

**Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Entwicklung von molekularen Sonden  
für die sichere Identifizierung von Hefen  
der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera***

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Christoph Röder

geb. am 05.02.1977 in Herborn

Mainz, 2007

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von September 2004 bis März 2007 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2007

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise in folgenden Publikationen und Posterpräsentationen veröffentlicht:

**Publikationen:**

Röder, C., König, H. & Fröhlich, J. (2007): Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Res.* **7**: 1013-1026.

Röder, C., von Walbrunn, C. & Fröhlich, J. (2007): Detektion und Untersuchung der Verbreitung der Wein-relevanten Schädlingshefe *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* in Rheinhessen. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **103**: 353-359.

Röder, C., König, H. & Fröhlich, J. (2007): Molekulare Sonden für die sichere Identifizierung von Spezies der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera*. In Jahresbericht 2006. Forschungsring des Deutschen Weinbaus (FDW) bei der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG) e. V. Fachzentrum Land- und Ernährungswirtschaft, Frankfurt am Main, S. 48.

Fröhlich, J., Röder, C., Pfannebecker, J. & Hirschhäuser, S. (2005): Nachweis eines Lebenskünstlers. *Das deutsche Weinmagazin* **21**: 26-28.

**Posterpräsentationen:**

Röder, C., König, H. & Fröhlich, J. (2007): Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled rDNA probes targeting the 26S rRNA (Teil 2). Posterpräsentation auf der Jahrestagung der VAAM in Osnabrück und auf der internationalen Technologiemesse Intervitis Interfructa in Stuttgart.

Röder, C., König, H. & Fröhlich, J. (2006): Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled rDNA probes targeting the 26S rRNA (Teil 1). Posterpräsentation auf der Jahrestagung der VAAM in Jena.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Schädlingshefen in der Weinbereitung</b> .....	1
<b>1.2 Hefen der Gattungen <i>Brettanomyces/Dekkera</i></b> .....	4
<b>1.3 Methoden zur Detektion und Identifizierung</b> .....	12
<b>1.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung</b> .....	17
<b>1.5 Untersuchungsobjekt Rheinhessenwein</b> .....	22
<b>1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit</b> .....	24
<b>2. Material und Methoden</b> .....	27
<b>2.1 Verwendete Web-Adressen</b> .....	27
<b>2.2 Geräte und Hilfsmittel</b> .....	28
<b>2.3 Verwendete DNA- und RNA-Sequenzen</b> .....	29
<b>2.4 Chemikalien</b> .....	30
<b>2.5 Molekularbiologische Reagenzien und Kits</b> .....	31
<b>2.6 Oligonukleotide (Primer)</b> .....	32
<b>2.7 Oligonukleotide (Cy3-markierte Sonden)</b> .....	33
<b>2.8 Puffer und Lösungen</b> .....	35
2.8.1 DNA-Isolierung aus Hefen .....	35
2.8.2 Gelelektrophorese .....	35
2.8.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung.....	35
2.8.4 Färbungen .....	36
<b>2.9 Medien</b> .....	37
<b>2.10 Organismen und Kultivierung</b> .....	38
2.10.1 <i>Brettanomyces/Dekkera</i> -Institutsstämme .....	38
2.10.2 <i>Brettanomyces/Dekkera</i> -Eigenisolate.....	39
2.10.3 Weitere verwendete Organismen.....	41
2.10.4 Probennahme .....	41
2.10.5 Isolierung von <i>Brettanomyces/Dekkera</i> -Stämmen .....	41
2.10.6 Qualitativer Nachweis der Acetat-Produktion.....	42



2.10.7 Qualitative Untersuchung der Hydrolyse von Cellulose .....	42
2.10.8 Untersuchung der Sporulation .....	43
<b>2.11 Untersuchung ribosomaler Gensequenzen</b> .....	<b>43</b>
2.11.1 DNA-Isolierung .....	43
2.11.2 Untersuchung der 18S rDNA-Sequenzen .....	44
2.11.3 Untersuchung der ITS-Region .....	45
2.11.4 Untersuchung der 26S rDNA-Sequenzen .....	45
2.11.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	45
2.11.6 Aufreinigung der PCR-Produkte .....	46
2.11.7 Sequenzierung .....	46
2.11.8 Sequenzanalyse .....	46
2.11.9 Generierung phylogenetischer Stammbäume .....	46
<b>2.12 rRNA-Sekundärstrukturen</b> .....	<b>47</b>
<b>2.13 Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonden</b> .....	<b>48</b>
<b>2.14 Fluoreszenz in situ Hybridisierung</b> .....	<b>49</b>
2.14.1 Präparation der Zellen .....	50
2.14.2 Vorbehandlung der Oligonukleotid-Sonden .....	50
2.14.3 Hybridisierung .....	51
2.14.4 Nachbehandlung des Präparats .....	51
2.14.5 Eigenschaften von DAPI und DABCO .....	52
2.14.6 Fluoreszenzmikroskopie .....	52
<b>2.15 Vitalitätsfärbungen</b> .....	<b>53</b>
2.15.1 Färbung mit Fun <sup>®</sup> 1 und Calcofluor White .....	54
2.15.2 Färbung mit Fluoresceindiacetat .....	55
2.15.3 Färbung mit SYTOX <sup>®</sup> Green .....	55
<b>2.16 Physiologische Art- und Stamm-Differenzierung</b> .....	<b>56</b>
2.16.1 Biolog YT Mikrotiterplatten-Test .....	56
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>57</b>
<b>3.1 DNA-Sequenzanalysen bei <i>Brettanomyces/Dekkera</i></b> .....	<b>57</b>
3.1.1 18S rDNA-Sequenzen .....	57
3.1.2 ITS-Regionen .....	58
3.1.3 26S rDNA-Sequenzen .....	60

<b>3.2 Die Generierung von 26S rRNA-Sekundärstrukturen</b> .....	65
<b>3.3 Entwicklung von spezifischen DNA-Sonden</b> .....	66
<b>3.4 Die Detektion und Identifizierung durch FISH</b> .....	72
3.4.1 FISH mit 18S rRNA-gerichteten Sonden .....	72
3.4.2 FISH mit 26S rRNA-gerichteten Sonden .....	73
<b>3.5 Differenzierung von lebenden und toten Hefe-Zellen</b> .....	78
3.5.1 Live/Dead <sup>®</sup> Yeast Viability Kit .....	78
3.5.2 Fluoresceindiacetat .....	79
3.5.3 SYTOX <sup>®</sup> Green .....	80
<b>3.6 Stoffwechselphysiologische Untersuchungen</b> .....	81
3.6.1 Acetat-Produktion bei <i>Brettanomyces/Dekkera spec.</i> .....	81
3.6.2 Untersuchung der Hydrolyse von Cellulose .....	82
3.6.3 Untersuchung der Sporulation .....	83
3.6.4 Art-Differenzierung durch Mikrotiterplatten-Test.....	83
3.6.5 Stamm-Differenzierung durch Mikrotiterplatten-Test.....	86
<b>3.7 Die regionale Verbreitung von <i>Dekkera bruxellensis</i></b> .....	87
3.7.1 Stamm-Isolierung.....	87
3.7.2 Regionale Verbreitung in Rheinhessen.....	89
<b>4. Diskussion</b> .....	92
<b>4.1 Sequenzanalysen im rRNA Gen-Cluster</b> .....	92
<b>4.2 Das Sonden-Design auf Basis von Sekundärstrukturen</b> .....	95
<b>4.3 Die FISH-Analyse</b> .....	97
<b>4.4 Kritische Evaluierung von Vitalitätsfarbstoffen</b> .....	100
<b>4.5 Erste physiologische Charakterisierungen</b> .....	103
4.5.1 Acetat-Produktion .....	103
4.5.2 Cellulose-Abbau .....	106
4.5.3 Sporenbildung.....	107
4.5.4 Differenzierung durch Stoffwechsellmuster .....	109
<b>4.6 <i>Dekkera bruxellensis</i> in der Weinbauregion Rheinhessen</b> .....	111
<b>5. Ausblick</b> .....	115

---

<b>6. Zusammenfassung</b> .....	117
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	119
<b>8. Anhang</b> .....	134
<b>8.1 Vergleichende Sequenzanalysen für die Konstruktion         phylogenetischer Stammbäume</b> .....	134
8.1.1 ITS-Regionen.....	134
8.1.2 26S rDNA-Sequenzen.....	136
<b>8.2 Sekundärstrukturen der 26S rRNAs</b> .....	145
<b>8.3 Biolog YT MicroPlate™ Mikrotiterplatten-Test</b> .....	155
<b>8.4 Mikroskopische Bestimmung der Zelltiter</b> .....	157

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn, Niederlande)
Cy3	Fluoreszenzfarbstoff Indocarbocyanin
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]oktan
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat
deion.	deionisiert
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GC	Guanin + Cytosin-Gehalt [%]
h	hour/s (Stunde/n)
ITS	Internal Transcribed Spacer
LSU	large subunit (große Untereinheit)
M	Molar
mM	Millimolar
NCBI	National Center of Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Ketten Reaktion)
PNA	Peptide-like Nucleic Acid (Peptid-ähnliche Nukleinsäure)
rDNA	ribosomal Deoxyribonucleic Acid (ribosomale Desoxyribonukleinsäure)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSU	Small Subunit (kleine Untereinheit)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
T <sub>m</sub>	melting temperature (Schmelztemperatur)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 80	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monooleat
ü. N.	über Nacht
U	unit/s (Einheit/en)
V	Volt
YPG	Yeast extract-Peptide-Glucose

# 1. Einleitung

## 1.1 Schädlinghefen in der Weinbereitung

Die Weinfermentation ist ein komplexer mikrobiologischer Prozess an dem verschiedene Hefen und Bakterien beteiligt sind. Hefen sind in der Weinbereitung nicht nur für die erwünschte alkoholische Gärung verantwortlich, sondern können im Gegensatz dazu auch zu einer Schädigung, einem Qualitätsverlust und dem Verderb des Weins führen. Eine Beeinträchtigung durch Hefen kann während des gesamten Prozesses der Weinbereitung, von der Angärung des Mostes über die Lagerung und Reifung im Fass bis zur Abfüllung und selbst danach in der Flasche auftreten. Die Schädigung beruht hauptsächlich auf der Bildung von qualitätsmindernden Stoffen in Most und Wein, einer Hautbildung während der Lagerung oder der Trübung des Flascheninhalts und Kohlenstoffdioxid-Bildung durch Vermehrung von Hefen nach der Abfüllung. In einigen Fällen kann die Farbe des Weins (insbesondere von Rotwein) negativ beeinflusst werden (Suaréz et al. 2007).

Von den vielen bekannten „wilden“ Hefen (Tab. 1), die ebenso wie die „echten“ Weinhefen (*Saccharomyces cerevisiae*) überwiegend mit den Trauben, aber auch über andere Infektionswege in die Weinbereitung eingebracht werden, spielen nach Ablauf der alkoholischen Gärung nur wenige Arten eine bedeutende Rolle als weinschädigende Mikroorganismen (Kunkee & Bisson 1993). Gemeinsames Merkmal einiger Vertreter dieser Gruppe ist deren Alkoholtoleranz und eine erhöhte Resistenz gegenüber dem in der Weinbereitung regelmäßig als antioxidatives und antimikrobielles Mittel eingesetzten Schwefeldioxid. Aus Sherry-Weinen mit bis zu 22 Vol. % Alkohol (Thomas 1993) und einem Most mit 2 g/l freiem Schwefeldioxid (Dittrich & Großmann 2005), das entspricht einem Vielfachen der maximal in Weinen zulässigen Höchstmenge (Ambrosi 2002, VO EG Nr. 1493/1999), konnten regelrechte „Überlebenskünstler“ isoliert werden. Die langsam gärende Schwefeldioxid-resistente Hefe *Zygosaccharomyces bailii* wurde in Traubenmostkonzentraten gefunden. Dort bildete sie über einen längeren Zeitraum beträchtliche Mengen an Kohlenstoffdioxid und führte zum Platzen von geschlossenen Behältern (Dittrich & Großmann 2005). Darüber hinaus bildet diese osmotolerante Hefeart unvollständig geteilte Sprossverbände aus und bewirkt so einen krümeligen Bodensatz in infizierten Weinen. Auch *Saccharomyces ludwigii* ist äußerst Schwefeldioxid-resistent und kann den

abgefüllten Wein durch Eintrübung deutlich schädigen. Diese Hefe kann große Mengen von Acetaldehyd produzieren (Kunkee & Bisson 1993). Zur Gruppe der Apiculatus-Hefen, die sich morphologisch durch das Auftreten von zitronen- oder keulenförmigen Zellen auszeichnen (Dittrich & Großmann 2005), gehören neben *Saccharomyces ludwigii* auch die am häufigsten auf Trauben und im Most anzutreffende Wildhefe-Gattung *Hanseniaspora*. Insbesondere die Art *Hanseniaspora uvarum* (teleomorphe Form von *Kloeckera apiculata*), die phylogenetisch dem *Klyveromyces*-Cluster zuzuordnen ist (Abb. 1), dominiert meist zu Beginn einer spontan anlaufenden Gärung (ohne Zugabe von *S. cerevisiae*-Reinzuchthefen) die Hefeflora im Most. Die potentielle Schädigung in der Weinbereitung liegt bei dieser Hefe in der Hemmung der Vermehrung von *S. cerevisiae* (Sponholz et al. 1990), unter anderem durch die Bildung von flüchtiger Säure (Essigsäure) zu Beginn der Gärung (Romano et al. 1992). *H. uvarum* bildet darüber hinaus Essigsäureamyl- und Essigsäureethylester, sowie Schwefelwasserstoff (Dittrich & Großmann 2005). Im Gegensatz zur Weinhefe *Saccharomyces cerevisiae* und den Schädlingshefen *Zygosaccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces ludwigii* ist die Schwefeldioxid-Toleranz von *H. uvarum* jedoch sehr gering. Die Verwendung von Reinzuchthefen (*S. cerevisiae*) als Starterkulturen und der prophylaktische Einsatz von Schwefeldioxid als önologische Maßnahmen in der modernen Weinbereitung reduzieren das Risiko eines schädlichen Einflusses dieser Hefen auf die Qualität des Weines. An der Entstehung eines Ester-bedingten Weinfehlers, der auch als „Lösungsmittel-“ oder „Uhu-Ton“ bezeichnet wird, können weitere Hefen der Gattungen *Candida*, *Metschnikowia* und *Pichia* beteiligt sein (Sponholz & Dittrich 1974). Diese „Kahm-Hefen“ bilden unter warmen und aeroben Bedingungen auf Weinen mit niedrigem Alkoholgehalt (< 12 Vol. %) eine „Kahm“-Haut (Dittrich & Großmann 2005). Diese kann die gesamte Oberfläche des Weines bedecken und eine dichte Matte bilden. Eine Geschmacksveränderung tritt hierbei durch die Ester- (hauptsächlich Ethylacetat und Amylacetat), Acetaldehyd- und Essigsäurebildung auf. Kahmhefen können darüber hinaus unter den aeroben Bedingungen auf der Oberfläche Ethanol veratmen und somit den Alkoholgehalt des Weines reduzieren.

