei Mikrosatelliten-Sequenzen sehr gut.

Eine Analyse der Bandenmuster von acht zufällig ausgewählten chromosomalen Mikrosatellitensequenzen ergab, daß sich vier davon aufgrund ihrer im Vergleich höheren Komplexität gut für eine Differenzierung eignen. Mit Hilfe dieser vier Bereiche wurden die Betriebshefen und eine Reihe von Kontrollstämmen eingehender untersucht. In ihrer Gesamtheit zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen eine sehr große Heterogenität bei den Mustern, so daß nicht nur die meisten Referenzstämme als eine eigene Gruppe einzuordnen waren, sondern auch innerhalb der Betriebshefe mehrere verschiedene Bandenmuster auftraten.

Bei dreißig untersuchten Isolaten, von denen zwanzig aus der Betriebshefe stammten, traten 22 verschiedene Gruppen auf, die ein charakteristisches Bandenmuster mit vier untersuchten Loci besaßen. Von diesen 22 Gruppen lagen 13 innerhalb der Betriebshefeprouben. Die hier erhaltenen Befunde decken sich hinsichtlich der Mustervielzahl im wesentlichen mit den Analysen längenvariabler Sequenzen der Betriebshefe, die parallel bei den zwei externen Dienstleistern durchgeführt wurden (siehe Punkt 5.3.).

Isolat	PP3	PP4	PP6	PP7	PP9	Gruppe
DGV01	A	A	B	A	D	1
DGV02	B	A	B	A	A	2
DGV03	A	A	A	A	B	3
DGV04	B	A	B	A	D	4
DGV05	B	A	A	A	B	5
DGV06	A	A	A	A	B	6
DGV07	A	A	A	A	B	6
DGV08	B	A	A	A	B	5
DGV09	A	A	A	A	B	6
DGV10	B	A	A	A	B	5
IV01	B	A	B	A	C	7
IV02	B	B	A	A	B	8
IV03	B	A	B	A	C	7
IV04	B	A	B	A	A	2
IV05	A	A	A	A	A	9
IV06	B	C	B	A	B	10
IV07	A	A	B	A	C	11
IV08	A	A	B	A	B	12
IV09	A	A	B	A	C	11
IV10	A	A	D	B	B	13
DGH01	B	A	B	A	A	2
DGH02	A	A	E	A	C	14
DGH03	B	A	A	A	B	5
DGH04	A	A	A	A	B	3
DGH05	A	A	A	A	B	3
DGH06	D	A	A	A	B	15
DGH07	B	A	F	A	A	16
DGH08	B	A	B	A	A	2
DGH09	A	A	A	A	B	3
DGH10	A	A	A	A	E	17

Tabelle 24: Eine Mikrosatelliten-Analyse von dreißig Isolaten aus den Einzelkulturen und der Mischung der Betriebshefe erbrachte 17 Musterkombinationen.

Eine so große Anzahl von echten Stämmen in der Betriebshefe vorzufinden, ist sehr unwahrscheinlich, da angenommen werden muß, daß diese zumindest einmal als Reinkultur angelegt wurden. Wahrscheinlicher ist es daher, einen oder zwei vorherrschende Typen und einige in geringer Anzahl vorkommende Varianten zu finden, die entweder als Kontamination eingetragen wurden oder durch Mutationsereignisse entstanden sind. Da der Vergleich der Muster mit den Berliner Druckgärhefen BDGH1 bis BDGH7

gezeigt hat, daß die Mikrosatelliten-Muster durchaus sehr unterschiedlich sein können, ist es zu einem gewissen Maß möglich, eine Kontamination anhand ihres wahrscheinlich stärker abweichenden Bandenmusters zu bestimmen. Bei durch Mutation entstandenen Varianten ist hingegen eher anzunehmen, daß sich die Muster nur geringfügig voneinander unterscheiden.

Die Variabilität in den Sequenzen der Mikrosatelliten geht allerdings so weit, daß man – eine ausreichende Anzahl untersuchter Loci vorausgesetzt – wahrscheinlich fast jeden Klon, auch innerhalb einer älteren Reinkultur, differenzieren kann. Daher kann man folgern, daß diese Methode für eine eigentliche Stammdifferenzierung bei Brauhefen schon zu sensitiv ist. Sie eignet sich hingegen sehr gut zur Kontrolle der “Reinheit” einer Reinkultur, wenn diese einmal aus einem Klon hergeführt wurde. Viele Muster bei den Mikrosatelliten, die sich im Verlauf der Zeit angesammelt haben, deuten dann auf einen höheren genetischen Variantenreichtum auch bei anderen Eigenschaften hin. Diese beiden Sachverhalte haben allerdings keine direkte Korrelation zueinander. Insbesondere vor dem Hintergrund der AFLP-Analysen läßt diese große Mustervielfalt Zweifel an der Eignung der MLP-Analyse als echte Stammdifferenzierung für die Hefe aufkommen.

Insbesondere die kleinen Abweichungen in komplexeren Bandenmustern scheinen sich auch während der normalen Führung einer Reinkultur anzusammeln. Wenn es sich bei der Stammkultur nicht um eine durch Tiefkühlung konservierte und auf einer einzelnen Zelle aufgebaute Hefesuspension handelt, wird ein Anteil der Hefekultur im Normalfall in bestimmten Abständen neu hergeführt, um frisches Zellmaterial zu bekommen. Dann treten in dieser Wachstumsphase ganz natürlich immer wieder Mutationen auf, die die Ursache für diese kleinen Veränderungen sind. Auf der anderen Seite können größere qualitative Unterschiede, wie sie bei den Stämmen BDGH1 bis BDGH7 (siehe Abschnitt 4.2.4.1.) auftreten, durchaus als Kriterium für eine Stammdifferenzierung dienen.

Die MLP-Analyse hat bei aller Differenzierungskapazität auch einige prinzipbedingte Nachteile. Bei dieser Methode wird nur ein winziger Ausschnitt der genetischen Ausstattung einer Zelle betrachtet. Weiterhin sind diese Mikrosatelliten in den meisten Fällen keine Determinanten phänotypischer Merkmale der Zellen, so daß es zumeist keine Möglichkeit geben wird, bestimmte Muster mit Eigenschaften der Hefe in Bezug zu setzen. Zusätzlich wird die Analyse der Bandenmuster durch Abweichungen bei den zugrundeliegenden PCR-Produkten erschwert, die bei voneinander unabhängigen Mehrfachbestimmungen auftreten können (z.B. verschiedene PCR-Produkte aus der DNA eines Isolates). Daher müssen die so gewonnenen Ergebnisse prinzipiell durch

eine mehrfache Durchführung der Analysen abgesichert werden. Gegen die MLP-Untersuchung als eine Routineanalyse in der Praxis spricht schließlich noch der recht große Aufwand, der hierfür betrieben werden muß. Da die Längenunterschiede nur wenige Basenpaare betragen, muß die DNA auf einem Sequenziergel aufgetrennt und, je nach Ausrüstung, entweder fluoreszenzoptisch oder durch Transfer auf eine Membran und anschließende Immundetektion sichtbar gemacht werden.

Sinnvoll ist eine Mikrosatelliten-Analyse in erster Linie als langfristige Kontrollmöglichkeit für die Reinheit einer Hefekultur, die im Idealfall zu Beginn aus einer einzelnen Zelle angezchtet wurde. Dann kann im Abstand von mehreren Monaten oder einigen Jahren (je nach Art der Stammhaltung) die Zusammensetzung der Reinkultur überprüft werden, um bei Abweichungen entsprechend reagieren zu können. Änderungen im Muster der Mikrosatelliten sind an sich zwar kein eindeutiger Beweis für eine Veränderung des Phänotyps, da es sich hierbei aber um hochvariable Abschnitte des Genoms handelt, sind Änderungen in diesen Sequenzen ein erster Hinweis auf Veränderungen in der Zusammensetzung der Hefekultur.

Eine gänzlich andere Methode des genetischen Fingerprintings bietet die Möglichkeit, eine große Zahl von DNA-Abschnitten, die über das ganze Genom verteilt sind, sichtbar zu machen und so ein sehr komplexes Muster für die Differenzierung auch sehr nahe verwandter Organismen bereitzustellen. Bei dieser AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) genannten Analyse wird eine Teilmenge der DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert, die durch einen Restriktionsverdau mit zwei unterschiedlichen Enzymen gewonnen wurden. Diese Methode umgeht dabei die Nachteile der normalen RFLP, die bei der Untersuchung größerer Genome auftreten. Zudem ist sie durch die Verwendung von definierten Adapterstücken, die an die Restriktionsfragmente ligiert werden, und einer Variabilität in den selektiven PCR-Primern weder von der Genomgröße abhängig noch benötigt man Kenntnisse der Sequenz, wie sie bei der Mikrosatelliten-Analyse unabdingbar sind.

Trotz der sehr großen Anzahl von Banden, aus denen sich die AFLP-Muster zusammensetzen, finden sich bei den untergärigen Hefestämmen bis auf Ausnahmen (z.B. der Referenzstamm W170) nur sehr wenige Unterschiede in den Bandenabfolgen. Auch mit dieser sehr aufwendigen Methode sind für die sichere Differenzierung zwischen einem Set von Stämmen teilweise mehrere Primerkombinationen notwendig. Aus diesem Ergebnis kann man folgern, daß die meisten dieser Hefestämme untereinander sehr eng verwandt sind. Das Auftreten von deutlich abweichenden Mustern, wie beim Stamm W170, deutet auf die Bildung von Gruppen bei den Brauhefen hin, innerhalb derer die zugehörigen Stämme sehr nahe verwandt sind und sich in größerem Umfang von den

Stämmen einer anderen Gruppe unterscheiden. Eine bessere Aussage zu diesem Phänomen ist aber erst nach Untersuchung einer großen Anzahl von Brauhefen möglich.

