



## AiF 17576 N

### „Speziesübergreifende Identifizierung bierverderbender Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* anhand von Lifestyle Genen“

**Forschungsstelle I:** Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW  
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie  
Institutsleiter: Prof. Dr. R. Vogel  
Projektleiter : Andreas Geissler

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

**Laufzeit:** 01.01.2013 - 30.06.2016  
Förderung durch das BMWi über die AiF

#### **Ausgangssituation:**

Bier ist ein Getränk, welches für die meisten Bakterien eine (über)lebensfeindliche Umgebung darstellt. Dabei wird das Wachstum von Bakterien im Bier nicht nur durch Alkohol, dem Mangel an Sauerstoff und leicht verfügbaren Nährstoffen gehemmt, sondern insbesondere durch die Anwesenheit von antibiotisch wirksamen Hopfensäuren und -inhaltsstoffen in Kombination mit einem niedrigen pH-Wert. Dennoch besitzen einige Spezialisten, im Besonderen Vertreter aus der Gattung *Lactobacillus* und *Pediococcus* die Fähigkeit, den widrigen Bedingungen im Bier zu trotzen und Toleranz gegenüber Hopfensäuren zu entwickeln.

Der Nachweis bierverderbender Bakterien beruht aufgrund fehlender Kenntnis universeller Hopfentoleranzmechanismen und allgemeingültigen bierverderberspezifischen Gensequenzen auf dem Gattungs- oder Speziesnachweis der Brauereiisolate. Die Nachweisverfahren basieren auf einer kulturellen Anreicherung gefolgt von einer PCR gestützten Identifizierung der Bakterienspezies auf der Basis ihrer 16S rRNA Gensequenz. Für jeweils einzelne Spe-



zies wie *Lactobacillus brevis*, oder *Pediococcus damnosus* wurden auch empirisch genetische Marker gefunden, die für Eigenschaften kodieren die die Toleranz gegenüber Hopfen erhöhen und zu Wachstum und Überleben in Bier beitragen. Für *L. brevis* wurden anhand eines Genomvergleichs von bierverderbenden gegenüber nicht bierverderbenden Ökotypen Set von Lifestylegenen ermittelt, die eine Unterscheidung dieser Ökotypen ermöglicht (eigene Vorarbeiten).

#### **Forschungsergebnisse:**

Für *L. brevis*, *L. lindneri*, *L. backii*, *L. paracollinoides*, *P. clausenii* und *P. damnosus* (Zielspezies) wurden neue Markersequenzen identifiziert, welche eine Differenzierung von Bierverderbern und Nichtverderbern erlauben. Die bereitgestellten Markersequenzen ermöglichen eine Optimierung vorhandener Markersysteme bezüglich der Sensivität. Mit fabZ konnte ein neues Lifestyle Gen mit sehr hoher Relevanz für *P. damnosus* identifiziert werden, welches obligat für das Wachstum dieser Spezies in Bier ist. Ein einfaches und spezies-unabhängiges System basierend auf dem bereits bekannten Markergen horC und den neu identifizierten Markergenen M19 und M34 war dazu in der Lage alle bierverderbenden Stämme der 6 Zielspezies zu identifizieren (100 % Sensitivität). Dies ermöglicht die angestrebte Bereitstellung eines einfachen und speziesübergreifenden Nachweissystems für den Ökotyp „Bierverderber“. Spezies-spezifische Systeme zeigten, basierend auf etablierten und neuen Markergenen, eine bessere Korrelation mit der Bierverderbsfähigkeit der Zielspezies als spezies-unabhängige Systeme, was sich vor allem in einer höheren Genauigkeit, Präzision und Spezifität zeigte. Die bereitgestellten Markersequenzen, in Kombination mit den hier erhobenen Qualitätsdaten (Genauigkeit, Präzision, Sensitivität und Spezifität), können in bedarfsoptimierte Barcode-Systeme zur Kategorisierung (Bierverderbsfähigkeit) der hier behandelten Zielspezies integriert werden. Die hier ermittelten relevanten Marker- und Lifestyle-Gene erlauben eine verbesserte und spezifische Unterscheidung von bierschädlichen und „harmlosen“ Kontaminanten in der Qualitätssicherung von Brauereien.

#### **Wirtschaftliche Bedeutung:**

Die Kontrolle bierverderbender Bakterien ist ein wesentliches Ziel der Qualitätssicherung in Brauereien. Mit dem wirtschaftlichen Schaden durch Bierverderb ist zudem stets auch ein Imageverlust, z. B. durch Rückrufaktionen verbunden. Die knappen Ressourcen, die für die Qualitätssicherung zur Verfügung stehen, müssen deswegen aussagekräftige, schnelle und umfassende Qualitätskontrollverfahren bedienen. Die molekularbiologischen Methoden für den PCR-gestützten Nachweis von Bakterien sind in vielen Brauereien bereits etabliert. Dieses Projekt soll durch Identifizierung relevanter Zielgene zusätzlich zum Stand der Technik die spezifische Unterscheidung von bierschädlichen Milchsäurebakterien von „harmlosen“ Organismen ermöglichen. Die zielgerichtete Erkennung und Eliminierung dieser Bakterien auf einer wissenschaftlich begründeten Basis erlaubt einen ressourcenschonenden Prozess und eine schonende Produktbehandlung. Die Erkenntnisse zur Herkunft und Verbreitung von Hopfenresistenzen dienen zusätzlich der Entwicklung von Vermeidungsstrategien in Brauereien, die besonders für kleine und mittlere Unternehmen von Bedeutung sind.

#### **Veröffentlichungen:**

Geissler, A. J., Behr, J., von Kamp, K., Vogel, R. F., Metabolic strategies of beer spoilage lactic acid bacteria in beer. International Journal of Food Microbiology, Volume 216, 4 January 2016, Pages 60–68

Behr, J., Geissler, A. J., Schmid, J., Zehe, A., Vogel, R. F., The Identification of Novel Diagnostic Marker Genes for the Detection of Beer Spoiling *Pediococcus damnosus* Strains



Using the BLAST Diagnostic Gene finder. Plos One 2016, Published: March 30, 2016,  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0152747>

Geissler, A. J., Behr, J., Vogel, R. F., Multiple Genome Sequences of the Important Beer-Spoiling Species *Lactobacillus backii*. Genome Announc 4(4):e00826-16. doi:10.1128/genomeA.00826-16.  
<http://genomea.asm.org/content/4/4/e00826-16.full.pdf+html>

Geissler, A. J., Behr, J., Vogel, R. F., Multiple Genome Sequences of Important Beer-Spoiling Lactic Acid Bacteria. Genome Announc 4(5):e01077-16. doi:10.1128/genomeA.01077-16.  
<http://genomea.asm.org/content/4/5/e01077-16.full.pdf+html>

**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

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 IGF-Vorhaben 17576 N der Forschungsvereinigung Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. (Wifö) wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und Entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Energie

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages



Wissenschaftsförderung  
der Deutschen Brauwirtschaft e.V.