Zur morphologisch determinierten Gruppe der Apiculatus-Hefen gehören auch die Spezies der Gattungen *Brettanomyces* und *Dekkera* (Dittrich & Großmann 2005). Diese Hefen sind Untersuchungsobjekt in der vorliegenden Arbeit und über sie wird im nachfolgenden Kapitel ausführlicher berichtet. Insbesondere in Holzfass-gelagerten Rotweinen führen bestimmte Sekundärmetabolite (flüchtige Phenole) dieser weltweit verbreiteten und bekannten Schädlingshefen zur Bildung des berüchtigten „*Brettanomyces*-“ oder

„Pferdeschweiß“-Tons (Suárez et al. 2007). Eine starke Acetat-Produktion und ihre Fähigkeit zur Ausbildung eines Mäusel-Tons (Snowdon et al. 2006) sind für diese sehr alkoholtoleranten Hefen darüber hinaus charakteristisch. Daher werden sie in der Weinherstellung zu den am meisten gefürchteten und daher forschungsintensivsten Weinschädlingen überhaupt gezählt. Sponholz (1992) stellte *Z. bailii* und *Dekkera/Brettanomyces* spec. als gefährlichste Schädlingshefen im Wein dar, Loureiro und Malfeito-Ferreira (2003) beschrieben *Dekkera bruxellensis*, *Z. bailii* und auch *S. cerevisiae* als Schädlingshefen im engeren Sinne.

Eine „mikrobielle Schädigung“ kann gerade bei der Herstellung von fermentierten Getränken oftmals nicht klar definiert werden. Der Übergang von einem positiven Einfluss auf die Weinqualität im Hinblick auf Aroma, Geschmack und Struktur hin zu einer deutlichen Qualitätsminderung kann fließend sein. Dabei spielen unterschiedliche Faktoren, wie z. B. die Konzentrationsverhältnisse und das Zusammenwirken von mikrobiellen Stoffwechselprodukten eine entscheidende Rolle. Nicht zuletzt bleibt die individuelle Beurteilung des Produktes durch den Weintrinker von maßgebender Bedeutung. Dieser Aspekt wird gerade am Beispiel von Einflüssen der Hefe-Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* deutlich, deren Sekundärmetabolite im Wein von Konsumenten sehr unterschiedlich bewertet werden (Loureiro & Querol 1999, Loureiro & Malfeito-Ferreira 2003). Ein weiteres Beispiel für die nicht immer eindeutige Bezeichnung „Schädlingshefe“ ist *Saccharomyces cerevisiae*, die einerseits als „Weinhefe“ für die alkoholische Vergärung des Traubenmostes gezielt eingesetzt wird, aber auf der anderen Seite nach der Flaschenabfüllung durch Vermehrung und erneut einsetzende Gärung den Wein durch Trübung, Kohlenstoffdioxid-Entwicklung und Reduzierung der Restsüße nachträglich schädigen kann.

**Tab. 1.** Mit Wein oder Weinbereitung assoziierte Hefen. Die Zahlen entsprechen der fortlaufenden Nummerierung von Hefe-Spezies im Quellen-Text (Barnett et al. 1990)

---

31	<i>Candida albicans</i>	261	<i>Dipodascus ingens</i>	408	<i>Pichia membranaefaciens</i>
35	<i>Candida apicola</i>	268	<i>Endomyces fibuliger</i>	440	<i>Pichia silvicola</i>
46	<i>Candida boidinii</i>	276	<i>Filobasidiella neoformans</i>	445	<i>Pichia subpelliculosa</i>
54	<i>Candida cantarellii</i>	277	<i>Filobasidium capsuligenum</i>	466	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
58	<i>Candida catenulata</i>	284	<i>Geotrichum fermentans</i>	469	<i>Rhodotorula bogoriensis</i>
67	<i>Candida diversa</i>	290	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	477	<i>Rhodotorula glutinis</i>
85	<i>Candida glabrata</i>	291	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	487	<i>Rhodotorula minuta</i>
94	<i>Candida incommunis</i>	292	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	488	<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>
95	<i>Candida inconspicua</i>	293	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	497	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
99	<i>Candida intermedia</i>	294	<i>Hanseniaspora vineae</i>	499	<i>Saccharomyces exiguus</i>
131	<i>Candida norvegica</i>	298	<i>Hasegawaea japonica</i>	500	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
138	<i>Candida parapsilosis</i>	304	<i>Hyphopichia burtonii</i>	502	<i>Saccharomyces unisporus</i>
153	<i>Candida rugosa</i>	306	<i>Issatchenkia orientalis</i>	503	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>
155	<i>Candida sake</i>	318	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	511	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
167	<i>Candida solani</i>	321	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	515	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>
173	<i>Candida stellata</i>	328	<i>Leucosporidium scottii</i>	517	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>
177	<i>Candida tenuis</i>	332	<i>Lipomyces starkeyi</i>	531	<i>Sporobolomyces roseus</i>
181	<i>Candida tropicalis</i>	334	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	546	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
185	<i>Candida vanderwaltii</i>	340	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	547	<i>Torulaspora globosa</i>
187	<i>Candida veronae</i>	341	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	562	<i>Trichosporon beigelii</i>
188	<i>Candida versatilis</i>	353	<i>Nadsonia fulvescens</i>	567	<i>Trichosporon pullulans</i>
190	<i>Candida vini</i>	355	<i>Octosporomyces octosporus</i>	572	<i>Wickerhamiella domercqiae</i>
194	<i>Candida zeylanoides</i>	357	<i>Pachytichospora transvaalensis</i>	574	<i>Williopsis californica</i>
196	<i>Citeromyces matritensis</i>	367	<i>Pichia anomala</i>	577	<i>Williopsis saturnus</i>
199	<i>Cryptococcus albidus</i>	375	<i>Pichia canadensis</i>	580	<i>Yarrowia lipolytica</i>
220	<i>Cryptococcus humicolus</i>	377	<i>Pichia carsonii</i>	581	<i>Zygoascus hellenicus</i>
223	<i>Cryptococcus laurentii</i>	385	<i>Pichia etchellsii</i>	582	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
225	<i>Cryptococcus luteolus</i>	389	<i>Pichia farinosa</i>	583	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
242	<i>Debaryomyces hansenii</i>	390	<i>Pichia fermentans</i>	586	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>
246	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	394	<i>Pichia guilliermondii</i>	587	<i>Zygosaccharomyces microellipsoideus</i>
251	<i>Dekkera anomala</i>	402	<i>Pichia jadinii</i>	589	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
252	<i>Dekkera bruxellensis</i>				

---

## 1.2 Hefen der Gattungen *Brettanomyces*/*Dekkera*

Hefen der Gattung *Brettanomyces* wurden erstmals 1903 von Claussen in der Bierproduktion beschrieben und für die Herstellung englischer Biere patentrechtlich geschützt (Claussen 1903). 1904 bezeichnete er auf einer Brauerei-Tagung in Kopenhagen



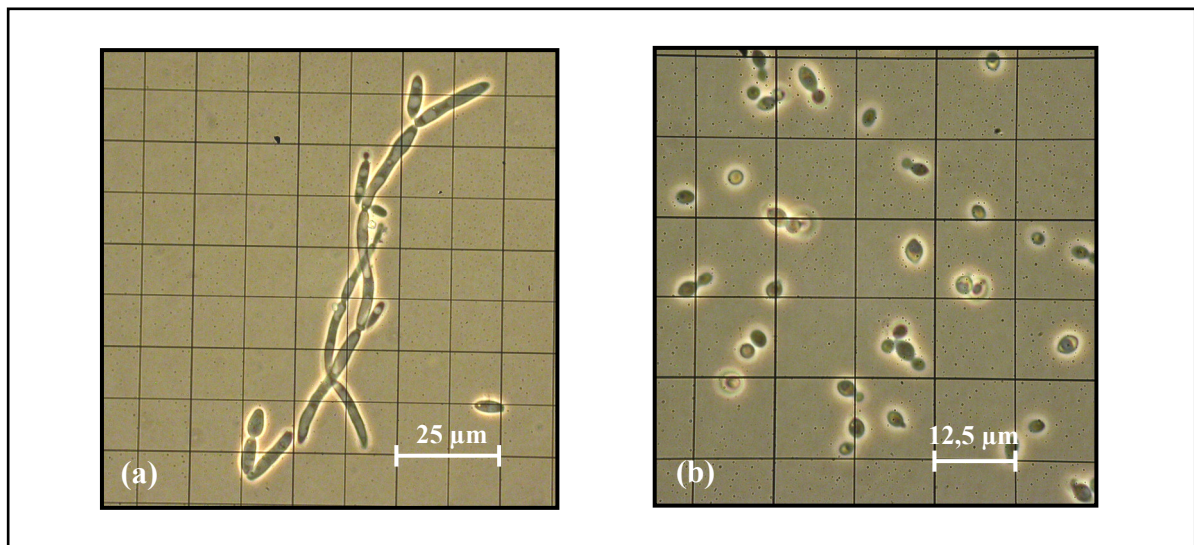
(Dänemark) Hefen, die bei der Herstellung von britischen Bieren in einer zweiten Fermentation zur charakteristischen Aroma-Bildung eingesetzt wurden, als „*Brettanomyces*“-Hefen (Licker et al. 1998). Die Bezeichnung leitete er von der Verbindung dieser Hefe („myces“ = Pilz) mit der britischen Brauerei-Industrie („brettano“) ab und beschrieb *Brettanomyces* als „British brewing industry fungus“ (Licker et al. 1998). Die erste systematische Untersuchung von *Brettanomyces*-Hefen wurde 1940 von M. T. J. Custers durchgeführt (Custers 1940). Bis dahin wurden diese Hefen hauptsächlich mit Bier und der Bierherstellung assoziiert. Aus Wein wurde *Brettanomyces* zum ersten Mal 1930 von den Geisenheimer Önologen Krumbholz und Tauschanoff isoliert, jedoch zunächst als *Mycotorula intermedia* (= *Dekkera bruxellensis*) identifiziert. (Licker et al. 1998). Van der Walt und van Kerken beobachteten die Bildung von Ascosporen in Hefen, die bis dahin der nicht-sporulierenden (anamorphen) Gattung *Brettanomyces* zugeordnet wurden. Daraufhin schlugen sie die Einordnung von sporenbildenden (teleomorphen) Spezies dieser Hefen in die neue Gattung *Dekkera* vor (van der Walt 1964). Im Laufe der Zeit kam es seither immer wieder zu Umklassifizierungen von *Brettanomyces*/*Dekkera* Hefen (vergl. Abb. 1) bedingt durch deren Sporenbildung bzw. das Fehlen derselbigen. Die Schwierigkeiten bei der Detektion und Induzierung von Sporen sind heute hinreichend bekannt (van der Walt 1984a, Kunkee & Bisson 1993). Hinsichtlich der systematischen Nomenklatur herrschte darüber hinaus Uneinigkeit. In der wissenschaftlichen Literatur tauchte lange Zeit eine ganze Reihe unterschiedlicher Spezies-Bezeichnungen bzw. Synonyme für ein und dieselbe *Brettanomyces*/*Dekkera*-Art auf. So listet eines der bekanntesten Bestimmungsbücher für Hefen (Barnett et al. 2000) ganze 13 Synonyme für die am häufigsten isolierte Art *Dekkera bruxellensis* auf. Die Untersuchung der ribosomalen RNA Gensequenzen von *Brettanomyces*/*Dekkera* Hefen konsolidierte schließlich eine Klassifizierung in die vier Arten *Dekkera anomala*, *D. bruxellensis*, *Brettanomyces custersianus* und *B. naardenensis*. Sowohl die teilweise Sequenzierung der großen ribosomalen (26S) DNA (Boekhout et al. 1994), die teilweise Sequenzierung der kleinen (18S) und großen (26S) ribosomalen RNA (Yamada et al. 1994), als auch die vollständige Sequenzierung der 18S rRNA Gene (Cai et al. 1996) bestätigten die vier Arten als stabile, phylogenetisch distinkte Gruppen. Als fünfte Art wurde jüngst *Eniella nana*, ehemals der Gattung *Brettanomyces* zugehörig, als *Brettanomyces nanus* in die Gattung reklassifiziert (vorgeschlagen durch Boekhout et al. 1994). In der heutigen Zeit sind schließlich fünf Arten beschrieben und wissenschaftlich anerkannt (Smith 1998a, b; Mitrakul et al. 1999, Wheeler et al. 2000): *Dekkera bruxellensis*, *D. anomala*, *Brettanomyces custersianus*, *B. nanus* und *B. naardenensis*.



Abb. 1. Phylogenetische Stellung verschiedener *Brettanomyces*/*Dekkera*-Arten anhand von 18S rDNA-Sequenzanalysen (Cai et al. 1996, abgeändert).

Hefen der Gattungen *Brettanomyces*/*Dekkera* gehören systematisch zum Stamm der Schlauchpilze (*Ascomycota*) und sind mit den Kahlhefen (z. B. *Pichia* spec., *Candida* spec.) nahe verwandt (Abb. 1). Sie zeigen ebenfalls deren biochemische Charakteristika, wie zum Beispiel Ethanol-Verwertung. Morphologisch sind sie den typischen Apiculatus-Hefen ähnlich (Dittrich & Großmann 2005). Charakteristisch für diese Hefen ist das Vorkommen von spitzbogenartigen (ogivalen) Zellformen. Abhängig von der Art können die Zellen im Vergleich zur Weinhefe *S. cerevisiae* sehr klein (*B. nanus*, Abb. 2) oder auch

lang gestreckt sein (*D. bruxellensis*, Abb. 2). Der Durchmesser beträgt 1,5 bis 3,5  $\mu\text{m}$  und die Länge 3,0 bis 20,0  $\mu\text{m}$ . Unter bestimmten Wachstumsbedingungen können sie sogar sehr lang gestreckte Zellen mit bis zu 400  $\mu\text{m}$  Länge ausbilden. Bei unvollständiger Zelltrennung bilden diese Hefen auch septierte Hyphen aus und entwickeln ein Pseudomycel (Barnett et al. 2000, van der Walt 1984a, b; diese Arbeit). Die morphologische Entwicklung hängt nicht zuletzt von den jeweiligen Wachstumsbedingungen ab und kann stark variieren.



**Abb. 2.** Mikroskopische Abbildung (Phasenkontrast) von *Dekkera bruxellensis* (a) mit Pseudomycel und *Brettanomyces nanus* (b).

Die vegetative Vermehrung erfolgt bei *Brettanomyces/Dekkera* Hefen, wie bei allen Vertretern der Ordnung *Saccharomycetales* durch Knospung. Eine sexuelle Vermehrung durch Sporenbildung tritt nur bei der Gattung *Dekkera* auf (van der Walt 1984a). Die häufig als hutförmig beschriebenen Ascosporen (eine bis vier pro Ascus) sind dabei nicht immer leicht zu detektieren (s. o.). Ähnlich den bereits erwähnten Kahlhefen bilden manche Stämme auf Most und Wein eine Haut (Dittrich & Großmann 2005).