### 5.5. Methodenvergleich

Die in dieser Arbeit durchgeführte genetische Charakterisierung der Betriebshefe war gleichzeitig auch ein Test für verschiedene Methoden der Unterscheidung von nahe verwandten Organismen. Die hierbei angewandten Möglichkeiten der Differenzierung untergäriger Brauhefen zeigten eine sehr unterschiedliche Eignung. Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) trennt die kompletten Chromosomen nach ihrer Größe auf und ist daher auf eine unterschiedliche Anzahl oder verhältnismäßig große Unterschiede in der Größe der Chromosomen angewiesen. Sind diese vorhanden, ist eine relativ einfache Unterscheidung von verschiedenen *Kluyveromyces*- (Belloch *et al.* 1998) und *Saccharomyces*-Hefestämmen möglich (Pedersen 1992, Giudici *et al.* 1998a, Giudici *et al.* 1998b, Pataro *et al.* 2000), insbesondere bei der Typisierung heterogener Stämme (Hayford und Jespersen 1999).

Sehr häufig wird die PFGE allerdings für die Auftrennung größerer DNA-Fragmente aus einer Behandlung mit Restriktionsenzymen verwendet. Dadurch können zum Beispiel auch prokaryotische Organismen gut differenziert werden. So konnten Tynkynen *et al.* (1999) 24 untersuchte Isolate von *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus rhamnosus* in 17 Gruppen differenzieren, bei *Hafnia alvei* war es möglich, 38 Isolate in 19 Gruppen zu unterteilen (Gamage *et al.* 1998) und auch bei *Yersinia enterocolitica* funktionierte eine PFGE-Differenzierung (Fredriksson Ahomaa *et al.* 1999). Bei *Saccharomyces cerevisiae* verhindert allerdings das größere Genom eine sinnvolle PFGE-Auftrennung von Restriktionsfragmenten, was das Differenzierungspotential dieser Methode hier etwas einschränkt.

Mit der Verwendung von Restriktions-Endonukleasen, die die DNA sequenzspezifisch schneiden, ist eine Analyse von Längenpolymorphismen der so gewonnenen Fragmente möglich (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen, RFLP). Mit dieser Methode, angewandt auf die Gesamtzell-DNA, ist allerdings nur eine grobe Klassifizierung von Brauhefen möglich (Donhauser *et al.* 1989). Bei den sehr polymorphen Weinhefen sind Differenzierungen bei der Verwendung von Polyacrylamid-Gelen zur Auftrennung der DNA-Fragmente erzielt worden (Barberio *et al.* 1994). Bei der Auftrennung der Fragmente aus Gesamtzell-DNA in einem normalen Agarosegel können nur eine begrenzte Anzahl von Fragmenten mit einem ausreichend großen Längenunterschied aufgetrennt werden. Daher ist diese Methode nur bei relativ kleinen Genomen oder der Untersuchung definierter Abschnitte, die z.B. in einen Vektor kloniert wurden, wirklich gut ge-



eignet. Bei der Analyse größerer Genome, wie dem der Hefe, ist es daher sinnvoll, sich auf bestimmte Bereiche der DNA zu beschränken, die eine gute Differenzierungsmöglichkeit bieten. So wurden RFLP-Analysen der hierfür sehr häufig ausgewählten ribosomalen ITS-Regionen sowohl bei der Weinhefe (Querol *et al.* 1992, Guillaumon *et al.* 1998) als auch bei Brauhefen (Yamagishi *et al.* 1999) durchgeführt. Auch eine RFLP Analyse mitochondrialer DNA gestattet die Unterscheidung von verschiedenen Weinhefen (Versavaud *et al.* 1995, Sabate *et al.* 1998) und wurde auch bei verschiedenen anderen Pilzarten, wie *Verticillium lecanii* (Kouvelis *et al.* 1999) und *Aspergillus ochraceus* (Varga *et al.* 2000) erfolgreich eingesetzt.

Die Hybridisierung von Restriktionsfragmenten mit chromosomalen Gensonden ist eine Erweiterung der RFLP, wobei man die Position bestimmter Sequenzabschnitte nach ihrer Auftrennung mit einer markierten Sonde sichtbar machen kann. Je nach Art der verwendeten Sonde kann diese Methode einige Unterscheidungen zwischen verschiedenen Hefestämmen ermöglichen (Pedersen 1985, Pedersen 1986, Schofield *et al.* 1995, Wightman *et al.* 1996). Diese Methode ist jedoch sehr aufwendig, da die Fragmente aus einem Gel zunächst auf eine Membran übertragen werden müssen (Southern-Blotting), an der dann die zeitaufwendige Hybridisierung und der anschließende Nachweis der Sonden mit immunologischen Methoden erfolgen kann.

Wenn man einen genetischen Fingerabdruck eines Organismus erstellen will, von dessen Genom man keine Einzelheiten kennt, kann man sich einer Variante der PCR bedienen, die willkürlich ausgewählte Primer verwendet, um eine Amplifizierung zufällig passender DNA-Abschnitte zu erlauben. Diese RAPD- (Random Amplified Polymorphic DNA-) PCR erzeugt ein Muster von Fragmenten, die zufällig zu den Primern passende Enden aufweisen. Unter günstigen Umständen kann auf diese Weise eine Differenzierung erfolgen. Mit Hilfe dieser Methode wurden neben Kulturhefen (Schoppa 1998) unter anderem *Lactobacillus* (Tilsala-Timisjärvi und Alatossava 1998, Fitzsimons 1999, Torriani *et al.* 1999), *Lactococcus lactis* (Taillez *et al.* 1998) und *Pediococcus*-Isolate (Nigatu *et al.* 1998), *Renibacterium salmoninarum* (Grayson *et al.* 1999, Grayson *et al.* 2000) sowie pathogene Dematiaceae (Caligiorne *et al.* 1999) differenziert.

Allerdings sind die Muster sehr stark von den gewählten PCR-Bedingungen, wie der Annealing-Temperatur und der Dauer der einzelnen Schritte abhängig, da die Sequenzen von Primer und Genom nicht optimal aufeinander abgestimmt sind. Zudem sind die Ergebnisse im einzelnen schwierig zu interpretieren. In einigen Fällen können allerdings auch spezifische Primer mit bekannter Sequenz in einer "klassischen" PCR bei einer größeren Zahl von Stämmen zu einer Differenzierung beitragen (Hayford und Jespersen 1999).

Die Aussagekraft einer Sequenzierung, also der Bestimmung der Basenabfolge, steht und fällt mit der Auswahl des zu sequenzierenden Bereiches. Bei der Unterscheidung sehr nahe verwandter Organismen müssen Bereiche ausgewählt werden, die sehr leicht Änderungen unterworfen sind, d.h. auf denen kein oder nur geringer Selektionsdruck lastet. Strukturgene, also solche Abschnitte, die die phänotypischen Eigenschaften des Organismus beeinflussen, sind daher nicht geeignet. Aus diesem Grund hat sich die Sequenzierung von nicht codierenden, sogenannten internen Transkript-Spacern, die zwischen den Genen für ribosomale RNA liegen, für diese Aufgabenstellung verbreitet (Valente *et al.* 1999). Allerdings hat sich im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, daß diese Bereiche bei Kulturhefe-Stämmen nicht unbedingt eine bessere Differenzierung zulassen als andere, willkürlich ausgewählte intergenische Bereiche des Genoms.

Als Mikrosatelliten bezeichnet man Bereiche, die aus mehr als sieben tandemartigen Wiederholungen kurzer Sequenzabschnitte von einem bis sechs Basenpaaren Länge (z.B. "TTATTATTA...") bestehen (Weber 1990). Sie kommen in fast allen Lebewesen vor, sind aber in größeren, eukaryotischen Genomen häufiger und größer. Auf kleinen (prokaryotischen) Genomen liegt generell ein größerer Selektionsdruck auf eine schnelle Replikation, also eine Kompaktierung des Genoms (Cox und Mirkin 1997, Field und Wills 1998).

Die Gleichförmigkeit dieser Sequenzabfolgen bedingt dabei häufiger Lesefehler der DNA-Polymerase während der Replikation (Strand *et al.* 1993, Tautz und Schlotterer 1994), wodurch diese Bereiche hypervariabel in ihrer Länge sind (Tautz 1989, Weber 1990). Auf der biochemischen Ebene ist der Mutationsdruck für dieses Merkmal bei Prokaryoten sowie niederen und höheren Eukaryoten in etwa gleich groß (Modrich und Lahue 1996). Diese Eigenschaft macht die Mikrosatelliten zu sehr beliebten Markern in der genetischen Analyse (Ashley und Dow 1994, Dib *et al.* 1996). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kommen diese Sequenzen relativ gleichmäßig verteilt in codierenden und nicht-codierenden Regionen des Genoms vor (Field und Wills 1998).

Die sehr große Variabilität in der Länge dieser Abschnitte kann man sich für eine Differenzierung zu Nutze machen. Voraussetzung hierfür ist aber, daß man die Sequenz des zu untersuchenden Organismus (zumindest im Bereich um die Mikrosatelliten) kennt, da man die notwendigen PCR Primer in die konservierten Bereiche neben diesen Sequenzen legen muß. Im Optimalfall erhält man dann bei einem diploiden Organismus eine bis zwei Banden mit definierter Länge (zwei Allele), die bei einem zweiten Organismus eine andere Länge aufweisen. Die untergärige Brauhefe *Saccharomyces carlsbergensis* hat aufgrund ihres meist aneuploiden Genoms aber eine größere Anzahl dieser Allele schon in einem Organismus, so daß die Muster entsprechend komplexer werden

können. Trotz einiger Einschränkungen kann man mit dieser Methode sehr feine Differenzierungen zwischen Organismen treffen, die sehr nahe miteinander verwandt sind. So ist die MLP außer für die Differenzierung von *Saccharomyces cerevisiae* (Baleiras Couto *et al.* 1996) unter anderem auch bei Isolaten von *Aspergillus fumigatus* (Bart-Delabesse *et al.* 2001) und dem Erreger der Malaria, *Plasmodium falciparum* (Anderson *et al.* 2000, Anthony *et al.* 2000) erfolgreich durchgeführt worden.

