



AiF 16292 N

„Etablierung eines genetischen Barcodes zur Kategorisierung bierverderbender *Lactobacillus brevis*“

Forschungsstelle I: Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Institutsleiter: Prof. Dr. R. Vogel
Projektleiter Dr. J. Behr

Koordinierung: Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V., Berlin
Dr. Erika Hinzmann

Laufzeit: 01.01.2010 – 30.06.2011
Förderung durch das BMWi über die AiF

Ausgangssituation:

Bier stellt für Bakterien eine feindliche Umgebung dar, die durch vielerlei Hürden das Wachstum oder Überleben von Bakterien verhindert. Hierzu gehören v. a. ein niedriger pH-Wert, Anaerobizität, Alkohol, Mangel an leicht verfügbaren Nährstoffen und insbesondere das Vorhandensein von Hopfensäuren. Bierverderbende Bakterien müssen deswegen eine Reihe besonderer (Toleranz)eigenschaften/-gene besitzen, die ihnen das (Über)leben im Bier trotz aller hemmenden Stoffe und Umgebungsbedingungen ermöglichen. Die Hopfenresistenz ist hierbei der bestimmende Faktor. Gegenwärtig kommerziell verfügbare bzw. in Entwicklung befindliche molekularbiologische Testsysteme zum Nachweis bierschädlicher (Milchsäure)-Bakterien beruhen mangels Kenntnis der Hopfenresistenzmechanismen auf dem spezies- oder gattungsspezifischen Nachweis von Bakterien oder Bakteriengruppen, die erfahrungsgemäß zum Bierverderb beitragen können.

Durch die rasante Entwicklung der Methoden zur Genomsequenzierung und des damit einhergehenden Preissturzes bei gleichzeitig gestiegenem Durchsatz ergibt sich ein neuer Weg genetische Unterschiede umfassend (absolut) zu erfassen, ggf. auf einen einfachen Barcode (Barcode-Ökotypisierung basierend auf einem Genset aufgrund fehlender oder vorhandener diagnostischer Lifestyle Gene) zurückzuführen und gleichzeitig erworbene und flexible Genomteile von statischen zu unterscheiden. Zudem wurden kürzlich Möglichkeiten aufgezeigt über diesen Weg den Ursprung solcher Organismen, hier die Kontaminationsquelle in der Brauerei, zu unterscheiden. Diese Möglichkeiten sollen deswegen in einem Folgeantrag ausgeschöpft werden mit dem Ziel der genetischen Barcode Kategorisierung von Bierverderbern. Diese erfolgt anhand von verhältnismäßig weniger genetischen Markern, die ähnlich einem Barcode System dargestellt werden können, in dem z.B. wenige Striche alle Informationen zu einem Stamm mit vielen Eigenschaften eindeutig zu identifizieren enthalten.



Forschungsziel:

Basierend auf einem Genset diagnostischer Lifestyle Gene soll ein Barcode zur Kategorisierung bierverderbender Bakterien erstellt werden, anhand dessen das Bierverderbspotenzial und ggf. der Ursprungsort in der Brauerei ermittelt, und Maßnahmen zur Beseitigung der Kontaminationsquelle abgeleitet werden können. Die diagnostischen Gene sollen Mithilfe eines (einmaligen) Genomvergleichs zweier Stämme mit unterschiedlichem Bierverderbspotenzial ermittelt werden, wobei die routinemäßige Barcode Erstellung durch einfache PCR Reaktionen, die auch in KMUs möglich sind, möglich werden soll.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die angestrebten Forschungsergebnisse ermöglichen eine schnelle und zielsichere Kategorisierung von bierverderbsrelevanten *L. brevis* Stämmen nach ihrem Verderbspotential und ggf. Herkunftsort in der Brauerei mittels in Brauereien bereits etablierten PCR basierten Nachweissystemen. Durch die umfassenden Informationen, die durch die Genomsequenzierung erhalten werden, ist die Erschließung von weiteren Anwendungsmöglichkeiten von *Lactobacillus brevis* Stämmen oder auch Genen (z.B. Starterkulturen, Produktion von Biomolekülen, sensorisch relevanten Komponenten) denkbar.

Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse:

Als Projektziel sollen die Genomsequenzen von *L. brevis* TMW 1.313, 1.465 und 1.6 ermittelt werden und Unterschiede zwischen den Genomen als Grundlage für die Entwicklung eines PCR-basierten Barcodesystems zur schnellen Kategorisierung bierverderbender Bakterien dienen. Die Sequenzierung der Genome zweier Stämme mit hohem Bierverderbspotential und einem Stamm mit geringem Bierverderbspotential konnte fertig gestellt werden. Es zeigte sich, dass die Sequenzierung des nicht bierverderbenden Stamms TMW 1.6 zu deutlich besseren Ergebnissen führte als die Sequenzierung der bierverderbenden Stämme TMW 1.313 und 1.465. Alle Genome inklusive des bereits vorhandenen und vollständig sequenzierten Stamms *L. brevis* ATCC 376 (Isolat aus Silage, nicht bierverderbend) wurden in maximal 500 Basenpaar (inklusive 100 Basenpaar Überlappung) große Fragmente zerlegt und gegeneinander verglichen. Dabei konnten 1794 Genfragmente extrahiert werden, die lediglich in der Gruppe der Bierverderber (TMW 1.313 und TMW 1.465) vorkamen, jedoch keinen Treffer in den Genomen der Gruppe der Nichtbierverderber (TMW 1.6 und ATCC376) aufwiesen. In einem letzten Schritt wurden alle diejenigen Genfragmente entfernt, die Treffer in bereits bekannten und sequenzierten Plasmiden (pRH45I, pRH45II, pLB925A01, pLB925A02, pLB925A03, pLB925A04, ATCC 367 plasmid 1 und ATCC 367 plasmid 2) ergaben. Dadurch konnte die Zahl der Fragmente auf 951 Genstücke reduziert werden. Gleichzeitig konnten für die Gruppe der nicht bierverderbenden Stämme 135 Genfragmente identifiziert werden, die nicht in den Stämmen *L. brevis* TMW 1.313 und 1.465 vorkommen. Auf Grundlage der identifizierten Genfragmente wurden für den Typ Bierverderber 197 und für den Typ Nicht-Bierisolat 130 Oligonukleotidsonden erstellt. Abschließend konnten 34 bierverderberspezifische und 4 nicht-bierverderberspezifische Sonden detektiert werden, auf deren Grundlage eine Multiplex-PCR mit 4 spezifischen Primersets entwickelt wurde. Damit konnte über den als Projektziel verfolgten Anspruch eines Barcodes hinaus, bei dem die Bierschädlichkeit anhand einer zunehmenden Anzahl an positiven Indikatorgenen gemessen werden könnte, eine klare Unterscheidung bierschädlicher von nicht bierschädlichen *L. brevis* Biotypen erreicht werden.

Das Ziel des Vorhabens wurde erreicht.



Weitere Informationen:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Weihenstephaner Steig 16, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71 3663, Fax.: +49 8161 71 3327
E-Mail: rudi.vogel@wzw.tum.de
<http://www.foodscience.ws/>

Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V.
Neustädtische Kirchstr 7A, 10117 Berlin
Tel.: +49 30 209167-19, Fax: +49 30 209167-97
E-Mail: hinzmann@brauer-bund.de
<http://www.wifoe.org>

Das o.g. Projekt der Industriellen Gemeinschaftsforschung der Forschungsvereinigung Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. (Wifö) wird über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und Entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