Physiologisch unterscheiden sich Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* von der „echten“ Weinhefe *Saccharomyces cerevisiae* laut Dittrich & Großmann (2005) in mehreren Punkten. Sie sind langsame und schwächere Gärer. Nur wenige Stämme können mehr als 12 Vol. % Alkohol bilden. Neben Glucose und Fructose können bestimmte Arten auch Saccharose vergären. Die alkoholische Fermentation wird bei *Brettanomyces/Dekkera* durch anaerobe Bedingungen inhibiert (Kunkee & Bisson 1993). Dieser so genannte „Custers-

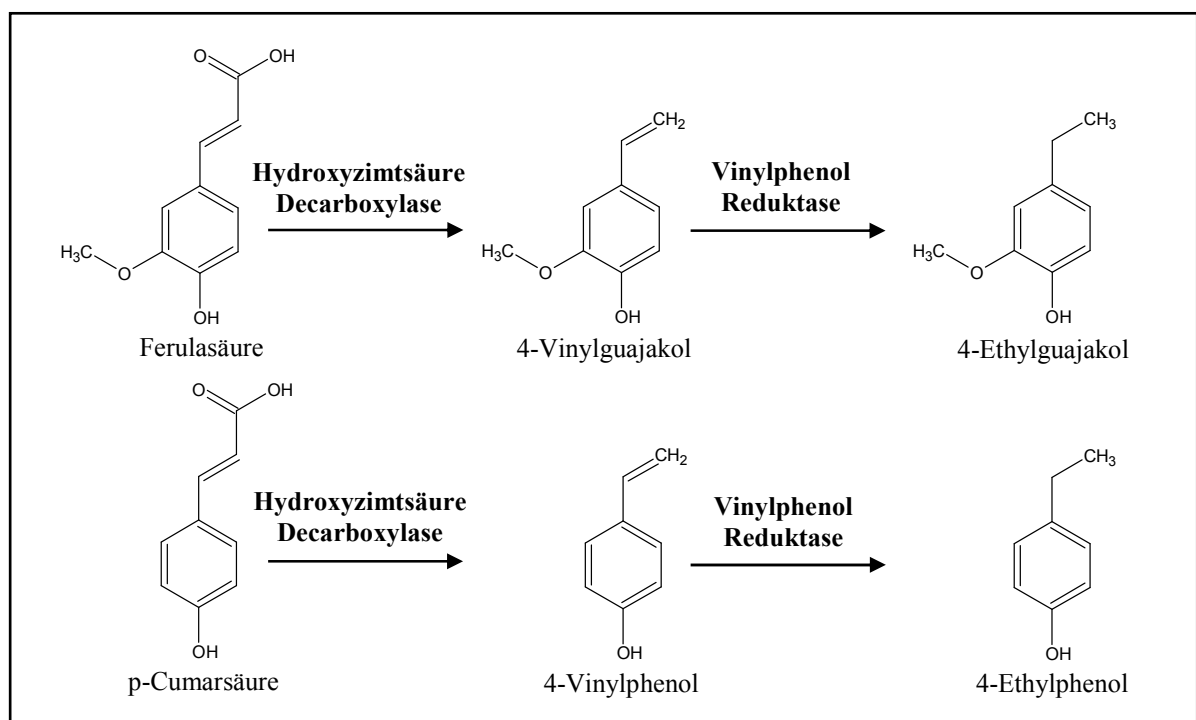
Effekt“ wurde von Scheffers & Wilkén (1969) als taxonomisches Merkmal eingeführt. Glucose wurde unter aeroben Bedingungen schneller zu Ethanol vergoren als unter anaeroben Bedingungen. Die Alkoholtoleranz dieser Hefen ist beträchtlich. Sie vermehren sich noch in Weinen mit bis zu 15 Vol. % Alkohol (Dittrich & Großmann 2005). Unter aeroben Bedingungen können *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen wie die Kahm-Hefen Ethanol zu Kohlenstoffdioxid und Wasser oxidieren (Rodrigues et al. 2001).

Ihre Kulturen sind kurzlebig, was nicht zuletzt an ihrer starken Essigsäurebildung liegt. Unter optimalen Bedingungen war ein Stamm von *D. bruxellensis* in der Lage, aus Zuckerrohr-Melasse in 100 h über 13 g/l Acetat zu produzieren (Uscanga et al. 2007). Der Anteil an lebenden Zellen lag in diesem Kulturversuch nur noch unter 40 %. Die Acetat-Produktion unter den in der Weinherstellung herrschenden Bedingungen ist jedoch geringer. Bei aerober Kultur konnten einige *D. bruxellensis*-Stämme in Most in zwölf Monaten bis zu 7 g/l Essigsäure bilden (Dittrich & Großmann 2005). Die Bedeutung dieser Hefen als mikrobielle Schädlinge liegt aber in weiteren charakteristischen Eigenschaften.

*Brettanomyces/Dekkera* Hefen sind vor allem hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Produktion von negativen Aromen in Most und Wein bekannt (Heresztyn 1986, Chatonnet et al. 1995). Sie wurden darüber hinaus auch aus anderen fermentierten Getränken, wie Sekt, Apfelwein, Sherry und aus Bier isoliert (Kumara et al. 1993, Ibeas et al. 1996, Ciani & Ferraro 1997, Coton et al. 2006). Selten konnten diese Hefen auch in anderen Lebensmitteln wie Limonaden, Rohmilch-Produkte, Joghurt und Feta-Käse gefunden werden (Thomas 1993, Cosentino et al. 2001, Carrasco et al. 2006). In der Weinbereitung sind sie weit verbreitet und wurden in nahezu allen Weinbauregionen der Welt identifiziert (Fugelsang 1997).

Hefen der Gattung *Dekkera* können die Qualität eines Weins durch ihre Stoffwechselaktivitäten beeinflussen. Hydroxyzimtsäuren sind natürlicher Bestandteil des Weins und gelangen aus den Beerenhäuten, -kernen und -stielen als Gerbstoffe (Tannine) in den Most. Diese Verbindungen können durch Mikroorganismen im Wein zu flüchtigen Phenolen umgewandelt werden (Suárez et al. 2007). An diesem Prozess (Abb. 3) sind zwei Enzyme beteiligt. Die Hydroxyzimtsäure-Decarboxylase wandelt zunächst die Vorläuferverbindungen p-Cumarsäure und Ferulasäure in 4-Vinylphenol bzw. 4-Vinylguajakol um. Diese werden dann durch die Vinylphenol-Reduktase zu 4-Ethylphenol bzw. 4-Ethylguajakol reduziert. Der erste enzymatische Schritt kann von vielen Bakterien, Hefen und Pilzen durchgeführt werden. Die Vinylphenol-Reduktase ist jedoch bei weinrelevanten Mikroorganismen bisher nur in *D. bruxellensis*, *D. anomala*, *Pichia guilliermondii* sowie in drei *Candida*-Arten gefunden worden (Chatonnet et al. 1995, Chatonnet et al. 1997, Dias et

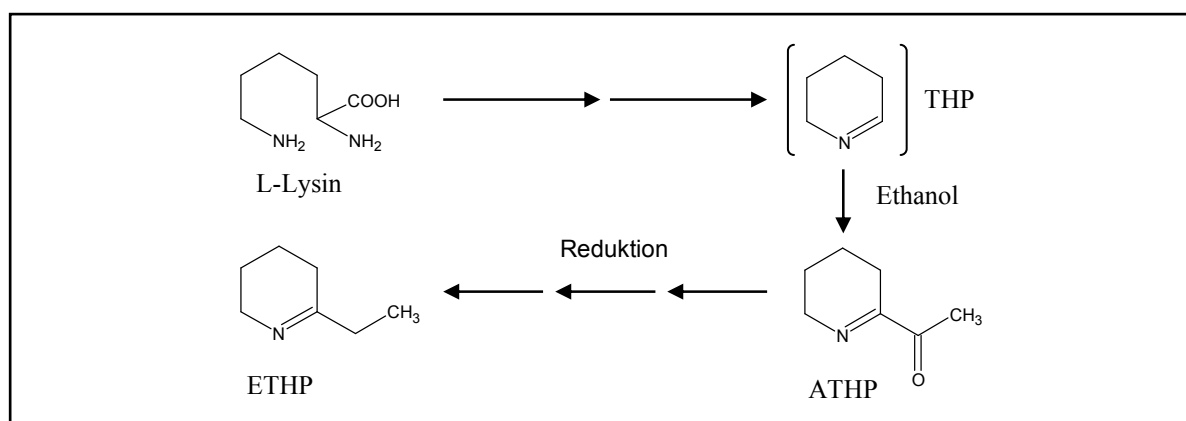
al. 2003). Weder *S. cerevisiae* noch Milchsäurebakterien bilden Ethylphenole unter önologischen Bedingungen (Suárez et al. 2007). *D. bruxellensis* hingegen wird wegen der Fähigkeit zur Produktion großer Mengen dieser Verbindungen als unerwünschte Schädlingshefe gesehen, obwohl der Einfluss auf das Wein-Aroma unterschiedlich bewertet wird (Mitrakul et al. 1999, Loureiro & Malfeito-Ferreira 2003). In Rotweinen wird 4-Ethylphenol ab einer Konzentration von 620 µg/l von einigen Konsumenten als deutliche Qualitätsminderung betrachtet. Bei weniger als 400 µg/l kann diese Verbindung hingegen zu einer Steigerung der Komplexität des Aromas beitragen, das von der überwiegenden Mehrheit der Weintrinker geschätzt wird (Loureiro & Malfeito-Ferreira 2003).



**Abb. 3.** Entstehung von Ethylphenolen aus ihren Hydroxycinnamsäure Prekursor-Verbindungen (nach Suárez et al. 2007, abgeändert).

Die sensorischen Eindrücke auf diese charakteristischen Sekundärmetabolite, im wesentlichen 4-Ethylphenol und 4-Ethylguajakol, wurden als „phenolisch“, „Leder“, „Pferdeschweiß“, „Stall“, „Heftpflaster“, „Nelken“ oder auch „verbranntes Plastik“ beschrieben (Heresztyn 1986, Chatonnet et al. 1992, Licker et al. 1998). 4-Ethylguajakol vermittelt darüber hinaus auch „rauchige“ und „erdige“ Nuancen. Die Entdeckung eines dritten Ethylphenols, dem aus Kaffeesäure gebildeten 4-Ethylcatechol, als Mitverursacher des *Brettanomyces*-Fehltons (Hesford & Schneider 2004) wird bisher in den meisten

internationalen Publikationen nicht berücksichtigt. So wird diese Verbindung in einem aktuellen, umfassenden Review über die Produktion von Ethylphenolen in Wein (Suárez et al. 2007) nicht erwähnt. Neben diesem als „Brett“-Ton bekannt gewordenen Aromafehler kann *Dekkera anomala* auch einen unangenehmen „Mäusel“-Ton durch die Bildung von Aminosäure-Derivaten, den Tetrahydropyridinen (Abb. 4), verursachen (Grbin & Henschke 2000, Snowdon et al. 2006). Der Geruch der betroffenen Weine soll an Mäseharn erinnern (Ditttrich & Großmann 2005) und verstärkt sich im Mund durch den Kontakt mit Speichel (Suárez et al. 2007). Dieser Fehlton sorgt in der Getränkeindustrie für erheblichen Schaden (Snowdon et al. 2006). *Brettanomyces* und *Dekkera* produzieren darüber hinaus eine ganze Reihe weiterer flüchtiger Verbindungen mit olfaktorischen Auswirkungen, z. B. ranzige oder fruchtige Aromanoten (Licker et al. 1998), die Ethylphenol-Bildung bleibt aber der önologisch bedeutenste Aspekt.

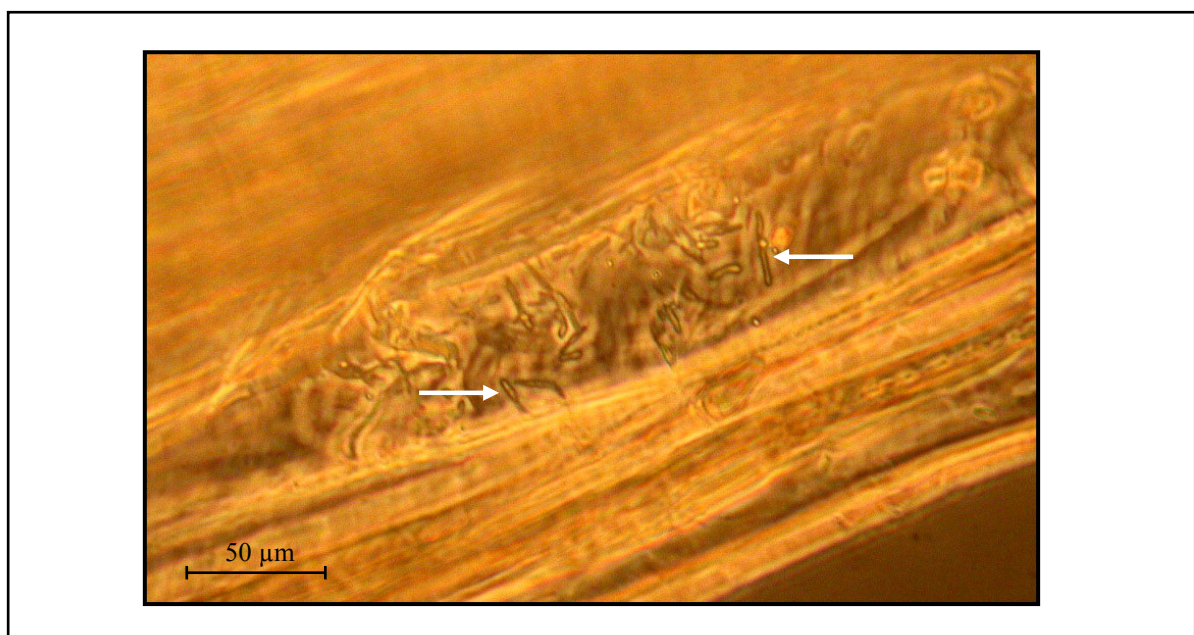


**Abb. 4.** Vorgeschlagener Stoffwechselweg für die Bildung der Mäuselton-Verbindungen 2-Acetyl-3,4,5,6-Tetrahydropyridin (ATHP) und 2-Ethyl-3,4,5,6-Tetrahydropyridin (ETHP) über Tetrahydropyridin (THP) durch *Brettanomyces/Dekkera* im Wein (nach Snowdon et al. 2006, abgeändert).