Die AFLP stellt im Grunde eine Verfeinerung der RFLP dar, die sich für die Analyse sowohl kleiner, bakterieller (Janssen *et al.* 1996), als auch größerer Genome eignet (Vos *et al.* 1995, Azumi und Goto-Yamamoto 2001). Hierbei wird die DNA typischerweise mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, wobei das eine häufiger schneidet als das andere. An die so entstandenen Schnittstellen werden dann sogenannte Adapter ligiert, die für jede Schnittstelle auch eine andere Sequenz haben. Auf diese Weise erhält man ein Set aus drei Gruppen von Fragmenten, eine mit den Erkennungssequenzen des Enzyms A, eine mit denen des Enzyms B und eine mit denen beider Enzyme. Die Fragmente der letzten Gruppe amplifiziert man nun mittels PCR und solchen Primern, die die Adaptersequenzen erkennen und möglichst nicht an genomische Bereiche der DNA binden. In einem zweiten PCR-Schritt kann man nun durch weitere Primer, die zusätzliche Nukleotide besitzen, eine Untergruppe dieser Fragmente amplifizieren und in einem Sequenziergel auftrennen. Der Nachweis dieser Fragmente erfolgt über eine immunologische Detektion eines der markierten Primer.

Durch die sehr große Zahl an Banden, die so entstehen, können auch nahe verwandte Organismen recht gut differenziert werden. Diese Methode erstellt einen genetischen Fingerabdruck über die Gesamtheit des Genoms und bezieht sich nicht nur auf eng umgrenzte Sequenz- oder Längendifferenzen bestimmter DNA-Abschnitte. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die universelle Einsetzbarkeit und die Unabhängigkeit von Sequenzkenntnissen. Aufgrund dieser Vorteile wird diese Methode in vielen anderen Bereichen, in denen molekulargenetische Typisierung wichtig ist, bereits erfolgreich eingesetzt. So ist in epidemiologischen Studien die Bestimmung der genetischen Diversität von *Salmonella* (Aarts *et al.* 1998) und *Campylobacter* (Duim *et al.* 1999, Lindstedt *et al.* 2000) mit dieser Methode erfolgt. Auch bei der genetischen Analyse von verschiedenen Krankheitserregern kann die AFLP gut eingesetzt werden. Dies gilt sowohl für menschliche Pathogene, z.B. *Vibrio cholerae* (Jiang *et al.* 2000), *Mycobacterium* (Huys *et al.* 2000) oder *Corynebacterium diphtheriae* (de Zoysa und Efstratiou 2000), als auch für solche, die Nutzpflanzen anfallen, wie dem Ascomycet *Leptophaeria maculans*, dessen Taxon wahrscheinlich aus verschiedenen, aber morphologisch sehr ähnlichen Arten besteht (Purwantara *et al.* 2000).

### 5.6. Allgemeine Betrachtungen zur Klassifizierung und Artdefinition von Hefen

Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung von Brauhefen mit genetischen Methoden zur Differenzierung von einzelnen Stämmen wirft einige generelle Fragen zur Taxonomie, zur Definition von Art und Rasse bei dieser Organismengruppe auf. Für die Beschreibung von Verwandtschaftsbeziehungen sollten alle taxonomischen Einheiten monophyletisch sein, also einen gemeinsamen entwicklungsgeschichtlichen Ursprung haben. Die momentane Klassifizierung der Hefe basiert auf dem Internationalen Code der Botanischen Nomenklatur und den Klassifizierungsstufen nach Carl von Linné (Valente *et al.* 1999). Daraus ergibt sich ein Nachteil bei der Einbindung von Informationen aus phylogenetischen Analysen der betrachteten Organismen (Hibbet und Donoghue 1998). Aufgrund dieser Einschränkungen werden neue Klassifizierungssysteme auf Basis phylogenetischer Verwandtschaften diskutiert (De Queiroz und Gaultier 1992). Insbesondere sollen in diesen neuen Systemen die starren Festlegungen des Linné Systems überwunden werden, um Änderungen ohne Umbenennung des betreffenden Taxons vornehmen zu können.

Neben der rein wissenschaftlichen Zuordnung eines Organismus zu der einen oder anderen Verwandtschaftsgruppe geht es auch um die Informationen, die an den Namen dieses Organismus gekoppelt sind. Kommt es zu mehrfachen Umbenennungen, müssen alle zuvor verwendeten Synonyme bekannt sein, um an alle Informationen zu diesem Organismus zu gelangen. Mit jeder Neuordnung können daher auch Informationen verloren gehen oder werden zumindest schwerer erreichbar. In diesem Punkt stößt man unweigerlich auf die schwierige Auseinandersetzung zwischen eindeutigem, phylogenetisch korrektem System auf der einen Seite und einer überschaubaren und praktikablen Ordnung in der Vielfalt des Lebens auf der anderen. Während in der "klassischen" Biologie von Fauna und Flora zumindest die taxonomisch bedeutende Definition der Art relativ gut möglich ist, wird es bei den sich asexuell fortpflanzenden Mikroorganismen wesentlich schwieriger, eine Grenze zwischen Arten zu ziehen. In der rein deskriptiven Biologie reicht ein morphologisches Artkonzept, das zu einer Art diejenigen Individuen rechnet, die in allen wesentlichen Merkmalen untereinander und mit ihren Nachkommen übereinstimmen aber durch klare Diskontinuitäten von ihren Nachbararten unterschieden sind.

Das exaktere und weiter verbreitete biologische Artkonzept von Ernst Mayr (1942) definiert Arten als Gruppen sich tatsächlich oder potentiell miteinander fortpflanzender Individuen, die hinsichtlich ihrer Reproduktion von anderen solcher Gruppen isoliert sind. Obwohl es auch bei diesem Konzept eine Reihe wesentlicher Einschränkungen gibt, da sich z.B. auch die höheren Organismen nicht alle sexuell fortpflanzen, kann man

zumindest mit der Anwendung beider genannter Definitionen die meisten Tiere und Pflanzen recht gut klassifizieren. Aber im wesentlichen eben nur Tiere und Pflanzen. Wie sieht es nun bei den Mikroorganismen aus, die sich nicht oder nur selten sexuell fortpflanzen und deren morphologische Unterschiede, soweit vorhanden, sehr gering sind? Hier mußte man zu einem neuen, erweiterten Artkonzept finden, das sich auch auf diese Organismen anwenden läßt.

Cracraft formulierte daher 1983 ein phylogenetisches Artkonzept: Eine Art ist definiert als eine monophyletische Gruppe, die aus dem kleinsten diagnostizierbaren Cluster von Organismen zusammengesetzt ist, innerhalb dessen es ein parentales Muster von Abstammung und Herkunft gibt (Cracraft 1983). Diese Definition ist nun auf alle Organismen anwendbar, da sie nicht auf reproduktiver Isolation basiert.

Neben den Schwierigkeiten bei der Definition einer Art stellt sich als ein weiteres Problem das der Artbestimmung. Unabhängig von der Definition wird eine Art selten durch ihre reproduktive Isolation bestimmt, sondern anhand ihres Phänotyps und dem Vergleich mit Typ-Organismen. Während dieser Ansatz bei makroskopischen Organismen in den meisten Fällen gut funktioniert, kann er bei Mikroorganismen sehr leicht zu falschen Resultaten führen. Das Problem der sich asexuell fortpflanzenden Mikroorganismen führte zur Entwicklung von molekularen Methoden der Artbestimmung. Der hinter diesen Methoden stehende Gedanke besagt, daß sich Stämme, die der selben Art angehören, sich im Vergleich zu weniger nahe verwandten Organismen nur gering in ihrer genetischen Ausstattung unterscheiden. Die am meisten verwendete Methode ist die der DNA-DNA-Hybridisierung. Im Fall der Hefe zählt man beispielsweise zwei Stämme dann zur gleichen Art, wenn sie mehr als 80% Homologie in ihrer DNA besitzen (Price *et al.* 1978). Mit der Weiterentwicklung genetischer Methoden hat man nach einfacheren Wegen gesucht, eine Art genetisch zu bestimmen. Eine davon ist die Sequenzierung von bestimmten DNA-Abschnitten. Beide Ansätze haben nun Vor- und Nachteile.

Ein wesentlicher Vorteil der Sequenzierung ist der, daß auch wenig verwandte Taxa phylogenetisch zugeordnet werden können (Kurtzman 1994). Für die Taxonomie der Bakterien haben beide Methoden aufgrund ihrer unterschiedlichen Ansätze und verschiedenen Leistungsfähigkeit ihren Wert (Stackebrandt und Goebel 1994). Bei vielen Mikroorganismen, insbesondere aus dem Reich der Bakterien, kommt zu den genetischen Unterschieden auch die immense Vielfalt an Stoffwechselleistungen, die zusätzlich eine sehr weit gehende Differenzierung der Organismen ermöglicht. Dies ist im Sinne der Identifizierung vergleichbar mit der Morphologie bei den höheren Lebewesen. Gibt es bei der Artdefinition bei Mikroorganismen schon einige Schwierigkeiten, so kommt

die Festlegung bestimmter Rassen oder Stämme, deren taxonomischer Grad noch unter dem der Art liegt, meist einer willkürlichen Zuordnung gleich. In diesem Bereich ist die Gruppierung von Organismen sehr stark von den verwendeten Methoden abhängig, die zur Identifizierung verwendet wurden.

Weiter erschwert wird dies bei den untergärigen Brauhefen durch die wahrscheinliche Entstehung aus der Verschmelzung zweier Hefearten (Hansen und Kielland-Brandt 1994, Pedersen 1994, Børsting *et al.* 1997, siehe Abschnitt 5.7.), die nicht sehr lange zurückliegt, wodurch sich noch keine große genetische Vielfalt innerhalb dieser Gruppe entwickeln konnte. Vor diesem Hintergrund erscheinen die durch die AFLP gewonnenen Muster einen sehr soliden Anhaltspunkt für eine Stamm-Abgrenzung zu geben, wenngleich man von den Ergebnissen dieser Analysen nicht unmittelbar auf bestimmte Eigenschaften der Hefe schließen kann.

Die Resultate der Mikrosatelliten-Typisierung scheinen in dieser Hinsicht zu weitgehende Unterscheidungen zu treffen, was allerdings noch durch weitere Analysen anderer Hefekulturen überprüft werden müßte.

#### 5.7. Möglichkeiten für weiterführende Analysen

Um besser abgesicherte Aussagen hinsichtlich der Stammdifferenzierung treffen zu können, sind weitergehende Analysen sinnvoll, die im Rahmen dieser Arbeit aber nicht mehr durchgeführt werden konnten. Die AFLP-Muster müssten durch weitere Wiederholungsproben abgesichert werden, insbesondere deshalb, weil einige der Bandenunterschiede nicht durchgehend auftreten. Die reproduzierbaren, eindeutigen Banden, die eine Differenzierung zulassen, sollten durch eine Sequenzierung genauer analysiert werden, um Informationen darüber zu erhalten, aus welchem Bereich des Genoms das Fragment stammt. Dies läßt gewisse Rückschlüsse auf die Beständigkeit der Mutation zu, denn Veränderungen in Strukturgenen beispielsweise können als relativ stabil angesehen werden, was einer dauerhaften Unterscheidung zugute kommt. Auf diesen Sequenzdaten basierend kann dann auch eine PCR-Methode aufgebaut werden, die eine schnellere Identifizierung ermöglicht.

In ähnlicher Weise ist eine eingehende Analyse der Mikrosatelliten-Muster angebracht, um sicherstellen zu können, daß es sich bei den Amplifikaten um die gesuchten Mikrosatelliten handelt und keine Zufallssequenzen amplifiziert wurden. Hierbei spielt eine große Rolle, daß die zu Grunde liegenden Sequenzdaten von einem Laborstamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stammen, es sich bei der untersuchten Brauhefe aber um *Saccharomyces carlsbergensis* handelt, die vermutlich eine Hybride aus zwei verschiedenen Hefearten ist (Hansen und Kielland-Brandt 1994, Pedersen 1994, Børsting *et al.*

1997). Vor diesem Hintergrund wäre auch eine Untersuchung des mutmaßlichen Verschmelzungspartners, *Saccharomyces monacensis*, mit der AFLP-Methode sehr aufschlußreich, da die untergärigen Stämme deutlich mehr Banden aufweisen als die obergärigen Hefen. So könnte überprüft werden, ob die Muster von *Saccharomyces monacensis* mit diesen zusätzlichen Bandenabfolgen übereinstimmen.

Insgesamt kommt es der Interpretierbarkeit von solchen Ergebnissen auch zugute, wenn ein Außengruppenvergleich, d.h. eine Einbeziehung verwandter Arten, durchgeführt wird. Anhand der Musterabweichungen zu diesen Referenzen können die der nahe verwandten Stämme besser zugeordnet und beurteilt werden. Analysen dieser Art gehen aber von einer anderen Fragestellung aus, so daß sie in dieser Arbeit nicht betrachtet wurden.

### 5.8. Alternative Ansätze für die Hefedifferenzierung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Möglichkeiten der Differenzierung von Brauhefen basieren alle auf Unterschieden in der genetischen Ausstattung. Dies ist für eine generelle und vom jeweiligen physiologischen Zustand der Hefe unabhängige Differenzierung der naheliegendste, aber nicht der einzige Weg. Kunze *et al.* (1993) haben eine Klassifizierung von Stämmen auch auf der Basis von eindimensionaler SDS-Polyacrylamid Elektrophorese von intrazellulären und sekretorischen Proteinen sowie der Messung von Enzymaktivitäten getestet. Durch die Proteinmuster konnte nur eine recht grobe Differenzierung erreicht werden, während Aktivitätsunterschiede der ADH durchaus eine weitergehende Aufschlüsselung ermöglichte. Gerade bei der Unterscheidung sehr nahe verwandter Organismen bieten immunologische Methoden ein sicheren und selektiven Ansatzpunkt, der auf einer unterschiedlichen Proteinzusammensetzung der Hefen basiert.

Diese begründet sich zwar auf der genetischen Ausstattung der Zelle, durch posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen ergibt sich aber eine größere Vielfalt an Proteinen, als sie in der Basenabfolge der DNA codiert ist. Diese Methodik wurde bereits bei bierverderbenden Mikroorganismen wie Laktobazillen (Whiting *et al.* 1999a) und Pediokokken (Whiting *et al.* 1999b) getestet. Da die Hefe in der Brauerei zumeist mehrfach verwendet wird, kann die Anstellhefe eine wesentliche Quelle von Kontaminationen sein. Daher ist ein Nachweis bierverderbender Bakterien in der Anstellhefe besonders wichtig (Hope und Tubb 1985, Shaw 1989). Der Nachweis der Bakterien erfolgt hierbei über monoklonale Antikörper auf einem Membranfilter mit einem Fluoreszenz-Immunoassay. Wesentliche Voraussetzung für einen solchen Nachweis sind Oberflächenantigene, die häufig und stabil sind. Zudem müssen sie konstitutiv, d.h. un-

abhängig vom physiologischen Zustand der Zelle, synthetisiert werden, damit der Nachweis in jeder Phase möglich ist (Whiting *et al.* 1999b). Für den spezifischen Nachweis von *Bradyrhizobium japonicum* und *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in Flüssigkultur wurde bereits ein Schnelltest entwickelt, der ohne spezielle Ausrüstung in weniger als 10 Minuten zu einem Ergebnis führt (Olsen *et al.* 1998). Dieser Test kann auch quantifizierbar durchgeführt werden und zeigt, daß immunologische Methoden nicht nur im Spurennachweis eingesetzt werden können. Ein großer Vorteil dieser Methodik ist der Wegfall eines Zellaufschlusses, der für eine genetische Analyse stets notwendig ist. Diese Vorteile ergeben ebenfalls einen guten Ansatzpunkt für eine Routineanalyse im Betriebslabor einer Brauerei.

#### 5.9. Folgerungen aus den physiologischen und genetischen Analysen

Obwohl die untersuchte Betriebshefe aus zwei unabhängigen Kulturen hergeführt wird, kann aus den Ergebnissen einer Vielzahl von physiologischen und genetischen Untersuchungen geschlossen werden, daß es sich im wesentlichen um einen einzigen Stamm handelt. Die große Zahl von verschiedenen Mustern bei der Mikrosatelliten-Analyse und einige in ihrem Muster abweichende Isolate bei der AFLP deuten auf inhomogene Stammkulturen hin, die wahrscheinlich lange ohne Neuisolierung geführt wurden.

Für die Zielsetzung einer Eingangskontrolle der Brauhefe im Betriebslabor bieten die mit der AFLP gewonnenen Bandenmuster als Basis für einen PCR-Nachweis die beste Grundlage. Während in der Durchführung einfache Methoden wie RFLP oder RAPD-PCR keine sichere Unterscheidung zulassen, sind komplexere Differenzierungsmethoden wie die Mikrosatelliten-Analyse oder die AFLP aufgrund des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes für eine Routineanalytik ungeeignet. Eine sichere und schnelle Differenzierung kann entwickelt werden, indem reproduzierbare Unterschiede im Bandenmuster der AFLP als Basis für die Entwicklung stammspezifischer PCR-Primer genutzt werden.

Dazu erfolgt eine Sequenzierung der DNA-Fragmente, wobei deren Enden durch Erkennungssequenzen der eingesetzten Restriktionsenzyme genau definiert sind. Allerdings müssen die so gewonnenen PCR-Primer genau kontrolliert werden, da die Musterunterschiede auch auf Längenvariationen der betreffenden Fragmente basieren können. In diesem Fall erhält man lediglich PCR Produkte unterschiedlicher Größe, aber keine Differenzierung über die An- oder Abwesenheit eines PCR-Produktes. Dies ist aber aus dem Grund wesentlich, da auf diese Weise die PCR auch mit Hilfe eines Realtime-Systems (z.B. LightCycler der Firma *Roche*) ohne die Verwendung eines Gels



erfolgen kann, was eine Routineanalytik weiter vereinfacht. Im Rahmen dieser Arbeit war die Entwicklung eines solchen selektiven Primerpaares allerdings nicht mehr möglich. Je nach Art und Anzahl der Musterunterschiede ist mit dieser Methode unter Verwendung mehrerer Primerkombinationen auch eine einfache Differenzierung mehrerer Stämme möglich. Da sich diese Art der Stammdifferenzierung aber in den meisten Fällen auf nur einen Basenaustausch bezieht, sind über längere Zeiträume aber auch regelmäßige Kontrollen dieser Stämme mit den anderen Methoden notwendig, um deren Identität sicherzustellen.