Für eine Untersuchung dieser Hefen ist die Kenntnis ihres Vorkommens und ihrer Verbreitung in der Weinproduktion von wesentlicher Bedeutung. Die am häufigsten aus Wein isolierte Art *Dekkera bruxellensis* ist Bestandteil der natürlichen Wildhefe-Flora, obwohl ihr Vorkommen auf Trauben kontrovers diskutiert wird (Fugelsang 1993, Licker et al. 1998). Wie bei anderen Wildhefen auch, erstreckt sich ihr Vorkommen auf nahezu alle mit der Weinherstellung in Zusammenhang stehenden Behälter und Geräte. Dementsprechend vielseitig sind auch ihre Infektionswege. Licker et al. (1998) beschreiben kontaminierte Fässer, Schläuche, Maschinen, aber auch Reinigungs-Abwässer, Insekten wie



Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) oder Bienen (*Apis mellifera*) und nicht zuletzt die Luft als Infektionsquellen für die Verbreitung von *Brettanomyces/Dekkera*. Der Reifung und Lagerung von Weinen in Holz- oder Barrique-Fässern als typische Vinifikationsmaßnahme (hauptsächlich bei Rotwein) kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu. Es erklärt darüber hinaus, warum diese Hefe hauptsächlich aus Rotweinen und weit weniger aus Weißweinen isoliert wurde. Fugelsang (1997) benannte hölzerne Gebinde als am häufigsten zitiertes Habitat von *Brettanomyces*. Hier überleben die Hefen geschützt in den Ritzen und Spalten (Abb. 5) des Fasholzes und überdauern lange Zeit bei mangelhaft durchgeführten Reinigungsmaßnahmen (Dittrich & Großmann 2005). Eichenholz-Fässer sind eine wohlbekannte ökologische Nische für *Brettanomyces/Dekkera* (Loureiro & Querol 1999). Obwohl Fässer aus Eichenholz gerade im Barrique-Ausbau wesentlich zur typischen Aromatisierung von Rotweinen beitragen stellen, sie doch wegen ihrer porösen, schlecht zu reinigenden und schwer zu sterilisierenden Oberfläche immer eine potentielle Infektionsquelle für unerwünschte Mikroorganismen dar. Das kontinuierliche Wiederbefüllen von Fässern und Umfüllen von Weinen führt somit zur Neuinfektion und Verbreitung dieser Schädlingshefen in den Winzerbetrieben. Zur Etablierung von *Brettanomyces/Dekkera* in neuen Barriques trägt bei, dass einige Arten Glucosidase-Aktivität besitzen und Cellulose-Fragmente verwerten können, die z. B. durch den Röstungsvorgang in Barrique-Fässern entstehen (Freer 1991, Fia et al. 2005).



**Abb. 5.** Mikroskopische Abbildung (Phasenkontrast) von *D. bruxellensis* Hefen (Pfeile) in einer Kavität von Holz. Mit Rasierklinge angefertigter Dünnschnitt.

Im Produktionsprozess findet eine Kontamination von Weinen durch Wachstum und Vermehrung von *Brettanomyces* Hefen hauptsächlich erst nach der alkoholischen und malolaktischen Fermentation statt, wo sie aufgrund ihrer hohen Alkoholtoleranz, ihres langsamen Wachstums und ihrer niedrigen Nährstoffansprüche einen Selektionsvorteil gegenüber der übrigen Weinflora besitzen. Aber auch nach der Abfüllung in der Flasche können sie dem Wein durch Trübung und Entwicklung von Fehltonen noch schaden (Suarez et al. 2007). Daher wird *Dekkera bruxellensis* heute in der internationalen Weinproduktion als Hauptursache für den Qualitätsverlust oder Verderb von hochwertigen Rotweinen, die in Eichenholz-Fässern gereift sind, angesehen.

Der „Pferdeschweiß-Ton“ ist im Nachhinein sehr schwierig und nur unter Qualitätseinbußen aus dem Wein zu entfernen (Eder et al. 2000; Steidel & Renner 2001). Als mögliche sanierende Maßnahme zur Entfernung oder Reduzierung von 4-Ethylphenol und 4-Ethylguajakol aus belastetem Wein wurde ein zweistufiger Prozess aus Umkehr-Osmose und Adsorption an Granulat beschrieben (Ugarte et al. 2005). Diese Methode entfernt jedoch auch andere, erwünschte Aroma-Verbindungen und kann die Wein-Qualität nachträglich beeinträchtigen. 4-Ethylphenol und 4-Ethylguajakol können auch durch den nach der Gärung anfallenden Bodensatz der Weinhefe *S. cerevisiae* im Wein reduziert werden (Chassagne et al. 2005). In diesem auch als „Biosorption“ bezeichneten Prozess erfolgt eine physikalische Aufnahme verschiedener Moleküle durch lebende oder tote Biomasse. Die Untersuchungen von Chassagne et al. (2005) führten zu dem Ergebnis, dass die von *Brettanomyces/Dekkera* gebildeten Phenole eine höhere Affinität zu inaktiven *S. cerevisiae*-Zellen aus dem Bodensatz besitzen als zu rehydratisierten Trockenhefe-Produkten. Diese Beobachtungen könnten zu der Entwicklung einer geeigneten und kostengünstigen Sanierungs-Methode für Brett-geschädigte Weine führen.

### **1.3 Methoden zur Detektion und Identifizierung**

Aufgrund der hohen potentiellen Schädigung von *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen, insbesondere in der Weinbereitung, ist die Entwicklung von schnellen, verlässlichen und kostengünstigen Detektions-Methoden für die Winzerbetriebe von großer Bedeutung.

Eine Isolierung und Differenzierung von weinrelevanten Hefen kann über die Kultivierung auf Selektiv- und/oder Differenzierungsmedien erfolgen und ist auch in der heutigen Praxis



unumgänglich. Das Augenmerk liegt hierbei auf der Differenzierung der Schädlingshefen von der „echten“ Weinhefe *Saccharomyces cerevisiae* oder von anderen „harmlosen“ Hefen und Pilzen. Die physiologischen Eigenschaften und Fähigkeiten der Schädlingshefen werden gezielt bei der Zusammensetzung des Mediums berücksichtigt. So hat sich in Bezug auf Wein die Zugabe von Ethanol (11 Vol. %) als selektives Agens in Medien zur Detektion von Schädlingshefen als erfolgreich herausgestellt (Loureiro & Malfeito-Ferreira 2003). Eine andere, häufig zur Differenzierung von eukaryotischen Mikroorganismen eingesetzte Verbindung ist Cycloheximid (Actidion). Cycloheximid inhibiert die Proteinbiosynthese in vielen eukaryotischen Organismen. Dieses Antibiotikum wird von dem Bakterium *Streptomyces griseus* produziert, hemmt die Peptidyl-Transferase-Aktivität der großen ribosomalen Untereinheit und verhindert so die translationale Elongation (Obrig et al. 1971). Da *Brettanomyces/Dekkera* Hefen im Gegensatz zu den meisten anderen Hefen und Pilzen noch bei 0,001 % - 0,1 % Cycloheximid im Medium wachsen können (Barnett et al. 2000) wird dieses Antibiotikum häufig zur Reduzierung der unerwünschten eukaryotischen Begleitflora verwendet. Ein wirkungsvolles *Dekkera/Brettanomyces*-Differenzierungsmedium (DBDM) wurde von Rodrigues et al. (2001) entwickelt und in ähnlicher Zusammensetzung auch in dieser Arbeit verwendet. Es basiert auf der Fähigkeit dieser Hefen zur Produktion von 4-Ethylphenol aus p-Cumarsäure, welches am charakteristischen Geruch leicht erkannt werden kann. In diesem Medium ist Ethanol die einzige Kohlenstoffquelle und die *Brettanomyces*-typische Essigsäure-Produktion kann durch einen Säure-Base-Indikator leicht detektiert werden (Rodrigues et al. 2001). Der Nachteil von Selektivmedien allgemein und von DBDM speziell liegt darin, dass längere Inkubationszeiten (bis zu zwei Wochen) als bei Wachstum auf normalen Nährmedien benötigt werden. Ursache hierfür ist der Stress, der durch die selektiven Bedingungen auf die Zellen ausgeübt wird. Neben dem erhöhten Zeitaufwand gibt es zahlreiche andere Probleme bei der Verwendung von Wachstumsexperimenten zur Detektion und Identifizierung von Schädlingshefen (Loureiro & Querol 1999, Loureiro & Malfeito-Ferreira 2003), wie die Notwendigkeit einer großen Anzahl von Tests zur Identifizierung von Hefen auf Art-Niveau, Art- und Stamm-abhängige Variabilitäten und Vitalitäts-abhängige Ergebnisse, die zu falschen oder zweifelhaften Identifizierungen führen können. Der Einsatz moderner, hauptsächlich molekularbiologischer Techniken hat sich als vorteilhaft gegenüber einer Klassifizierung von Mikroorganismen auf Basis morphologischer, biochemischer und physiologischer Eigenschaften herausgestellt. Als Folge der intensiven Untersuchung von Schädlingshefen wurden in den letzten zehn Jahren

viele verschiedenen Methoden zur Detektion und Identifizierung auf Art- und/oder Stamm-Ebene beschrieben. Viele dieser Methoden sind jedoch für den Routineeinsatz, insbesondere in der Getränkeindustrie, nicht geeignet (Loureiro & Querol 1999), aber dennoch von wissenschaftlicher Bedeutung.

Das Vorkommen bestimmter langkettiger Fettsäuren (hauptsächlich Linolsäure und Linolensäure) wurde bereits erfolgreich als Biomarker zur Gruppierung von Schädlingshefen herangezogen (Malfeito-Ferreira et al. 1997). Ein signifikantes Problem dieser Methode ist das Fehlen einer entsprechenden Datenbank mit hinterlegten Fettsäure-Profilen für relevante Schädlingshefen. Auf Protein-Ebene reflektieren die Unterschiede in den Aminosäure-Sequenzen von verschiedenen Organismen ihre genetische Divergenz. Der Austausch von Aminosäuren kann durch das unterschiedliche Laufverhalten der Enzyme in einer Gelelektrophorese detektiert werden. Die Untersuchung elektrophoretischer Isoenzym-Profile („Zymogramme“) ist ein nützliches taxonomisches Werkzeug und wurde sowohl zur Typisierung von klinischen Isolaten pathogener Hefen (Loureiro & Querol 1999) als auch zur systematischen Differenzierung von *Saccharomyces*-Arten eingesetzt (Duarte et al. 1999). Viele molekularbiologische Techniken bedienen sich der ribosomalen RNA Gene, die in mehreren hundert sich wiederholende Transkriptionseinheiten im Genom eukaryotischer Organismen auf mehreren Chromosomen vorliegen. Diese Gen-Cluster kodieren für die 18S, 5.8S und die 26S rRNAs und zwei „Internal Transcribed Spacer“ (ITS1 und ITS2). Diese Regionen sind ubiquitär verbreitet, enthalten konservierte und variable Sequenzbereiche und sind mit insgesamt ca. 6 kb Länge hinreichend groß für z. B. Restriktionsanalysen (RFLP, Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus). Insbesondere das 5.8S rRNA Gen mit den beiden flankierenden, zum Teil hochvariablen ITS-Regionen, aber auch die 18S rRNA wurden für eine PCR-Amplifizierung mit anschließender Restriktionsanalyse zur Identifizierung von verschiedenen Hefe-Spezies (Loureiro & Querol 1999) inklusive *Brettanomyces/Dekkera* (Egli & Henick-Kling 2001, Renouf et al. 2006) verwendet. Die AFLP-Methode (Amplifizierungs-Fragment-Längen-Polymorphismus) basiert auf der selektiven PCR von Restriktionsfragmenten, die bei einem vollständigen Restriktionsverdau genomischer DNA entsteht (Curtin et al. 2007). Die Verbindung der Polymerase-Ketten-Reaktion mit der denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (PCR-DGGE) ermöglichte die Untersuchung von komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften ohne einer vorherigen Spezies-Isolierung. Bei dieser Methode kann von der Anzahl der amplifizierten DNA-Fragmente des Bandenmusters direkt auf die Artenvielfalt geschlossen werden. Eine Identifizierung erfolgt dann durch

Sequenzierung des PCR-Produkts aus der jeweiligen Bande und einem Sequenz-Vergleich mit in Datenbanken hinterlegten DNA-Sequenzen. Renouf et al. (2006) untersuchten mit Hilfe dieser Technik unter ökologischen Gesichtspunkten die Hefe-Flora, inklusive *Brettanomyces*, im Verlauf der Weingärung. Weitere Untersuchungen auf Basis der PCR sind darüber hinaus die Randomly-Amplified-Polymorphic-DNA (RAPD)-PCR, die auf der Amplifizierung von zufälligen DNA-Segmenten mit Hilfe eines kurzen, unspezifischen Primers beruht und die Amplifizierung von einfachen, repetitiven DNA-Sequenzen, den so genannten Mikrosatelliten (Loureiro & Querol 1999). Beide Fingerprint-Methoden generieren ein Art- und/oder Stamm-spezifisches Bandenmuster, jedoch bleibt die Reproduzierbarkeit ein Hauptproblem der RAPD-PCR. Die in unserem Institut entwickelte nSAPD-PCR („nested Specifically Amplified Polymorphic DNA“) verbesserte sowohl die Differenzierungsmöglichkeiten als auch die Reproduzierbarkeit dieser Technik (Fröhlich & Pfannebecker 2006) und wurde bereits erfolgreich für eine Stammunterscheidung von *Dekkera bruxellensis*-Isolaten aus Weinproben (diese Arbeit) eingesetzt (Pfannebecker 2005). Die Amplifizierung mit externen und internen Primern („nested“-PCR) ist eine viel versprechende Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen. Mittels dieser konnten *Brettanomyces*-Arten aus Sherry (Ibeas et al. 1996) und ohne vorherige Isolierung und Kultivierung direkt aus Wein detektiert werden (Navascués & Rasines 2003). Der große Vorteil einer Real-Time oder quantitativen PCR (qPCR) liegt in der Möglichkeit der gleichzeitigen Quantifizierung einer mikrobiellen Population. Phister et al. (2003) entwickelten eine Real-Time PCR-Methode zur Detektion von *D. bruxellensis* in Wein mit einer Auflösungsgrenze von bis zu 1 Zelle/ml.

Eine andere Anwendung von Oligonukleotiden als zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen ist ihre Verwendung als molekulare Sonden in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Hierbei sind die Oligonukleotide mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und dienen als spezifische Sonden für eine mikroskopische Detektion ganzer Zellen in Untersuchungsproben. Diese Methode ist wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit und wird in dem nachfolgenden Kapitel näher beschrieben.

Die Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE) ermöglichte die Auftrennung von Hefe-Chromosomen (Deak 1995) und machte die auf Deletionen, Insertionen und Translokationen beruhenden chromosomalen Polymorphismen zum ersten Mal sichtbar. Da diese Technik komplex und zeitaufwendig ist und die Untersuchung einer größeren Anzahl von Proben nicht zulässt, wurden in der Literatur bisher kaum Anwendungen in Bezug auf Schädlingshefen beschrieben. Die Analyse des Genoms aus Mitochondrien (mtDNA) stellt

ein weiteres nützliches Werkzeug für taxonomische Studien dar. Hefen unterscheiden sich hinsichtlich der Größe und der Sequenz ihrer mtDNA signifikant. Die mitochondrialen Genome der *Brettanomyces/Dekkera*-Arten variieren in ihren Größen von 28 bis 101 kb (Hoeben et al. 1993). Esteve-Zarzoso et al. (1998) entwickelten eine mtDNA-Restriktionsanalyse zur Charakterisierung von Wildhefe-Stämmen, unter anderem auch von *Brettanomyces*-Arten. Bei der Durchführung der Methode ist eine Isolierung von Mitochondrien oder eine spezielle Aufreinigung der DNA nicht mehr notwendig.

Kurtzman (2006) diskutiert in einem Review weitere DNA-basierende Methoden zur Identifizierung von Hefen. Die Gensequenz-Analyse der Domänen 1 und 2 (D1/D2) in der DNA, die für die rRNA der großen ribosomalen Untereinheit kodiert (LSU rDNA), hebt er als besonders geeignet hervor (Kurtzman & Robnett 1998). Die Untersuchung dieser variablen Regionen hat sich bis heute etabliert und im Allgemeinen beschränken sich die Zielsequenzen für Primer- und Sonden-gestützte Methoden auch auf die D1/D2-Domänen am 5' Ende der LSU rDNA bzw. rRNA.