Für die Qualität der Unterscheidung ist weiterhin wichtig, in welcher Sequenz sich der Basenaustausch befindet. Lokalisiert man eine solche Veränderung in einem Strukturgen, ist die Wahrscheinlichkeit gering, daß es durch weitere Mutationen zu Einschränkungen der Differenzierbarkeit kommen kann, da diese DNA-Bereiche eher konserviert sind. Unterschiede in nicht codierenden Regionen der DNA sind aber fast keinem oder nur einem wesentlich schwächeren Selektionsdruck ausgesetzt, so daß sich hier häufiger Veränderungen ergeben können. Die Analyse von Mikrosatelliten-Sequenzen erlaubt bei den Brauhefen auf der anderen Seite weniger eine Stammdifferenzierung als eine Analyse der Homogenität eines Stammes.

Durch die hohe Variabilität dieser Sequenzen sammeln sich im Verlauf der Zeit eine Vielzahl von Allelen an, aus deren Anzahl man, eine konstante Mutationsrate vorausgesetzt, Rückschlüsse auf die Zusammensetzung eines Stammes ziehen kann. Wurde eine Kultur aus einem einzigen Klon gewonnen, kann man auf diese Weise eventuell das ungefähre Alter einer Hefekultur bestimmen, da mit zunehmendem Alter auch die Zahl der Unterschiede zunehmen sollte.

Diese Analysen wären allerdings sehr aufwendig, da man einen Bezugswert erst ermitteln und die Ergebnisse statistisch absichern muß. Eine wesentliche Eigenschaft der untersuchten Betriebshefe scheint die Neigung zur Bildung von sogenannten Tiny-Mutanten zu sein, da zumindest unter den gewählten Bedingungen für die Stammhaltung ein nennenswerter Anteil der Isolate diese Mutation zeigte. Dieses Phänomen fällt mit deutlichen Veränderungen im RFLP-Bandenmuster zusammen, so daß man auch hierfür eine Nachweismöglichkeit hat.

Zudem kann auch über eine PCR-Analyse auf diese Mutationen geschlossen werden, da probenhalber eingesetzte Primer für die Mikrosatelliten-Analyse in der mitochondrialen DNA bei den veränderten Isolaten keine Produkte ergeben haben. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu erfahren, inwieweit die Mutationshäufigkeit von der Haltung der Stämme (z.B. Sauerstoffeinfluß) abhängig ist und in welchem Maß sie in

der Produktion auftritt. Vor diesem Hintergrund wäre eine statistische Aussage über die Anfälligkeit eines Stammes für diese Mutation ein wichtiger Parameter.

#### 5.10. Folgerungen für die Brauerei

Da es im Interesse der Brauerei liegt, eine möglichst homogene Hefe mit optimalen Eigenschaften für die Gärung einzusetzen, bietet sich eine Strategie zur Optimierung der Hefe an. Durch die AFLP-Analysen hat sich gezeigt, daß sich die beiden Kulturen der Betriebshefe untereinander nicht und im Vergleich mit den Referenzstämmen insgesamt nur sehr wenig unterscheiden. Auf der anderen Seite stellt sich durch die Mikrosatelliten-Analyse eine gewisse Muster- und damit Variantenvielfalt dar, die auf eine inhomogene Stammkultur hindeutet. Sinnvoll wäre nun eine physiologische Analyse dieser Varianten in beiden Kulturen, um eventuell vorhandene Unterschiede in den Gärungseigenschaften zu finden und dann eine Variante mit den besten Eigenschaften in Form einer echten Reinzucht als Betriebshefe einzusetzen. In der Brauerei kann mit der oben beschriebenen, auf AFLP-Unterschieden basierenden PCR-Methode eine relativ einfache und sichere Überwachung der Betriebshefe hinsichtlich ihrer Identität erreicht werden, insbesondere, wenn es sich um nur einen Stamm handelt und dieser sich von den meisten oder allen anderen Hefen anhand eines Bandenunterschiedes differenzieren läßt.

Unter der Voraussetzung, daß eine echte Reinzucht als Betriebshefe zum Einsatz kommt und am Hefemanagement an sich nichts verändert wird, läßt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit eine langfristige Strategie der Stammkontrolle ableiten. Für eine Routineüberwachung im Betriebslabor sollte auf der Basis der AFLP ein PCR Schnellnachweis entwickelt werden, mit dem eine Eingangskontrolle der Hefe ohne zu hohen Zeit- und Kostenaufwand möglich ist, bevor sie in der Brauerei zum Einsatz kommt. In größeren zeitlichen Abständen sollten die AFLP und Mikrosatelliten-Analyse wiederholt werden, um Veränderungen in der Stammkultur detektieren zu können, die sich aus der Routineüberwachung nicht ableiten lassen.

Insbesondere durch die Mikrosatelliten-Analyse kann die Homogenität der Stammkultur recht gut beurteilt werden. Da es sich zu Beginn um eine echte Reinkultur gehandelt hat, sind Veränderungen relativ eindeutig zu interpretieren und die Kultur kann gegebenenfalls entsprechend behandelt werden, z.B. durch eine Neuisolierung der Hefe mit dem ursprünglichen Muster. Hierbei kann mit einer geeigneten Auswahl an AFLP-Primerkombinationen und Mikrosatelliten-Primern gearbeitet werden, da insbesondere bei den Mikrosatelliten deutliche Unterschiede in der Qualität der erhaltenen Muster aufgetreten sind. Mit relativ geringem Aufwand können hier auch weitere Sequenzen

auf ihre Eignung untersucht werden, wie sie in der Literatur, z.B. bei Field und Wills (1998) beschrieben werden. Diese genetischen Analysen können auch mit einfachen physiologischen Tests (z.B. Zuckerverwertung und Helmtest) kombiniert werden, um auch von dieser Seite eine durchgehende Charakterisierung zu erhalten.

Eine alternative Strategie besteht darin, aus einer definierten Stammkultur eine größere Anzahl kleiner Aliquots mittels Kryokonservierung zu bevorraten und die Betriebshefe immer wieder aus diesen tiefgefrorenen Proben herzuführen. Auf diese Weise ist sehr gut gewährleistet, daß sich die Eigenschaften der Hefe auch über eine lange Zeit unverändert erhalten, so daß sich der höhere Aufwand mit der Anlage einer solchen Hefebank wegen der in diesem Fall nicht mehr notwendigen Eingangskontrollen bezahlt machen wird. Mit dem Einfrieren von einigen hundert Proben ist die Versorgung der Brauerei mit der einmal getesteten Betriebshefe auf viele Jahre hinaus gewährleistet. Wenn die Aliquots zu Ende gehen, kann mit einer der letzten Proben eine neue Kultur angezogen werden, die, nach den entsprechenden Kontrollen, wieder die Basis für die nächsten Jahre liefert.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Betriebshefe einer Brauerei hinsichtlich ihrer physiologischen und genetischen Konstitution untersucht. Dabei sollte die Frage geklärt werden, aus wievielen Stämmen die Betriebshefe besteht, die sich aus zwei getrennt geführten Kulturen zusammensetzt. Falls mehrere Stämme auftreten, sollten Möglichkeiten der genetischen Unterscheidung gefunden werden.

Die physiologische Untersuchung zweier Isolate der Betriebshefe erfolgte mittels einer Bestimmung von Wachstumseigenschaften, einer Analyse der Zuckerverwertung und der Quantifizierung von Gärungsnebenprodukten. Hierbei ergab sich eine deutliche Abweichung der Gärungseigenschaften von zwei Referenzstämmen der Hefebank Weihenstephan.

Für die genetische Typisierung wurden verschiedene Methoden an den beiden Stammkulturen, einer Vielzahl von Isolaten aus der Betriebshefe und diversen Referenzstämmen der Hefebank Weihenstephan und der VLB Berlin erprobt. Hierfür wurden die Pulsfeld-Gelelektrophorese, die Analyse von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen, sowohl direkt als auch mittels Hybridisierung mit genomischen DNA-Sonden, die Sequenzierung von intergenischen DNA-Abschnitten, die Analyse von Mikrosatelliten-Sequenzen sowie eine relativ neuen Methode, die AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) angewendet.

Die meisten der getesteten Methoden sind für die Stammdifferenzierung von Brauhefe kaum oder nur eingeschränkt geeignet, so daß im wesentlichen nur zwei der Möglichkeiten, die Mikrosatelliten-Analyse und die AFLP, geeignete Methoden für die Hefetypisierung darstellen. Aufgrund der sehr hohen Variabilität der Mikrosatelliten-Sequenzen eignet sich diese Methode gut für eine Reinheitskontrolle einer Hefekultur, die aus einem einzigen Klon hergeführt wurde.

Mit Hilfe dieser Methoden, insbesondere der AFLP, konnte in der Arbeit gezeigt werden, daß es sich bei den zwei Kulturen der untersuchten Betriebshefe um identische Stämme mit einigen Varianten handelt, die entweder durch Verunreinigung oder, wahrscheinlicher, durch Mutationen entstanden sind. Eine sehr große Zahl an Mustern bei der Mikrosatelliten-Analyse deutet auf eine sehr lange, ohne weitere Nachreinigungen geführte Kultur hin. Anhand der gefundenen AFLP-Muster innerhalb der untersuchten Isolate kann die Betriebshefe in Zukunft aus einer einzigen Reinkultur hergeführt und auf der Basis der AFLP-Ergebnisse ein PCR-basierter Schnellnachweis für die Identität dieser Betriebshefe entwickelt werden, da diese von acht parallel untersuchten Bruchhefen der Hefebank Weihenstephan unterschieden werden konnte.