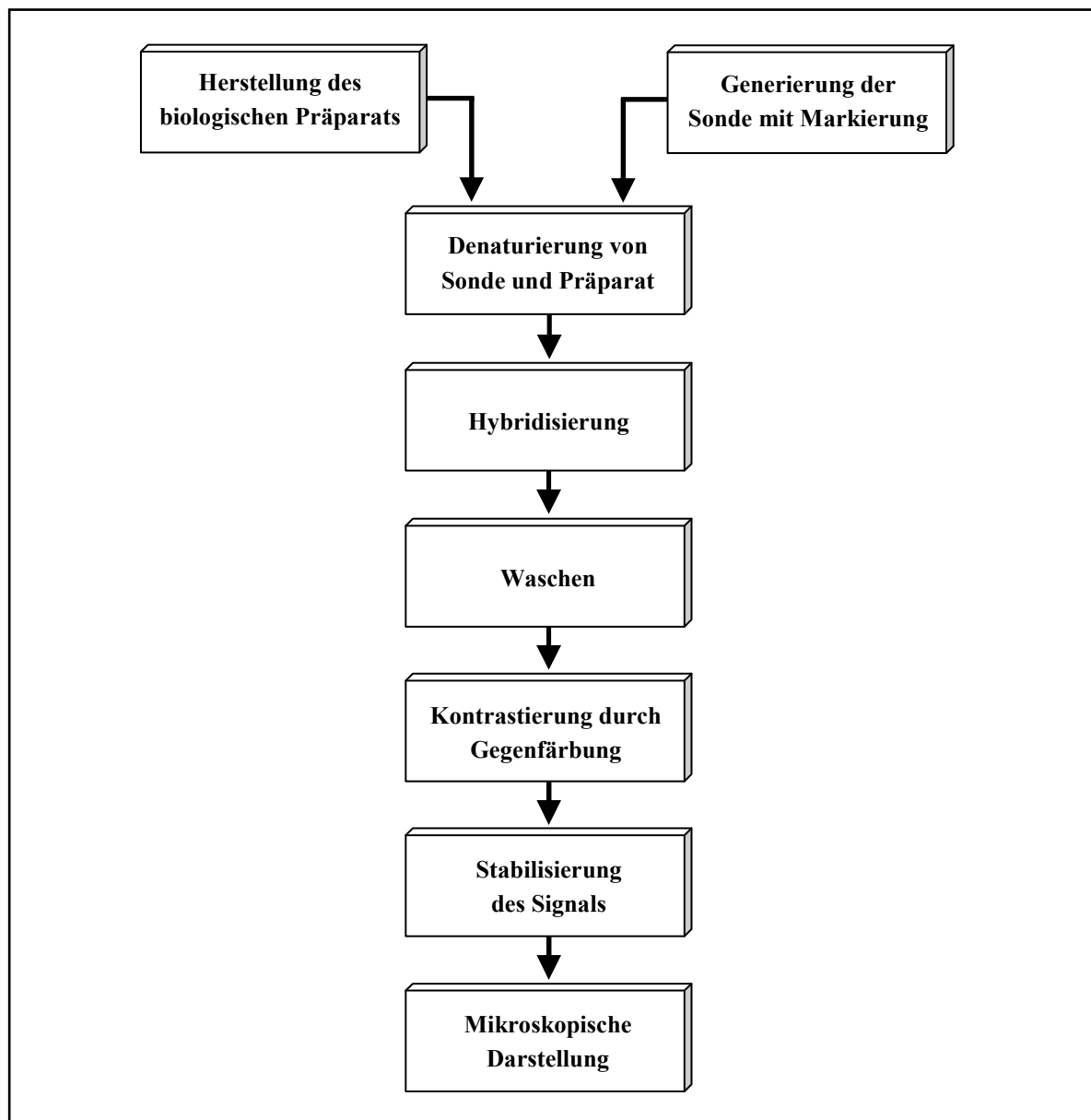
Schließlich kann eine Detektion signifikanter Mengen von Ethylphenolen im Wein ebenfalls als Indiz für eine Aktivität von *Brettanomyces/Dekkera* verwendet werden, da weder andere Hefen noch Milchsäurebakterien diese Verbindungen unter önologischen Bedingungen produzieren (Suárez et al. 2007). Eine Kombination von Gas-Chromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) kann 4-Ethylphenol und 4-Ethylguajakol mit hoher Sensitivität identifizieren und quantifizieren. Die Kopplung dieser Technik mit der sensorischen Analyse durch einen erfahrenen Prüfer (GC/MC/Olfaktometrie) ist eine sehr leistungsfähige Methode in der Qualitätskontrolle von Wein (Suárez et al. 2007). Allerdings hat diese Methode den Nachteil, dass es bei einem positiven Testergebnis für vorbeugende önologische Maßnahmen bereits zu spät ist.

Eine schnelle Identifizierung von unerwünschten Mikroorganismen ist in der Lebensmittelindustrie von besonderer Bedeutung. PCR-basierende Methoden können daher effizient in der Qualitätskontrolle zur Detektion und Identifizierung von Hefen eingesetzt werden. Trotz dieses Vorteils ergeben sich Schwierigkeiten in der Beurteilung der eigentlichen Kontamination durch fehlende Zellzahlbestimmungen bzw. das Fehlen einer Differenzierung von lebenden und toten Zellen. Die Isolierung von Schädlingshefen durch Selektiv- und/oder Differenzierungsmedien bleibt daher wichtiger Bestandteil einer umfassenden Betrachtung von Hefe-Infektion in der Nahrungs- und Getränkeindustrie.

## 1.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) von intakten Zellen ist besonders für die direkte Detektion und Identifizierung von Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung geeignet. Als primäre Methode geht sie nicht den Umweg über eine DNA-Isolierung, die durch Störstoffe aus der Untersuchungsprobe, Zell-Protein, Fremd-DNA oder RNA belastet sein kann, sondern die Zielregionen verbleiben in der Zelle und werden dort detektiert. Im Gegensatz zu Nukleinsäureanalysen durch eine Southern- oder Northern-Blot-Hybridisierung wird bei dieser Technik das Hybridisierungs-Signal nicht auf einer festen Trägermembran, sondern direkt im biologischen Präparat (in situ) sichtbar. Hinsichtlich des Signal-gebenden Systems gibt es neben dem direkten Nachweis (diese Arbeit) die Möglichkeiten der Autoradiographie und der Immuncytochemie (Leitch et al. 1994). Folglich richten sich die Methoden zum Nachweis und zur Visualisierung der Signale nach der Art der Markierung der Sonde. Radioaktiv markierte Sonden werden durch Autoradiographie nachgewiesen. Durch die Emissionsenergie der verwendeten Isotope werden Silberhalogenide in einer auf das Präparat aufgetragenen Emulsion zu metallischem Silber reduziert. Die Silberkörner markieren dann im Lichtmikroskop die Hybridisierungsstellen der Sonden. Bei der Immuncytochemie werden Nukleinsäuresonden, an die ein Markermolekül (z. B. Digoxigenin) gekoppelt ist, durch Antikörper nachgewiesen, die das eigentliche Signal tragen. In einem einstufigen Verfahren ist ein primärer Antikörper gegen die Markierung einer Sonde gerichtet. In der zweistufigen Form des Nachweisverfahrens bindet ein sekundärer Antikörper mit Signal an den primären Antikörper. Besitzt dieser mehrere Bindungsstellen (multiklonaler Antikörper) wird das Signal durch die Anbindung mehrerer sekundärer Antikörper verstärkt (Leitch et al. 1994). Nichtradioaktive Signale können durch Enzyme (Farbreaktionen/Präzipitate durch Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase), Metalle (kolloidales Gold), oder Fluoreszenzfarbstoffe, die an die Sonde bzw. den Antikörper gebunden sind, generiert werden. Die direkte Fluoreszenzmarkierung bietet gegenüber den anderen Signal-gebenden Systemen die Vorteile einer sehr guten Auflösung (keine Signalstreuung), eines geringen Zeitaufwands bis zur Darstellung des Ergebnisses, der Möglichkeit einer Mehrfachmarkierung, einer einfach durchzuführenden Gegenfärbung und einer relativ ungefährlichen Durchführung (keine radioaktive Strahlung). Die wichtigsten Arbeitsschritte der Fluoreszenz in situ Hybridisierung sind in Abbildung 6 dargestellt. Das biologische

Material wird zuerst präpariert und eine geeignete Nukleinsäuresequenz als Sonde mit einem Marker gekoppelt. Sowohl diese Sonde als auch das biologische Material werden anschließend denaturiert, damit alle Nukleinsäuren einzelsträngig vorliegen. Unter kontrollierten experimentellen Bedingungen hybridisiert dann die einzelsträngige Sonde mit einer komplementären einzelsträngigen Nukleinsäuresequenz des biologischen Präparats (Zielsequenz). Das neu gebildete doppelsträngige Molekül lässt sich aufgrund seiner Markierung nachweisen, indem die Region, an der die Hybridisierung stattgefunden hat, durch ein mikroskopisches Verfahren sichtbar gemacht wird.



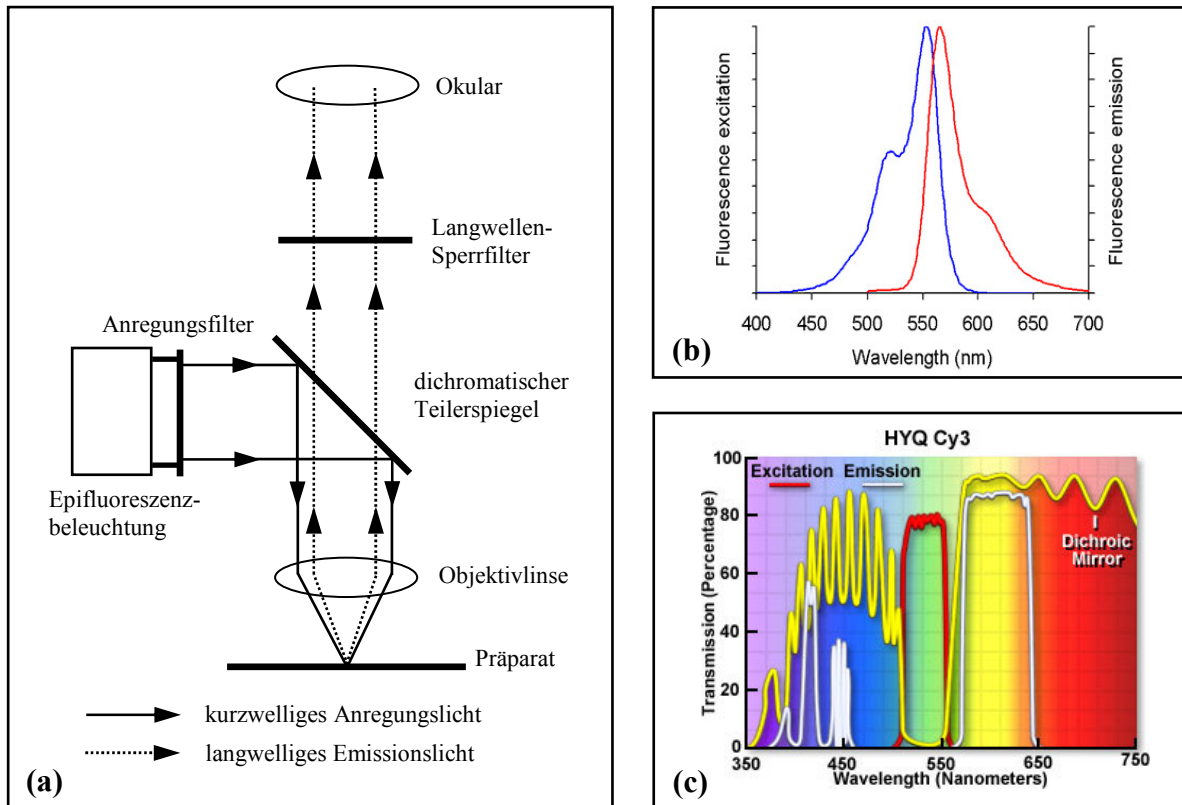
**Abb. 6.** Schematischer Überblick über den Ablauf der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).

Im Unterschied zur Durchlichtmikroskopie wird ein Präparat in der Auflichtmikroskopie von oben beleuchtet. Das hat den Vorteil, dass Objekte auch auf undurchsichtigen Trägermaterialien, wie z.B. Filter, sichtbar gemacht werden können. Außerdem erzeugt dieses Verfahren kontrastreichere Bilder als die Durchlichtmikroskopie, da Signal, Präparat und Hintergrundlicht unterschiedlich reflektieren. Mit dieser Technik können auch schwache Hybridisierungs-Signale sichtbar gemacht werden.

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass in delokalisierten Elektronensystemen von Fluoreszenzfarbstoffen Elektronen durch Photonen des Anregungslichts mit bestimmtem Energiegehalt auf höhere Energieniveaus gehoben werden können. Dieser Zustand ist instabil und kurzzeitig. Beim Zurückfallen in den Grundzustand wird Energie in Form von Licht freigesetzt. Dieses Fluoreszenzlicht ist immer energieärmer, also langwelliger als das Anregungslicht (Stokes'sche Verschiebung).

Wesentliches Bauelement eines Epifluoreszenzmikroskops ist ein so genannter Filterblock, der aus drei Einheiten besteht. Ein Filterblock besteht aus einem Anregungsfilter, einem dichromatischen Teilerspiegel und einem Sperrfilter (Abb. 7 a). Durch den Anregungsfilter wird im Mikroskop die geeignete Wellenlänge für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff, wie z. B. Cy3 (Abb. 7 b) eingestellt. Das Licht wird auf das Objektiv auf das Präparat fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht trifft auf den dichromatischen Teilerspiegel, der kurzwelliges Licht wieder zurück auf das Präparat reflektiert (Abb. 7 c). Längerwelliges Fluoreszenzlicht passiert den Teilerspiegel und trifft auf den Sperrfilter, der nur Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge durchlässt. Für jeden Fluoreszenzfarbstoff gibt es einen jeweils geeigneten Filterblock. Es gibt auch Kombinationsfilter, die zwei bis drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig darstellen können. Ein Filterwechsel ist in diesem Fall nicht mehr notwendig und die räumliche Ausrichtung des Präparats wird durch ein Umschalten des Filters nicht mehr beeinträchtigt.

Fluoreszenzfarbstoffe verblassen durch das Anregungslicht trotz der Anwendung von Antibleichmittel, wie z. B. DABCO (Leitch et al. 1994), schon nach kurzer Zeit. Daher muss das Ergebnis während der Epifluoreszenzmikroskopie relativ schnell photographisch dokumentiert werden.



**Abb. 7.** (a) Schematische Darstellung des Strahlengangs eines Epifluoreszenzmikroskops (nach Leitch et al. 1994, abgeändert). (b) Fluoreszenz-Spektrum des Sonden-Farbstoffs Cy3 (<http://probes.invitrogen.com/servlets/spectra?fileid=cy2igg>). (c) Wirkungsweise des dichroischen Teilerspiegels im Zusammenhang mit den Spektraldaten von Cy3 (<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/green/cy3/cy3index.html>). Die Transmission (Y-Achse) bezieht sich auf den Teilerspiegel („Dichroic Mirror“, gelbe Linie). Er lässt die Emissionsstrahlung hauptsächlich im gelb-orangen Spektralbereich passieren, während die Anregungsstrahlung im grünen Bereich reflektiert wird (Transmission gegen 0).

Die Detektion und/oder Identifizierung von weinrelevanten Mikroorganismen mit fluoreszenzmarkierten Sonden, die an spezifische Regionen der rRNA binden, wurde bereits in früheren Untersuchungen erfolgreich angewandt (Fröhlich et al. 2003, Hirschhäuser et al. 2005), einschließlich bei *Brettanomyces/Dekkera* und anderen Hefen (Stender et al. 2001, Xufre et al. 2006).

Die Effizienz der Hybridisierung zeigt sich in der Intensität des Fluoreszenz-Signals der Sonden und hängt nicht unwesentlich von der Permeabilität der Zellwand und dem Ribosomen-Gehalt der Zellen ab (Amann et al. 1995). Darüber hinaus ist die Zugänglichkeit der Zielregionen für die Sonden signifikant. Viele wissenschaftliche Studien setzen sich mit den Problemen des Sonden-Designs auseinander und diskutieren verschiedene



Möglichkeiten die Signalstärke zu verbessern. Es herrscht Übereinstimmung, dass schwache Sonden-vermittelte Fluoreszenz-Signale unter anderem auf Sekundär- und Tertiärstrukturen der rRNA, also rRNA-rRNA Interaktionen, und/oder auf Protein-rRNA Verbindungen in den Ribosomen zurückzuführen sind (Amann et al. 1995, Fuchs et al. 2000, Inacio et al. 2003). Die Publikation von Behrens et al. (2003a) deutet darauf hin, dass die Protein-rRNA Interaktionen bei *Escherichia coli* keinen signifikanten Einfluß auf die Zugänglichkeit der Zielsequenzen in der kleinen ribosomalen Untereinheit (SSU) haben. Durch systematische Untersuchung der Signalstärken aus Hybridisierungs-Experimenten konnten Karten entwickelt werden, die die in situ Zugänglichkeit der 16S rRNA (Behrens et al. 2003b) und 23S rRNA (Fuchs et al. 2001) von *E. coli*, sowie der D1/D2-Regionen der LSU rRNA von *S. cerevisiae* (Inacio et al. 2003) darstellen. Wenig später schlussfolgerten Yilmaz et al. (2004) jedoch, daß die Fluoreszenz-Ausbeute in FISH-Anwendungen nicht allein anhand der Zugänglichkeit von rRNA-Bereichen vorhersagbar ist, sondern im Wesentlichen von dem untersuchten Organismus und der genauen Position der Zielsequenz abhängt. Die Autoren berechneten in dieser Studie die Affinität der Sonde mit ihrer Zielregion auf Basis thermodynamischer Daten von nichtkovalenten Wechselwirkungen in Nukleinsäuren. Laut ihrer letzten Veröffentlichung (Yilmaz et al. 2006) gibt es keine wirklich unzugänglichen Zielbereiche in der 16S rRNA von *E. coli*. Für die Entwicklung von effizienten Fluoreszenz-Sonden empfahlen Yilmaz et al. die Berücksichtigung der thermodynamischen Affinität, der Hybridisierungs-Kinetik und der Quenching-Effekte durch Wechselwirkung des Sonden-Farbstoffs mit den Basen der Zielregion. Indes können die rRNA-Karten für *E. coli* und *S. cerevisiae* zur Darstellung von zugänglichen Regionen nicht ohne weiteres auf andere Mikroorganismen extrapoliert werden (Fröhlich et al. 2003), da sich ihr Geltungsbereich wahrscheinlich nur auf phylogenetisch nahe verwandte Arten erstreckt.

## 1.5 Untersuchungsobjekt Rheinhessenwein

Rheinhessen ist mit 26.281 Hektar (Stand 2006) Rebfläche die größte Weinbauregion in Deutschland (Deutsches Weininstitut GmbH; Mainz). Das Anbaugebiet umfasst über ein Viertel der deutschen Gesamtrebfläche. Somit kommt, rein statistisch, jeder vierte deutsche Wein aus Rheinhessen. 20 % der Region Rheinhessen in Rheinland-Pfalz, die auch die waldärmste Deutschlands ist, ist mit Rebstöcken bepflanzt. Die Weinbauregion Rheinhessen erstreckt sich linksrheinisch zwischen Mainz, Worms, Alzey und Bingen (Abb. 19). Die drei Bereiche Wonnegau, Bingen und Nierstein zerfallen in 24 Großlagen, die sich wiederum in 434 Einzellagen aufgliedern (Koch 1995; <http://www.biologie.de/biowiki/Rheinhessen>). Im Nordwesten der Region liegt der Bereich Bingen zwischen Alzey Ingelheim und Bingen. Östlich davon befindet sich der größte und bedeutendste Bereich Nierstein, der im Norden bis an die Landeshauptstadt Mainz heranreicht. Der Wonnegau erstreckt sich als südlichster und kleinster Bereich zwischen Worms und Alzey. Über 3500 Winzer produzieren pro Jahr mehr als 2,5 Mio. Hektoliter Wein (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden). Von den 136 Gemeinden Rhein Hessens betreiben nur 3 keinen Weinbau. Rheinhessen ist zudem eines der traditionsreichsten Anbaugebiete, in dem bereits seit 20 v. Chr. Wein angebaut wird (<http://www.biologie.de/biowiki/Rheinhessen>). In Nierstein befindet sich die älteste, urkundlich belegte Weinlage Deutschlands. Bis Anfang der 80er-Jahre wurde in Rheinhessen vornehmlich Quantität erzeugt, was sich in keinem allzu guten Ruf resultierte. Bekannt ist in diesem Zusammenhang die „Liebfrauenmilch“ aus der gleichnamigen Großlage. Seitdem hat jedoch ein Umdenken eingesetzt, und einer neuen Winzergeneration ist es zu verdanken, dass in Rheinhessen qualitativ hochwertige Weine erzeugt werden, die zu den besten in Deutschland gezählt werden (Ambrosi 2001). Auf die 13 Weinbauregionen in Deutschland bezogen kommt der größte Anteil an Prädikatsweinen (28,6 %, Stand 2005) aus Rheinhessen (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden). In einer weiteren Beziehung sind die rheinhessischen Winzer in Deutschland Vorreiter. Hier gibt es den größten Anteil an Öko-Winzern, die nach den Richtlinien des ökologischen Weinbaus arbeiten (Ambrosi 2001).

In Rheinhessen entstehen durch die lokal unterschiedlichen Bedingungen sehr unterschiedliche Weine. Nirgendwo sonst in Deutschland werden heute so viele verschiedene Rebsorten angepflanzt. Bereits 32,4 % der Rebfläche in Rheinhessen sind Rotweine (Stand 2006). 2002 waren es nur 25,1 % (Deutsches Weininstitut GmbH, Mainz).

Als Folge des Klimawandels und der Konsumenten-Nachfrage wird der Rotwein-Anbau in Zukunft voraussichtlich weiterhin ansteigen. Das Sortenspektrum wird von Weißweinen dominiert. Allen voran Müller-Thurgau (16,0 % der gesamten Rebfläche) und Riesling (12,2 %). Weiterhin Silvaner (9,5 %), Kerner (5,1 %) Grauer Burgunder (4,3 %), und Scheurebe (3,9 %). Bei den Rotweinen besitzt der Dornfelder den größten Anteil an der Gesamtfläche (13,3 %). Danach folgen Portugieser (6,8 %), Spätburgunder (5,1 %) und Regent (3,1 %). (Deutsches Weininstitut GmbH, Mainz, <http://www.deutscheweine.de>; Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, <http://www.destatis.de>).

In Zusammenhang mit der zunehmenden Rotweinproduktion steht der Ausbau von Weinen in Holz- oder Barrique-Fässern, die ein bevorzugtes Habitat für die hier untersuchten *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen darstellen (Kapitel 1.2). Die Bezeichnung Barrique leitet sich von dem im Bordeaux verwendeten Fass-Typ mit dem Volumen von ungefähr 225 Litern aus speziellem Eichenholz von Bäumen bestimmter Gegenden, z. B. aus dem französischen Limousin oder dem Allier (Steidl & Renner 2001), aber auch anderer Holzarten wie zum Beispiel Akazien oder Kastanien ab (Koch 1995; <http://www.wein-plus.de>). Durch den Barrique-Ausbau (Reifung) erfolgt ein Aromatisieren des Weines, weil zusätzliche Stoffe, insbesondere Gerbstoffe und Vanillin in den Wein gelangen. Außerdem wird der Wein durch den minimalen Luftaustausch (Mikroaerobisierung) beeinflusst. Der Wein erhält dadurch eine oxidative Reife. In Frankreich hat dieses Verfahren seit über 300 Jahren Tradition. Bereits durch einmaliges Verwenden eines Fasses verliert dieses bis zu 85 % seiner Aromen (<http://www.wein-plus.de>). Ein Barrique-Fass kann deshalb nur zwei- bis dreimal belegt werden und muß dann durch ein neues ersetzt werden. Eine Alternative ist die Rekonditionierung gebrauchter Barriques (<http://www.thonhauser.net>, <http://www.ktbl.de/weinbau/atw148.pdf>) bei der die Fässer gereinigt und die Innenseiten der Fassdauben abgehobelt werden. Das Barrique erhält außerdem eine neue „Röstung“ durch starkes Erhitzen. Der Grad der Röstung (Toastungsgrad) ist neben dem Alter des Fasses maßgeblich für die Entwicklung der typischen Aromen im Wein verantwortlich, wobei das Spektrum von „Vanille“ (schwächere Röstung) bis „Kaffee“ und „Kakao“ (stärkere Röstung) reicht (Steidl & Renner 2001). Bei dem Röstvorgang entstehen Zersetzungsprodukte von Cellulose (Cellodextrine, Cellobiose), die von einigen *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen verwertet werden können (Kapitel 1.2). Deshalb stellen auch neue Barrique-Fässer eine potentielle Infektionsquelle für *Brettanomyces* dar. Der Barrique-Ausbau wird vor allem bei Rotwein praktiziert, ist aber auch bei weißen Weinen zu finden (Ambrosi et al. 2002).

## 1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

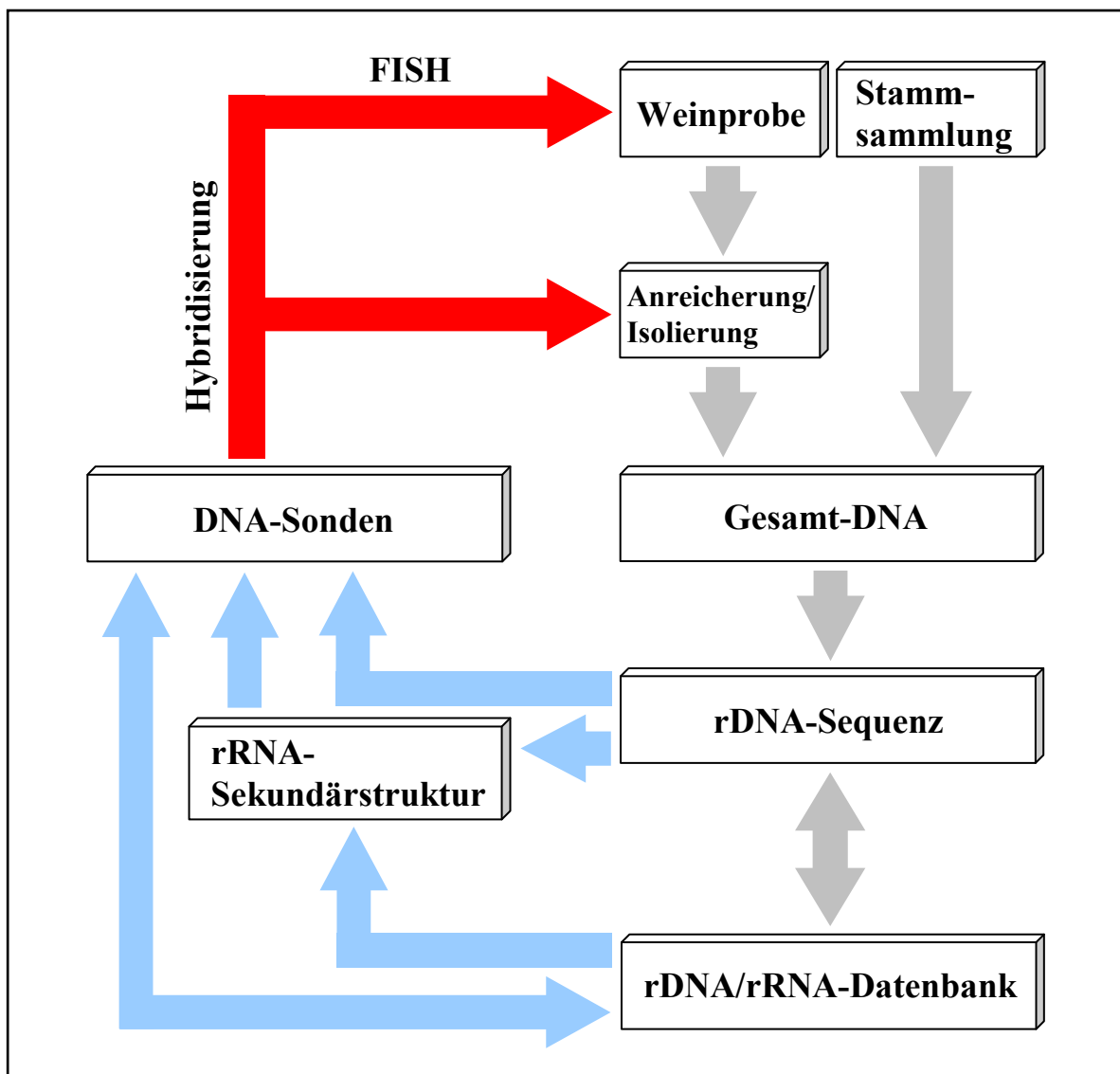
Das vorliegende Forschungsvorhaben dient dazu, die hauptsächlich in Wein und Most auftretenden Schädlingshefen der Gattungen *Brettanomyces* bzw. deren teleomorphe Form *Dekkera* zu detektieren und zu identifizieren. Dazu werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden in einer Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) eingesetzt. Die zuvor notwendige Generierung von Art-spezifischen DNA-Sonden soll anhand von rRNA-Sekundärstrukturen erfolgen. Dabei ermöglichen die spezifischen Sekundärstrukturen eine exakte Lokalisation der Sonden-Zielregionen und die Umsetzung eines neuen Gemeinschafts-Sonden Konzepts (Fröhlich et al. 2003). Hierbei unterstützen sich teilweise komplementäre oder direkt benachbarte Sonden gegenseitig in der Anbindung an die Zielregionen der hochstrukturierten rRNA. Im Gegensatz zu dem bisher bekannten Helfer-Prinzip mit unmarkierten Oligonukleotiden (Fuchs et al. 2000) sollen in dieser Arbeit alle verwendeten DNA-Sonden fluoreszenzmarkiert werden und dadurch die Signalstärke in der Zelle zusätzlich optimieren.