## 7. Literaturverzeichnis

Aarts, H.J.M., van Lith, L.A.J.T., Keijer, J. (1998): High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 131-135

Äyräpää, T. (1968): Formation of higher alcohols by various yeasts. *J. Inst. Brew.* **74**: 169-178

Äyräpää, T. (1970): Der Einfluß der Temperatur auf die Bildung höherer Alkohole durch Kulturhefen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **23** (2): 48-55

Ali, S., Azfer, A., Bashamboo, A., Mathur, P.K., Malik, P.K., Mathur, V.B., Raha, A.K., Ansari, S. (1999): Characterization of a species-specific repetitive DNA from a highly endangered wild animal, *Rhinoceros unicornis*, and assessment of genetic polymorphism by microsatellite associated sequence amplification (MASA). *Gene* **228**: 33-42

Anderson, R.G., Kirsop, B.H. (1975a): Oxygen as a regulator of ester accumulation during the fermentation of wort of high specific gravity. *J. Inst. Brew.* **81**: 111-115

Anderson, R.G., Kirsop, B.H. (1975b): Quantitative aspects of the control by oxygenation of acetate ester concentration in beer obtained from high-gravity wort. *J. Inst. Brew.* **81**: 296-301

Anderson, T.J., Haubold, B., Williams, J.T., Estrada-Franco, J.G., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockarie, M., Mokili, J., Mharakurwa, S., French, N., Whitworth, J., Velez, I.D., Brockman, A.H., Nosten, F., Ferreira, M.U., Day, K.P. (2000): Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biol. Evol.* **17** (10): 1467-1482

Ando, S., Mikata, K., Tahara, Y., Yamada, Y. (1996): Phylogenetic relationships of species of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess deduced from partial base sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (saccharomycetaceae). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60** (7): 1070-1075

Anthony, T.G., Trueman, H.E., Harbach, R.E., Vogler, A.P. (2000): Polymorphic microsatellite markers identified in individual *Plasmodium falciparum* oocysts from wild-caught *Anopheles* mosquitoes. *Parasitology* **121** (2): 121-126

Ashley, M.V., Dow, B.D. (1994): The use of microsatellite analysis in population biology: background, methods and potential applications. *EXS* **69**: 185-201

- Azumi, M., Goto-Yamamoto, N. (2001): AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast* **18**: 1145 - 1154
- Baileras Couto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J., van der Vossen, J.M.B.M. (1996): Evaluation of Molecular Typing Techniques To Assign Genetic Diversity among *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 41-46
- Barberio, C., Fani, R., Raso, A., Carli, A., Polsinelli, M. (1994): DNA fingerprinting of yeast strains by restriction enzyme analysis. *Res. Microbiol.* **145** (9): 659-666
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. (1990): *Yeasts: characteristics and identification*. 2nd edition, Cambridge University Press, Cambridge, USA
- Bart-Delabesse, E., Sarfati, J., Debeaupuis, J.P., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Bretagne, S., Latge, J.P. (2001): Comparison of Restriction Fragment Length Polymorphism, Microsatellite Length Polymorphism, and Random Amplification of Polymorphic DNA Analyses for Fingerprinting *Aspergillus fumigatus* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **39** (7): 2683-2686
- Belloch, C., Barrio, E., Garcia, M.D., Querol, A. (1998): Inter- and Intraspecific Chromosome Pattern Variation in the Yeast Genus *Kluyveromyces*. *Yeast* **14**: 1341-1354
- Bentley, K.L., Bieberich, C.J., Ruddle, F.H. (1991): Pulsed-Field-Electrophoresis: Procedures, Problems, and Practicalities. *In*: Karam, J.D. Chao, L., Warr, G.W. (eds.): *Methods in Nucleic Acids Research*: 131-156, CRC Press, Boca Raton, USA
- Bevan, E.A., Makover, M. (1963): The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc. 11th Int. Congr. Genet.* **1**: 202-203
- Biswas, S.K., Yokoyama, K., Wang, I., Nishimura, K., Miyaji, M. (2001): Typing of *Candida albicans* Isolates by Sequence Analysis of the Cytochrome b Gene and Differentiation from *Candida stellatoidea*. *J. Clin. Microbiol.* **39** (4): 1600-1603
- Børsting, C., Hummel, R., Schulz, E.R., Rose, T.M., Pedersen, M.B., Knudsen, J., Kristiansen, K. (1997): *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional genes encoding the acyl-CoA binding protein, one similar to the *ACB1* gene from *S. cerevisiae* and one identical to the *ACB1* gene from *S. monacensis*. *Yeast* **13**: 1409-1421

- Brauwelt (1995): Zellanalysator-technologie für die Qualitätssicherung im Hefemanagement. *Brauwelt* **135** (42), 2080-2083 (ohne Autorenangabe)
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (1994): *Biology of Microorganisms*. 7th edition, Prentice Hall, Englewood Cliffs, USA
- Brown, P.O. (1994): Genome scanning methods. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 366-373
- Brunel, B., Givaudan, A., Lanois, A., Akhurst, R.J., Boemare, N. (1997): Fast and Accurate Identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Species by Restriction Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (2): 574-580
- Buzzini, P., Martini, A. (2000): Biodiversity of killer activity in yeast isolated from the Brazilian rain forest. *Can. J. Microbiol.* **46**: 607-611
- Caligorne, R.B., Resende, M.A., Paiva, E., Azevedo, V. (1999): Use of RAPD (random amplified polymorphic DNA) to analyse genetic diversity of dematiaceous fungal pathogens. *Can. J. Microbiol.* **45**: 408-412
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C. (1994): *The Fungi*. Academic Press, London, UK
- Cox, R., Mirkin, S.M. (1997): Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5237-5242
- Cracraft, J. (1983): Species concepts and speciation analysis. *In*: Johnston, R.F., (ed.): *Current Ornithology*: 159-187, Plenum Press, New York, USA
- Dalle, F., Franco, N., Lopez, J., Vagner, O., Caillot, D., Chavanet, P., Cuisenier, B., Aho, S., Lizard, S., Bonnin, A. (2000): Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. *J. Clin. Microbiol.* **38** (12): 4554-4559
- de Barros-Lopes, M., Soden, A., Henschke, P.A., Langridge, P. (1996): PCR Differentiation of Commercial Yeast Strains Using Intron Splice Site Primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (12): 4514-4520
- de Barros Lopes, M., Soden, A., Martens, A.L., Henschke, P.A., Langridge, P. (1998): Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 279-286

- de Barros Lopez, M., Rainieri, S., Henschke, P.A., Langridge, P. (1999): AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 915-924
- De Queiroz, K., Gaultier, J. (1992): Phylogenetic taxonomy. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **23**: 449-480
- de Zoysa, A., Efstratiou, A. (2000): Use of Amplified Fragment Length Polymorphisms for Typing *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Clin. Microbiol.* **38** (10): 3843-3845
- D'Hautcourt, O., Smart, K.A. (1999): Measurement of Brewing Yeast Flocculation. *J. ASBC* **57** (4): 123-128
- Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J., Weissenbach, J. (1996): A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* **380** (6570): 152-154
- Donhauser, S. (1995): Charakterisierung von Hefearten und -stämmen. *Brauwelt* **50**: 2644-2650
- Donhauser, S., Wagner, D., Guggeis, H. (1987): Hefestämmen und Bierqualität, 1. Mitteilung: Vergleichende Untersuchungen an den untergärigen Hefestämmen 26, 34, 44, 54, 59, 69, 84, 111, 120, 128, 140, 153 und 157 aus der Hefebank Weihenstephan. *Brauwelt* **127** (29): 1273-1279
- Donhauser, S., Vogeser, G., Springer, R. (1989): Klassifizierung von Brauereihefen und anderen industriell eingesetzten Hefen durch DNS-Restriktionsanalysen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **42** (1): 4-10
- Donhauser, S., Springer, R., Vogeser, G. (1990): Identifizierung und Klassifizierung von Brauereihefen durch Chromosomenanalyse mit der Pulsfeldgelelektrophorese. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **43** (12): 392-400
- Duim, B., Wassenaar, T.M., Rigter, A., Wagenaar, J. (1999): High Resolution Genotyping of *Campylobacter* Strains Isolated from Poultry and Humans with Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2369-2375
- Ferguson, R.F., von Borstel, R.C. (1992): Induction of the cytoplasmic 'petite' mutation by chemical and physical agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **194**: 151-163



- Field, D., Wills, C. (1998): Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and different distributions of microsatellites in eight procaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (95): 1647-1652
- Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S., Beresford, T. (1999): Phenotypic and Genotypic Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Mature Cheddar Cheese. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3418-3426
- Fonseca, Á., Scorzetti, G., Fell, J.W. (2000): Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. Can. J. Microbiol. 46: 7-27
- Fredriksson-Ahomaa, M., Autio, T., Korkeala, H. (1999): Efficient subtyping of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 with pulsed-field gel electrophoresis. Lett. Appl. Microbiol. 29: 308-312
- Gamage, S.D., Luchansky, J.B., Ingham, S.C. (1998): Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Hafnia alvei* isolated from chub-packed and retail ground beef. Lett. Appl. Microbiol. 26: 105-109
- Geiger, E., Piendl, A. (1975): Technological Influences on the Formation of 2-Phenylethanol during Fermentation. ASBC Proceedings 33: 48-53
- Geiger, E., Piendl, A. (1976): Technological Factors in the Formation of Acetaldehyde During Fermentation. MBAA Technical Quarterly 13 (1): 51 - 63
- Giudici, P., Caggia, C., Pulvirenti, A., Rainieri, S. (1998a): Karyotyping of *Saccharomyces* strains with different temperature profiles. J. Appl. Microbiol. 84: 811-819
- Giudici, P., Caggia, C., Pulvirenti, A., Zambonelli, C., Ranieri, S. (1998b): Electrophoretic profile of hybrids between cryotolerant and non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. Lett. Appl. Microbiol. 27: 31-34
- Golubev, W. (1998): Mycocins (Killer toxins): In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (eds.): The yeasts, a taxonomic study: 55-62. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, NL
- González, M.G., Fernández, S., Sierra, J.A. (1996): Effect of Temperature in the Evaluation of Yeast Flocculation Ability by the Helm's Method. J. Am. Soc. Brew. Chem. 54 (1): 29-31