Die 26S rDNA gilt als besonders geeignet, um Hefen auf Artniveau zu unterscheiden (Kurtzman & Robnett 1998). Durch eine vollständige Sequenzierung der 26S rDNAs aller *Brettanomyces/Dekkera*-Arten sollen geeignete Sequenzbereiche zur Identifizierung der Hefe-Spezies aufgefunden werden. Die Sequenzdaten der 26S rDNAs sind für die fünf beschriebenen *Brettanomyces/Dekkera*-Spezies in öffentlichen Datenbanken bisher nicht oder nur teilweise und in schlechter Qualität (viele undefinierte Nukleotide) vorhanden. Außerdem sind die bekannten hochvariablen D1/D2-Regionen am 5'-Ende der Sequenzen für die Entwicklung von Oligonukleotid-Sonden zur Detektion und Identifizierung von Hefen der Gattung *Brettanomyces/Dekkera* patentrechtlich geschützt (Hyldig-Nielsen et al. 2000).

Die Untersuchungen gliedern sich in folgende Abschnitte (Abb. 8):

- DNA-Isolierung, Amplifizierung und Untersuchung der SSU/LSU rRNA-Gene und der ITS-Regionen aller *Brettanomyces/Dekkera*-Arten hinsichtlich ihrer Eignung als phylogenetische Marker für eine Art- und/oder Stamm-Differenzierung, insbesondere durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung.
- Vollständige Sequenzierung der 26S rRNA Gene der fünf *Brettanomyces/Dekkera*-Spezies zum Auffinden hochvariabler Sequenzbereiche.

- Generierung von Art-spezifischen Sekundärstrukturen der 26S rRNAs auf Basis einer bereits hinterlegten Sekundärstruktur von *Saccharomyces cerevisiae*.
- Entwicklung von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden gemäß dem Gemeinschafts-Sonden Konzept (Fröhlich et al. 2003, Röder et al. 2007a), das zur Optimierung der Signalstärke dient.
- Überprüfung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit bereits vorhandenen Gattungsspezifischen Sonden, die an die 18S rRNA von *Brettanomyces/Dekkera* binden.
- Untersuchung der Spezifität und der Signalstärke von den neu generierten 26S rRNA-gerichteten Sonden und Sonden-Mischungen (Gemeinschafts-Sonden) unter Berücksichtigung der Hybridisierungs-Temperatur.



**Abb. 8.** Schematischer Überblick über den gesamten Prozess der Entwicklung und Anwendung von rRNA-gerichteten DNA-Sonden. Details siehe Text und vgl. Kapitel Material und Methoden.

Die Differenzierung von lebenden und toten Zellen ist ein wichtiger Aspekt für eine Beurteilung der tatsächlichen Kontamination durch Schädlingshefen. Daher sollen in dieser Studie zusätzlich zur mikroskopischen Detektion und Identifizierung durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung verschiedene mikroskopisch auswertbare Vitalitätstests hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen überprüft werden.

Drei charakteristische physiologische Eigenschaften dieser Hefen, die in der entsprechenden Literatur häufig diskutiert werden, sollen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden. Im Einzelnen sind dies: die Acetat-Produktion, die Hydrolyse von Cellulose und die Sporulation von *Brettanomyces/Dekkera*-Spezies.

Der zweite, ökologisch orientierte Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit umfasst die Untersuchung der regionalen Verbreitung dieser Hefen in der Weinbauregion Rheinhessen. Dabei soll die neu entwickelte Sonden-Methode in der Praxis angewendet werden (Routine-Analysen) und ihre Sensitivität und Verlässlichkeit durch die Überprüfung einer möglichst großen Anzahl aus Wein isolierter *Brettanomyces/Dekkera*-Stämme abgesichert werden.

Folgende Aspekte wurden diesbezüglich berücksichtigt:

- Überprüfung der Anwendbarkeit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit den neu entwickelten DNA-Sonden auf *Brettanomyces/Dekkera*-Isolate aus Wein.
- Probennahme (Rotweine) in Winzerbetrieben der Bereiche Wonnegau, Nierstein und Bingen in der Weinbauregion Rheinhessen.
- Isolierung von *Brettanomyces/Dekkera*-Stämmen durch Kultivierungsversuche mit semiselektiven Medien. Detektion und Identifizierung über FISH und rDNA-Sequenzanalysen.
- Art- und Stamm-Differenzierung durch einen physiologischen Mikrotiterplatten-Test (Biolog, Hayward, USA).
- Darstellung der Ergebnisse durch Kartierung und statistische Erhebung.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Web-Adressen

#### Kultursammlungen

- <http://www.cbs.knaw.nl/databases/index.htm>
- <http://www.dsmz.de/>

#### Datenbanken zur Primer-, Sonden- und Sequenzanalyse

- <http://www.mwg-biotech.com/html/all/index.php>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.operon.com/oligos/toolkit.php>

#### Datenbanken für rRNA-Sequenzen und rRNA-Sekundärstrukturen

- <http://www.imb-jena.de/RNA.html>
- <http://www.rna.ccbb.utexas.edu/>

#### Informationen über Winzer und Weinproduktion in Rheinhessen

- <http://www.biologie.de/biowiki/Rheinhessen>
- [http://www.destatis.de/themen/d/thm\\_land.php](http://www.destatis.de/themen/d/thm_land.php)
- <http://www.deutscheweine.de/>
- <http://www.rheinhessenwein.de/winzer/index.php>
- <http://www.wein-wg.de/wwg/rheinhessen/>
- <http://www.wein-plus.de/>

#### Literatursuche

- <http://portal.isiknowledge.com/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>
- <http://www.scopus.com/scopus/home.url>

## 2.2 Geräte und Hilfsmittel

- Agarose-Elektrophorese-Einheit (Bio-Rad, München)
- Computersoftware zum Sequenzvergleich und zur Stammbaum-Analyse
  - ClustalX 1.83 (Thompson et al. 1997)
  - PHYLIP Package 3.65 (Felsenstein 1989)
  - Tree View 1.6.6 (Page 1996)
- Computersoftware zur Generierung von RNA Sekundärstrukturen
  - RNAstructure 4.2 (Mathews et al. 2004)
  - GSview 4.4
- Computersoftware für Mikrotiterplatten-Assays
  - MikroWin 2000 (Mikrotek Laborsysteme, Overath)
- Deckgläser 18 x 18 mm, 24 x 60 mm (Menzel, Braunschweig)
- Diagnostik Objekttrüge, teflonbeschichtet (Menzel, Braunschweig)
- Digitalkamera Coolpix 4500 (Nikon, Tokyo, Japan)
- Fluoreszenzmikroskop Axiophot 2 (Zeiss, Göttingen)
- Filtersätze (Zeiss, Göttingen; AF Analysetechnik, Tübingen)
  - 01 (Anregung: 365 nm, Emission: 397 nm)
  - 10 (Anregung: 450-490 nm, Emission: 515-565 nm)
  - 28 (Anregung: 406-423 nm, 530-545 nm, Emission: 430-467 nm, 618-675 nm)
  - F41-007 (Anregung: 575 nm, Emission: 605 nm)
- Geldokumentationseinheit (Polaroid, Offenbach) inkl. Bedienungssoftware (Intas, Göttingen)
- Hybridisierungsgefäße Cellstar<sup>®</sup> 50 ml PP-Tubes (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
- Hybridisierungsofen (Shel Lab, Oregon, USA)
- Mikroskop Laborlux 11 (Leitz, Wetzlar)
- Mikrotiterplatten-Reader Multiskan Plus MKII (Dunn, Labortechnik, Asbach)
- Mikrotiterplatten-Test, YT MicroPlate<sup>™</sup>, Biolog Inc., Hayward, USA
- pH-Meter CG840 (Schott, Mainz)
- Photometer 1101 M (Eppendorf, Hamburg)
- Sterilfilter Minisart<sup>®</sup> 0,22 µm (Sartorius, Göttingen)



- Thermocycler
  - Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg)
  - Progene-Techne (Thermo-Dux, Wertheim)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
- Transilluminator (Biometra, Göttingen)
- Vortex-Gerät Vibrofix VF1 Electronic (Ika Labortechnik, Staufen)
- Zentrifugen
  - Centrifuge 5403 (Eppendorf, Hamburg)
  - Biofuge pico (Heraeus, Osterode)

## 2.3 Verwendete DNA- und RNA-Sequenzen

**Tab. 2.** Für die Generierung von Primern, phylogenetischen Stammbäumen und Sekundärstrukturen verwendete DNA- und RNA-Sequenzen aus Datenbanken.

Organismus	Sequenz	Zugriffsnummer (Acc.) <sup>a</sup>
<i>Dekkera anomala</i>	18S rDNA	X83818
<i>Dekkera bruxellensis</i>	18S rDNA	X58052
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18S rDNA	Z75578
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ITS-Region	Z95939
<i>Candida albicans</i>	LSU rDNA	X70659
<i>Endomyces fibuliger</i>	LSU rDNA	U09238
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LSU rDNA	J01355
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	LSU rDNA	Z32848
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LSU rDNA / rRNA <sup>b</sup>	U53879

<sup>a</sup> NCBI-Datenbank (GenBank).

<sup>b</sup> LSU rRNA-Gensequenz und -Sekundärstruktur (<http://www.rna.cccb.utexas.edu/>).

## 2.4 Chemikalien

- Agar (Difco, Detroit)
- Agarose: peqGold Standard-Agarose (Peqlab, Erlangen)
- Ampicillin (Sigma, München)
- $\beta$ -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)
- Borsäure (Roth, Karlsruhe)
- Bromkresolgrün (Sigma, München)
- Calciumcarbonat (Merck, Darmstadt)
- Carboxymethylcellulose (Fluka, Neu-Ulm)
- Cycloheximid (Sigma, München)
- DABCO (Sigma, München)
- DAPI (Fluka, Neu-Ulm)
- Dextransulfat (Roth, Karlsruhe)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth, Karlsruhe)
- EDTA (Roth, Karlsruhe)
- Essigsäure (Roth, Karlsruhe)
- Ethanol (Roth, Karlsruhe)
- Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe)
- Fluoresceindiacetat (Fluka, Neu-Ulm)
- Glucose (Merck, Darmstadt)
- Glycerin (Roth, Karlsruhe)
- Hefeextrakt (Marcor, NJ, USA)
- Kongorot (Sigma, München)
- Kadifit SO<sub>2</sub> (Erbslöh, Geisenheim)
- Kalium-Acetat (Roth, Karlsruhe)
- Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe)
- Natriumhydroxid (Roth, Karlsruhe)
- Natriumdodecylsulfat (Merck, Darmstadt)
- p-Cumarsäure (Fluka, Neu-Ulm)
- Pepton (Roth, Karlsruhe)
- TRIS/HCl (Roth, Karlsruhe)
- Triton<sup>®</sup> X-100 (Merck, Darmstadt)
- Wasser (deion.): Milli RO Plus (Millipore, Eschborn)

## 2.5 Molekularbiologische Reagenzien und Kits

- DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kit (Qiagen, Hilden)
- DNA-Längenstandards (Fermentas, St. Leon-Rot)
  - GeneRuler<sup>™</sup> 100 bp DNA ladder
  - Lambda DNA/EcoRI+Hind III, Marker 3
- dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Peqlab, Erlangen)
- Live/Dead<sup>®</sup> Yeast Viability Kit:
  - Fun<sup>®</sup> 1, Calcofluor White (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon)
- Lyticase (Fluka, Neu-Ulm)
- Magnesiumchlorid-Lösung (25 mM) (Peqlab, Erlangen)
- MassRuler<sup>™</sup> (6 x) Loading Dye Solution (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Oligonukleotide (MWG, Ebersberg; Operon, Köln):
  - PCR-Primer (100 µM)
  - FISH-Sonden, Cy3 modifiziert (5'-Ende) (100 µM)
- PCR-Puffer (10x) (Peqlab, Erlangen)
- QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- Ribonuklease A (Roche, Mannheim)
- SYTOX<sup>®</sup> Green Nucleic Acid Stain (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon)
- Taq-Polymerase SAWADY (5U/µl) (Peqlab, Erlangen)

**Tab. 3.** Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und Filtersätze für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung und die Lebend-/Totzellenfärbungen

Farbstoff	Anregung (nm) <sup>a</sup>	Emission (nm) <sup>a</sup>	Filter <sup>b</sup>
DAPI <sup>c</sup>	358	461	01, 28
FDA	495	513	10
SYTOX <sup>®</sup> Green <sup>c</sup>	504	523	10
Fun <sup>®</sup> 1	480	590	10, 28
Calcofluor White	440	510	10, 28
Cy3 <sup>c</sup>	547	563	F41-007, 28

<sup>a</sup> Maximalwerte der jeweiligen Spektren.

<sup>b</sup> Bezeichnung entsprechend den Herstellerangaben (Zeiss, Göttingen; AF Analysetechnik, Tübingen).

<sup>c</sup> An DNA assoziiert.

## 2.6 Oligonukleotide (Primer)

**Tab. 4.** Verwendete Primer zur Amplifizierung der ITS1/5.8S/ITS2 Regionen, der partiellen 18S rDNAs, der kompletten 26S rDNAs sowie für die schrittweise Sequenzierung der 26S rDNAs

Primer <sup>a</sup>	Sequenz (5'→3')	Relative Position <sup>b</sup>	GC (%)	T <sub>m</sub> (°C) <sup>c</sup>
ITS1/5.8S rDNA/ITS2 Sequenz				
ITS1 (For)	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	1770-1789	63	61.0
ITS4 (Rev)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	154-173	45	55.3
partielle 18S rDNA-Sequenz				
Oxy 5.1 (For)	CCA GCA GC(C/T) GCG GTA ATT	565-582	58	57.1
ITS2 (Rev)	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	393-412	55	59.4
26S rDNA-Sequenz				
For-26S-1	CTC AAA TCA GGT AGG AGG	121-138	50	53.7
Rev-26S-2	CGT AAC AAC AAG GCT AC	3454-3470	47	50.4
26S rDNA-Sequenzierung				
26S-Rev-1	CTT GTT CGC TAT CGG TC	449-465	53	52.8
26S-For-2	GTT GTT TGG GAA TGC AGC	386-403	50	53.7
26S-Rev-2	CTA TTC AGG CAT AGT TCA C	925-943	42	52.4
26S-For-3	CTT GAA ACA CGG ACC AAG	753-770	50	53.7
26S-Rev-3	GTC TAG ATG AAC TAA CAC C	1318-1336	42	52.4
26S-For-4	GTA AGC AGA ACT GGC G	1239-1254	56	51.7
26S-Rev-4	CTC CGG ATA AAC CAA TTC	1824-1841	44	51.4
26S-For-5	GAA TGT GGA GAC GCC G	1757-1772	63	54.3
26S-Rev-5	CAC TGG GCA GAA ATC AC	2297-2313	53	52.8
26S-For-6	GAA CTG GTA CGG ACA AG	2217-3233	42	52.8
26S-Rev-6	GAG ATT TCT GTT CTC CAT G	2778-2796	59	52.4
26S-For-7	CAT TGT CAG GTG GGG AG	2706-2722	59	55.2
26S-Rev-7	CAG TAG GGT AAA ACT AAC C	3081-3099	42	52.4
26S-For-8	CGG CTC TTC CTA TCA TAC	2985-3002	50	53.7

<sup>a</sup> Forward (For) und Reverse (Rev) Primer.

<sup>b</sup> Die Positionsangaben beziehen sich auf Sequenzen von *Saccharomyces cerevisiae* (Z75578 / ITS1, Oxy 5.1; J01355 / ITS4, For-26S-1, For-26S-2, 26S-Rev-1 bis 26S-For-8; Z95939 / ITS2).