- Grayson, T.H., Cooper, L.F., Atienzar, F.A., Knowles, M.R., Gilpin, M.L. (1999): Molecular Differentiation of *Renibacterium salmoninarum* Isolates from Worldwide Locations. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 961-968
- Grayson, T.H., Atienzar, F.A., Alexander, S.M., Cooper, L.F., Gilpin, M.L. (2000): Molecular Diversity of *Renibacterium salmoninarum* Isolates Determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 435-438
- Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. (1998): Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS): region. *Arch. Microbiol.* **169**, 387-392
- Hansen, J., Kielland-Brandt, M.C. (1994): *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional *MET2* alleles similar to homologues from *S. cerevisiae* and *S. monacensis*. *Gene* **140**: 33-40
- Hayford, A.E., Jakobsen, M. (1999): Characterization of *Candida krusei* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome profile, polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 29-40
- Hayford, A.E., Jespersen, L. (1999): Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome polymorphism, PCR and MAL genotyping. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 284-294
- Helm, E., Nøhr, B., Thorne, R.S.W. (1952): The Measurement of Yeast Flocculence and Its Significance in Brewing. *Wallerstein Lab Commun.* **10**: 315-325
- Hibbet, D.S., Donoghue, M.J. (1998): Integrating phylogenetic analysis and classification in fungi. *Mycologica* **90**: 347-356
- Hope, C.F.A., Tubb, R.S. (1985): Approaches to rapid microbial monitoring in brewing. *J. Inst. Brew.* **91**: 12-15
- Hsiang, T., Wu, C. (2000): Genetic relationships of pathogenic *Typhula* species assessed by RAPD, ITS-RFLP and ITS-sequencing. *Mycol. Res.* **104** (1): 16-22
- Huys, G., Rigouts, L., Chemlal, K., Portaels, F., Swings, J. Evaluation of Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis for Inter- and Intraspecific Differentiation of

*Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, and *M. ulcerans*. J. Clin. Microbiol. **38** (10): 3675-3680

Ibeas, J.I., Jiminez, J. (1997): Mitochondrial DNA Loss Caused by Ethanol in *Saccharomyces* Flor Yeasts. Appl. Environ. Microbiol. **63** (1): 7-12

Ingram, L.O., Buttke, T.N.M. (1984): Effects of alcohols on microorganisms. Adv. Microb. Physiol. **25**: 254-296

Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., Kersters, K. (1996): Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology **142**: 1881-1893

Jiang, S.C., Matte, M., Matte, G., Huq, A., Colwell, R.R. (2000): Genetic Diversity of Clinical and Environmental Isolates of *Vibrio cholerae* Determined by Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 148-153

Jonas, D., Meyer, H.-G.W., Matthes, P., Hartung, D., Jahn, B., Daschner, F.D., Jansen, B. (2000): Comparative Evaluation of Three Different Genotyping Methods for Investigation of Nosocomial Outbreaks of Legionnaires' Disease in Hospitals. J. Clin. Microbiol. **38** (6): 2284-2291

Joung, K.-B., Côté, J.-C. (2001): Phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars based on 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphisms. J. Appl. Microbiol. **90**: 115-122

Kouvelis, V.N., Zare, R., Bridge, P.D., Typass, M.A. (1999): Differentiation of mitochondrial subgroups in the *Verticillium lecanii* species complex. Lett. Appl. Microbiol. **28**: 263-268

Kunze, G., Kunze, I., Barner, A., Schulz, R. (1993): Classification of *Saccharomyces cerevisiae* strains by genetical and biochemical methods. Monatsschrift für Brauwissenschaft **46** (4): 132-136

Kurtzman, C.P. (1994): Molecular taxonomy of the yeasts. Yeast **10**: 1727-1740

Lachance, M.-A., Pupovac-Velikonja, A., Natarjan, S., Schlag-Edler, B. (2000): Nutrition and phylogeny of predacious yeasts. Can. J. Microbiol. **46**: 495-505

Lai, E., Birren, B.W., Clark, S.M., Simon, M.I., Hood, L. (1989): Pulsed Field Gel Electrophoresis. BioTechniques **7** (1): 34-42

- Land, G.A., Harrison, B.A., Hulme, K.L., Cooper, N.B.H., Byrd, J.C. (1979): Evaluation of the New API 20 C Strip for Yeast Identification Against a Conventional Method. *J. Clin. Microbiol.* **10**: 357-364
- Lindstedt, B.-A., Heir, E., Vardund, T., Melby, K.K., Kapperud, G. (2000): Comparative Fingerprinting Analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* Strains by Amplified-Fragment Length Polymorphism Genotyping. *J. Clin. Microbiol.* **38** (9): 3379-3387
- Mackenzie, D.A. (1925): The exquisite artistry of Ancient Egypt. *In*: Hammerton, J.A. (ed.): *Wonders of the Past*, Vol. 1: 253-268, Fleetway House, London, UK
- Mändl, B., Geiger, E., Piendl, A. (1974): Über die Bildung von Acetohydroxysäuren und das Verhalten von vicinalen Diketonen während der Gärung. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **27** (3): 57-66
- Mändl, P., Geiger, E., Piendl, A. (1975): Über die Bildung höherer aliphatischer Alkohole im Zusammenhang mit dem Substratabbau der Hefe. *European Brewery Convention - Proceedings of the 15th Congress, Nice 1975*: 539 - 563. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, NL
- Manceau, C., Horvais, A. (1997): Assessment of Genetic Diversity among Strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of rRNA Operons with Special Emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (2): 498-505
- Mayr, E. (1942): *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Harvard University Press, Cambridge, USA
- McLaren, J.I., Fischborn, T., Briem, F., Englmann, J., Geiger, E. (1999): Zinkproblem gelöst? *Brauwelt* **139** (45/46): 2158-2161
- Metzgar, D., Field, D., Haubrich, R., Wills, C. (1998): Sequence analysis of a compound coding-region microsatellite in *Candida albicans* resolves homoplasies and provides a high-resolution tool for genotyping. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **20** (2):103-109
- Miedaner, H., Narziß, L., Wörner, G. (1974): Über den Einfluß der Gärungsparameter Temperatur und Druck auf die Entwicklung einiger Gärungsnebenprodukte des Bieres. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **27** (8): 208-215

- Miteva, V., Gancheva, A., Mitev, V., Ljubenov, M. (1998): Comparative genome analysis of *Bacillus sphaericus* by ribotyping, M13 hybridization, and M13 polymerase chain reaction fingerprinting. *Can. J. Microbiol.* **44**: 175-180
- Modrich, P., Lahue, R. (1996): Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 101-133
- Montrocher, R., Verner, M.-C., Briolay, J., Gautier, C., Marmeisse, R. (1998): Phylogenetic Analyses of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 295-303
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Villani, F. (2000): Specific Detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* with DNA Primers Identified by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 422-424
- Narziß, L., Miedaner, H. (1970a): Über den Einfluß von Gerstensorte, Anbaugebiet und Mälzungsverfahren auf einige Gärungsnebenprodukte des Bieres 2.: Der Einfluß von Gerstensorte und Anbaugebiet. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **23** (4): 121-133
- Narziß, L., Miedaner, H. (1970b): Über den Einfluß von Gerstensorte, Anbaugebiet und Mälzungsverfahren auf einige Gärungsnebenprodukte des Bieres III: Der Einfluß von Sorte und Mälzungsverfahren. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **23** (5): 185-195
- Narziß, L., Miedander, H., Schöndorfer, H. (1982): Gaschromatographische Bestimmung von Bieraromastoffen. *Brauwissenschaft* **35** (5): 109-113
- Narziß, L., Miedaner, H., Gresser, A. (1983a): Heferasen und Bierqualität: Bildung der höheren Alkohole während der Gärung. *Brauwelt* **123** (27): 1139-1144
- Narziß, L., Miedaner, H., Gresser, A. (1983b): Heferasse und Bierqualität: Die Bildung der Ester während der Gärung. *Brauwelt* **123** (45): 2024-2034
- Narziß, L., Miedaner, H., Gresser, A. (1984): Heferasse und Bierqualität: Bildung und Reduktion der vicinalen Diketone und ihrer Vorstufen sowie des Acetoin während der Gärung. *Brauwelt* **124** (12): 494-500
- Nelson, S.F., McCusker, J.H., Sander, M.A., Kee, Y., Modrich, P., Brown, P.O. (1993): Genomic mismatch scanning: a new approach to genetic linkage mapping. *Nat. Genet.* **4** (1): 11-18

- Nguyen, H.-V., Pulvirenti, A., Gaillardin, C. (2000): Rapid differentiation of the closely related *Kluyveromonas lactis* var. *lactis* and *K. marxianus* strains isolated from dairy products using selective media and PCR/RFLP of the rDNA non transcribed spacer 2. *Can. J. Microbiol.* **46**: 1115-1122
- Nigatu, A., Ahrné, S., Gashe, B.A., Molin, G. (1998): Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD): for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *Ped. acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 412-416
- Oliver, S.G., van der Aart, Q.J., Agostoni-Carbone, M.L., Aigle, M., Alberghina, L., Alexandraki, D., Antoine, G., Anwar, R., Ballesta, J.P., Benit, P., *et al.* (1992): The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature* **357** (6373): 38-46
- Olsen, P.E., Sande, E.S., Keyser, H.H., Singleton, P.W., Rice, W.A. (1998): A very rapid enzyme immunoassay for confirmation of rhizobial identity and estimation of cell numbers in fresh broth culture. *Can. J. Microbiol.* **44**: 382-385
- Pataro, C., Guerra, J.B., Petrillo-Peixoto, M.L., Mendonça-Hagler, L.C., Linardi, V.R., Rosa, C.A. (2000): Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strain associated with artisanal fermentation in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 24-31
- Pedersen, M.B. (1984): DNA Sequence Polymorphisms in the Genus *Saccharomyces*. II. Analysis of the Genes *RDN1*, *HIS4*, *LEU2* and *Ty* Transposable Elements in Carlsberg, Tuborg and 22 Bavarian Brewing Strains. *Carlsberg Res. Commun.* **50**: 263-272
- Pedersen, M.B. (1986): DNA Sequence Polymorphisms in the Genus *Saccharomyces*. III. Restriction Endonuclease Fragment Patterns of Chromosomal Regions in Brewing and Other Yeast Strains. *Carlsberg Res. Commun.* **51**: 163-183
- Pedersen, M.B. (1994): Molecular Analyses of Yeast DNA-Tools for Pure Yeast Maintenance in the Brewery. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52** (1): 23-27
- Piskur, J., Smole, S., Groth, C., Petersen, R.F., Petersen, M.B. (1998): Structure and genetic stability of mitochondrial genomes vary among yeasts of the genus *Saccharomyces*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 1015-1024
- Price, C.W., Fuson, G.B., Phaff, H.J. (1978): Genomic comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbiol. Rev.* **42**: 161-193

- Purwantara, A., Barrins, J.M., Cozijnsen, A.J., Ades, P.K., Howle, B.J. (2000): Genetic diversity of isolates of the *Leptosphaeria maculans* species complex from Australia, Europe and North America using amplified fragment length polymorphism analysis. *Mycol. Res.* **104** (7): 772-781
- Quain, D.E. (1986): Differentiation of Brewing Yeasts. *J. Inst. Brew.* **92**: 435-438
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. (1992): A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 439-446
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramon, D. (1992): Molecular monitoring of wine fermentations conducted by yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2948-2953
- Rassmann, K., Schlotterer, C., Tautz, D. (1991): Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* **12** (2-3): 113-118
- Rassmann, K., Leibhard, S. (1999): Hochauflösende Klassifizierung von Hefestämmen mit genetischen Methoden. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **52** (9/10): 152-156
- Ristow, H., Seyfarth, A., Lochmann, E.R. (1995): Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis. *Mutat. Res.* **326**: 165-170
- Röcken, W., Marg, C. (1983): Nachweis von Fremdhefen in der obergärigen Brauerei. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **36** (7): 276-279
- Sabate, J., Cano, J., Querol, A., Guillamón, J.M. (1998): Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. in Appl. Microbiol.* **25**: 452-455
- Scheda, R., Yarrow, D. (1966): The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeasts. *Archiv Microbiol.* **55**: 209-225
- Schofield, M.A., Rowe, S.M., Hammond, J.R.M. (1995): Differentiation of Brewery Yeast by DNA-Fingerprinting. *J. Inst. Brew.* **101**: 75-78
- Schoppa, G. (1998): Klassifizierung von Hefen aus dem Bereich der Getränketechnologie mit der RAPD-PCR. Semesterarbeit, Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwirtschaft, Technische Universität München-Weihenstephan

- Schwartz, D.C., Cantor, C.R. (1984): Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. *Cell* **37**: 67-75
- Seehaus, T., Rodicio, R., Heinrich, J., Aguilera, A., Schmitt, H.D., Zimmermann, F.K. (1985). *Current Genetics* **10**: 103
- Sendra, J.M., Todo, V., Izquierdo, L., Carbonell, J.V. (1994): Evaluation of the effects of yeast strain and fermentation conditions on the volatile concentration profiles of pilot plant lager beers. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **47** (10): 316-321
- Shaw, S. (1989): Rapid methods and quality assurance in the brewing industry. *In*: Adams, M.R., Hope, C.F.A. (eds.): *Progress in industrial microbiology*. Vol. 26. Rapid methods in food microbiology: 273-296. Elsevier Science Publishing, New York, USA
- Sloos, J.H., Dukshoorn, L., Vogel, L., van Boven, C.P.A. Performance of Phenotypic and Genotypic Methods To Determine the Clinical Relevance of Serial Blood Isolates of *Staphylococcus epidermidis* in Patients with Septicemia. *J. Clin. Microbiol.* **38** (7): 2488-2493
- Smith, M.B., Dunklee, D., Vu, H., Woods, G.L. (1999): Comparative performance of the RapID Yeast Plus System and the API 20C AUX Clinical Yeast System. *J. Clin. Microbiol.* **37** (8): 2697-2698
- Smouse, P.E., Chevillon, C. (1998): Analytical Aspects of population-specific DNA fingerprinting for individuals. *J. Hered.* **89** (2): 143-150
- Soares, E.V. (1997): Quantification of yeast flocculation. *J. Inst. Brew.* **103**: 93-98
- Speuer, H., Savelkoul, P.H.M., Bonten, M.J., Stobberingh, E.E., Tjhie, J.H. Application of Different Genotyping Methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a Setting of endemicity in an Intensive Care Unit. *J. Clin. Microbiol.* **37** (11): 3654-3661
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994): Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rDNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849
- Strand, M., Prolla, T.A., Liskay, R.M., Petes, T.D. (1993): Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365** (6443): 274-276 {*Erratum in*: *Nature* **368** (6471): 569, 1994}



- Taillez, P., Tremblay, J., Ehrlich, S.D., Chopin, A. (1998): Molecular Diversity and Relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 530-538
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* **17** (16): 6463-6471
- Tautz, D., Schlotterer, C. (1994): Simple sequences. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4** (6): 832-837
- Tilsala-Timisjärvi, A., Alatossava, T. (1998): Strain-specific Identification of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* with Randomly Amplified Polymorphic DNA-derived PCR Primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (12): 4816-4819
- Torriani, S., Zapparoli, G., Dellaglio, F. (1999): Use of PCR-Based Methods for Rapid Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4351-4356
- Tynkkynen, S., Satokari, R., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Saxelin, M. (1999): Comparison of Ribotyping, Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Pulsed Field Gel Electrophoresis in Typing of *Lactobacillus rhamnosus* und *L. casei* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3908-3914
- Valente, P., Ramos, J.P., Leoncini, O. (1999): Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Can. J. Microbiol.* **45**: 949-958
- van Belkum, A., Ramesar, J., Trommelen, G., Uitterlinden, A.G. (1992): Mini- and microsatellites in the genome of rodent malaria parasites. *Gene* **118** (1): 81-86
- Varga, J., Kevei, É., Tóth, B., Kozakiewicz, Z., Hoeckstra, R.F. (2000): Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. *Can. J. Microbiol.* **46**: 593-599
- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L., Hallet, J.-N. (1995): Genetic Diversity and Geographical Distribution of Wild *Saccharomyces cerevisiae* Strains from the Wine-Producing Area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3521-3529
- Verweij, P.E., Breuker, I.M., Rijs, A.J., Meis, J.F. (1999): Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J. Clin. Pathol.* **52** (4): 271-273

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemann, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acid Res.* **23** (21): 4407-4414
- Wagner, D., Geiger, E., Birk, W. (1983): Der Zink- und Mangangehalt der Hefe in Abhängigkeit von bestimmten gärungstechnologischen Faktoren. *Proc. EBC Congr. 1983:* 473 - 480
- Walmsley, R.M., Wilkinson, B.M., Kong, T.H. (1989): Genetic fingerprinting for yeast. *Biotechnology* **7**: 1168-1170
- Watari, J., Sato, M., Ogawa, M., Shinotsuka, K. (2000): Genetic and physiological instability of brewing yeast. *EBC-Monograph 28* (Symposium Yeast Physiology-a New Era of Opportunity, European Brewing Convention, Nutfield 1999): 148-160, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg
- Weber, J.L. (1990): Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics* **7** (4): 524-530
- Whiting, M.S., Gares, S.L., Ingledew, W.M., Ziola, B. (1999a): Brewing spoilage lactobacilli detected using monoclonal antibodies to bacterial surface antigens. *Can. J. Microbiol.* **45**: 51-58
- Whiting, M.S., Ingledew, W.M., Lee, S.Y., Ziola, B. (1999b): Bacterial surface antigen-specific monoclonal antibodies used to detect beer spoilage pediococci. *Can. J. Microbiol.* **45**: 670-677
- Whittaker, R.H. (1969): New concepts of kingdoms of organisms. *Science* **163**: 150-160
- Wickerham, L.J., Burton, K.A. (1948): Carbon Assimilation Tests for the Classification of Yeasts. *J. Bacteriol.* **56**: 363-371
- Wightman, P., Quain, D.E., Meaden, P.G. (1996): Analysis of production brewing strains of yeast by DNA fingerprinting. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 90-94
- Yamagishi, H., Funahashi, W., Ogata, T., Sakai, K. (1999): Differentiation between brewing and non-brewing yeasts using a combination of PCR and RFLP. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 505-513

---

Yap, N.A., de Barros Lopes, M., Langridge, P., Henschke, P.A. (2000): The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 381-389

Yoder, S., Argueta, C., Hotzman, A., Aronson, T., Berlin, O.G.W., Tomasek, P., Glover, N., Froman, S., Stelma, G, jr. (1999): PCR Comparison of *Mycobacterium avium* Isolates Obtained from Patients and Foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2650-2653