<sup>c</sup> Mittlere Schmelztemperaturen laut Herstellerangaben (Formel siehe unten).

Formel zur T<sub>m</sub>-Berechnung (MWG, Ebersberg):  $T_m [°C] = 69.3 + 41 \frac{(nG + nC)}{L} - \frac{650}{L}$

n = Anzahl der jeweiligen Basen; L = Länge des Oligonukleotids (> 15)

## 2.7 Oligonukleotide (Cy3-markierte Sonden)

**Tab. 5.** 18S rRNA-gerichtete, Cy3-markierte DNA-Sonden für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Sonde	Sequenz (5'→3')	Relative Position <sup>a</sup>	GC (%)	T <sub>m</sub> (°C) <sup>b</sup>
B_bru_x_anom1	GTC CCA GGT GAG GGT CG	1700-1716	71	60.0
B_bru_x_anom2	CTC CCA GGT CCA ATC CTG A	1676-1694	58	58.8
B_anom3	TCA ACA CCC GAA GGT GCC TA	705-724	55	59.4
B_bru_x_anom4	ACC GGC CCC CCA AGC C	642-657	81	62.0
B_bru_x_anom5	TCG GGC GGT TA(C/T) CCA GTA CTC GCC G	666-690	66	70.4
B_bru_x_anom5a	TA(C/T) CCA GTA CTC GCC GAA TGG	661-681	55	60.8

<sup>a</sup> Die Positionsangaben beziehen sich auf die Sequenz von *Saccharomyces cerevisiae* (Z75578).

<sup>b</sup> Mittlere Schmelztemperaturen laut Herstellerangaben (Kapitel 2.6).

**Tab. 6.** 26S rRNA-gerichtete, Cy3-markierte DNA-Sonden für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Sonde <sup>a</sup>	Sequenz (5'→3')	Relative Position <sup>b</sup>	Spezifische Basen <sup>c</sup>	GC (%)
26S-D.anom. 1.1	TAC CGC ACC CGA AGG CAC T	2115-2133	3	63
26S-D.anom. 1.2	TGT CCG CGT CTA GAC ACG	2150-2167	3	61
26S-D.anom. 1.3	CGG AGG CTG GTA CCT GT	2165-2181	2	65
26S-D.anom. 2.1	GGA TCA ACG GCA CAA AAG GC	2680-2699	3	55
26S-D.anom. 3/4.1	CCT TAA CAG AAT TAA GGC GTT G	1668-1689	2	41
26S-D.bru_x. 1.1	CGT CTA GGC CTC GCC GT	2145-2161	3	71
26S-D.bru_x. 1.2	CAA GAC CCT TCT CCC AAC A	2076-2094	2	53
26S-D.bru_x. 1.3	CAA GTG CAC AGC TAT CTC C	2103-2121	2	53
26S-D.bru_x. 2.1	CGG ATC AAC GGC CTA ATA C	2680-2698	3	53
26S-D.bru_x. 3/4.1	TTA CGT TGC CGT CGT AAT AAA TT	1737-1759	2	35
26S-D.bru_x. 3/4.2	GGC ATG AAG AAT ATC TGT CTT C	1918-1939	2	41
26S-D.bru_x. 5.1	CTT ACT CAA ATC CCT CCG GT	879-898	2	50
26S-B.custer. 1.1	TAC CGG AAC GAC CGC AGT	2178-2195	5	61
26S-B.custer. 1.2	TGT CAC AGG CCT CTA CAT TG	2149-2168	3	50
26S-B.custer. 1.3	TCG CAG CGT CAT CCC G	2078-2093	5	69
26S-B.custer. 2.1	CCC GGA TCA CCT ATA GAT AG	2678-2697	4	50
26S-B.custer. 3/4.1	CTG AAT ATT GCT TCG TTC CTG	1916-1936	5	43
26S-B.custer. 3/4.2	CGC TTA CGT TGC CGT CTC	1740-1757	3	61
26S-B.custer. 3/4.3	TTT ACA GAG TTA CCT TAC TCC	1648-1668	9	38
26S-B.custer. 3/4.4	GAG GCA GTA TAC AAA AGT ACA C	1672-1693	7	41

Tab. 6. Fortsetzung

Sonde <sup>a</sup>	Sequenz (5'→3') <sup>c</sup>	Relative Position <sup>b</sup>	Spezifische Basen <sup>c</sup>	GC (%)
26S-B.custer. 6.1	GGA ACT AGA ACA CCC ACC	3355-3372	3	56
26S-B.custer. 6.2	CAC GCT CCC CTA GTA TG	3321-3337	5	59
26S-B.custer. 6.3	TCC AGC GAC CTT ACG GC	3298-3314	3	65
26S-B.nanus 1.1	TGG TCG TTA CTG GGA GCT	2184-2201	4	56
26S-B.nanus 1.2	CTC GCC TTT CGG TGT CTC	2066-2083	4	61
26S-B.nanus 1.3	CGA AAA CTG AGC TTT GCG A	2165-2183	5	47
26S-B.nanus 1.4	TTC CAA AAA CCC CGC TTC G	2085-2103	6	53
26S-B.nanus 1.5	GTT TTC GAA CAG AAC AGG GC	2144-2163	6	33
26S-B.nanus 1.6	GGT CGT AAA ACT TGT AAA ACT	2113-2133	8	33
26S-B.nanus 2.1	GGA CAC GCC GCT TTT GCT A	2665-2683	3	58
26S-B.nanus 3/4.1	CTT TCG ATG GAC ACT TGA TCA G	1674-1695	4	46
26S-B.nanus 3/4.2	CGG AAT CTT GAC CGG G	1707-1722	2	63
26S-B.nanus 3/4.3	CGG CTA ACG TTT GAG TAA GG	1870-1889	7	50
26S-B.nanus 5.1	TCA AAT CCG GCC ACC GC	872-888	4	65
26S-B.nanus 5.2 <sup>d</sup>	CTG CAC GCC TTC ACA GC	842-858	4	65
26S-B.nanus 5.3	GCG TAT TGG GTT TTA CTC AC	798-817	3	45
26S-B.nanus 6.1 <sup>d</sup>	TTC CGC ATG TAC GCC GC	3336-3352	3	65
26S-B.naard. 1.1	GGG ACG CCG CCG AAG CA	2182-2198	10	77
26S-B.naard. 1.2	CCC ACC TAC TCG ACC CTT A	2055-2073	4	58
26S-B.naard. 1.3 <sup>d</sup>	GCC CGA AAG CTC TTC TCC C	2115-2133	7	63
26S-B.naard. 1.4	TGT CTA AGA CTA GGA GAA GGA	2150-2170	7	43
26S-B.naard. 1.5	CGC CTC TTC TAC CAC CCA	2076-2093	3	61
26S-B.naard. 2.1	AAT TGC CCT TTA ACC GGC GT	2674-2693	5	50
26S-B.naard. 3/4.1	GTA AAT TAG CCT TTT GAA ACG GAG	1660-1683	3	38
26S-B.naard. 3/4.2	TTC CCT TTC GAT AGG AGG CT	1687-1706	3	50
26S-B.naard. 5.1 <sup>d</sup>	GTA AGG GCT CCG TCC TAC	830-847	2	61
26S-B.naard. 5.2	TCC TTC CAA TAA ATA TCT GGA TCG	865-888	2	38
26S-B.naard. 6.1 <sup>d</sup>	CGC CAA GAG TGC CAG C	3335-3350	2	57
26S-B.naard. 6.2 <sup>d</sup>	GCA GAC ACC CAA GGC C	3355-3370	2	57

<sup>a</sup> Spezifische Sonden für *D. anomala* (D.anom.), *D. bruxellensis* (D.brux.), *B. custersianus* (B.custer.), *B. nanus* (B.nanus) und *B. naardenensis* (B.naard.). Die  $T_m$ -Werte sind in Tabelle 14 dargestellt.

<sup>b</sup> Die Positionsangaben beziehen sich auf die Sequenz von *Saccharomyces cerevisiae* (J01355).

<sup>c</sup> Die spezifischen Basen (rot-markiert) unterscheiden sich von allen anderen *Brettanomyces/Dekkera*-Arten und von *Saccharomyces cerevisiae* (U53879).

<sup>d</sup> Sonden generiert, aber nicht getestet.

## 2.8 Puffer und Lösungen

### 2.8.1 DNA-Isolierung aus Hefen

#### ➤ Sorbitol-Lösung

▪ Sorbitol	1 M
▪ EDTA	100 mM
▪ $\beta$ -Mercaptoethanol	14 mM
▪ deion. Wasser	ad 50 ml

### 2.8.2 Gelelektrophorese

#### ➤ Agarosegel (1,5 %)

▪ Agarose	1,2 g
▪ 1 x TBE-Puffer	80 ml

#### ➤ TBE-Elektrophoresepuffer (10 x, pH 8,3)

▪ TRIS/HCl	890 mM
▪ Borsäure	890 mM
▪ EDTA	20 mM
▪ deion. Wasser	ad 1000 ml

### 2.8.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

#### ➤ Ethanolreihe (50 %, 70 %, 96 %)

- Ethanol (96 %) in deion. Wasser

#### ➤ Hybridisierungspuffer

▪ TRIS-Puffer (pH 7,2)	200 mM
▪ NaCl-Lösung	2,7 M
▪ SDS-Lösung	10 %
▪ Dextransulfat	0,1 g
▪ deion. Wasser	ad 1 ml

➤ **Waschpuffer**

- Identische Zusammensetzung wie der Hybridisierungspuffer, jedoch ohne Dextransulfat.

➤ **Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide**

- Cy3-Sonden 50 pmol/μl
- in sterilem, deion. Wasser

➤ **DAPI (1000 x)**

- DAPI 2 mg
- steriles, deion. Wasser ad 1 ml

➤ **DABCO**

- DABCO 234 mg
- Glycerin 8 ml
- steriles, deion. Wasser ad 10 ml

### 2.8.4 Färbungen

➤ **Kongorot-Färbelösung**

- Natriumhydroxid 2 mM
- Kongorot 0,2 %
- deion. Wasser ad 1000 ml

➤ **Kongorot-Entfärbelösung**

- NaCl 1 M
- NaOH 2 mM
- deion. Wasser ad 1000 ml



## 2.9 Medien

### ➤ YPG-Medium (pH 6,5)

▪ Hefeextrakt	10 g
▪ Pepton aus Fleisch	20 g
▪ Glucose	10 g
▪ Calciumcarbonat	10 g
▪ Agar	15 g
▪ deion. Wasser	ad 1000 ml

Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurden 20 mg Cycloheximid (0,002 %) und 100 mg Ampicillin (0,01 %) in das Medium zugegeben. Beide Antibiotika wurden zuvor in Lösung mit einem geeigneten Filter (Porengröße 0,22 µm) steriltitriert.

Für die Anreicherung aus Weinproben wurden jeweils 5 ml YPG-Flüssigmedium mit Cycloheximid und Ampicillin (Konzentrationen s. o.) in Reagenzgläsern angesetzt.

### ➤ DBDM (*Dekkera-Brettanomyces-Differenzierungs-Medium*)

nach Rodrigues et al. 2001 (abgeändert)

▪ Hefeextrakt	10 g
▪ Pepton aus Fleisch	20 g
▪ Glucose	10 g
▪ Agar	20 g
▪ Ampicillin	80 mg
▪ Cycloheximid	20 mg
▪ p-Cumarsäure	100 mg
▪ Bromkresolgrün	22 mg
▪ Ethanol (reinst, 99 %)	60,6 ml
▪ deion. Wasser	ad 1000 ml

Ampicillin, Cycloheximid und Ethanol wurden nach dem Autoklavieren des Grundmediums steril zugegeben.

➤ **CMC (Carboxymethylcellulose) -Agar**

- Carboxymethylcellulose 10 g
- Triton® X-100 1 ml
- Agar 15 g
- deion. Wasser ad 1000 ml

Als obere Schicht (0,5 cm) auf YPG-Agarplatten.

➤ **Sporulationsmedium (Malzagar)**

- Malzextrakt 30 g
- Agar 20 g
- deion. Wasser ad 1000 ml

➤ **SPA-Sporulationsmedium**

- Kalium-Acetat 10 g
- Hefeextrakt 2,5 g
- Glucose 1 g
- Agar 20 g
- deion. Wasser ad 1000 ml

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Nährmedien bei 121 °C für 20 min autoklaviert und nach dem Abkühlen auf ca. 50-60 °C in sterile Petrischalen gegossen.

## 2.10 Organismen und Kultivierung

### 2.10.1 *Brettanomyces/Dekkera*-Institutsstämme

Die Typstämme der fünf bisher bekannten *Brettanomyces/Dekkera*-Arten sowie einige *D. bruxellensis*-Isolate waren in der Kulturensammlung des Instituts vorhanden (Tab. 7).

**Tab. 7.** *Brettanomyces/Dekkera*-Institutsstämme

Stamm	Gattung / Art	Herkunft <sup>a</sup>	Isoliert aus	Land
St. 374	<i>D. bruxellensis</i>	IMW	Sekt	Deutschland
St. 566	<i>D. bruxellensis</i>	IMW	Sekt	Deutschland
St. 567	<i>D. bruxellensis</i>	IMW	Sekt	Deutschland
St. 568	<i>D. bruxellensis</i>	IMW	Sekt	Deutschland
St. 569	<i>D. bruxellensis</i>	IMW	Sekt	Deutschland
St. 573	<i>D. bruxellensis</i>	AG Henick-Kling	Wein	USA (NY)
DSM 70732 <sup>T</sup>	<i>D. anomala</i>	DSMZ	Bier	Deutschland
DSM 70001 <sup>T</sup>	<i>D. bruxellensis</i>	DSMZ	Lambic Bier	Belgien
CBS 4805 <sup>T</sup>	<i>B. custersianus</i>	CBS	Bantu Bier	Südafrika
CBS 1945 <sup>T</sup>	<i>B. nanus</i>	CBS	Flaschenbier	Schweden
CBS 6042 <sup>T</sup>	<i>B. naardenensis</i>	CBS	Limonade	Niederlande
St. 579	<i>D. bruxellensis</i>	AG Henick-Kling	Wein	USA (CA)

<sup>a</sup>Institut für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW) in Mainz; Cornell University, Department of Food Science and Technology (AG Henick-Kling) in New York (USA); Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig; Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Utrecht (Niederlande).

<sup>T</sup> = Typstamm.

Die *Brettanomyces/Dekkera*-Institutsstämme wurden als Reinkulturen auf YPG-Schrägagar (ohne Cycloheximid) in Stammhaltung genommen. Nach dem Anwachsen (ca. 1 Woche bei 30 °C; *B. nanus* und *B. naardenensis* bei 20 °C) wurden die Hefen im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt und alle 3 Monate auf neuen YPG-Schrägagar überimpft. Für DNA-Isolierung, Färbungen, Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und Stoffwechselversuche wurden die Stämme auf YPG-Agar-Platten (ohne Cycloheximid) ausgestrichen und bei 30 °C (*B. nanus* und *B. naardenensis* bei 20 °C) 3-4 Tage (*B. nanus* 1 Woche) bis zur Zellernte inkubiert.

### 2.10.2 *Brettanomyces/Dekkera*-Eigenisolate

**Tab. 8.** *Brettanomyces/Dekkera*-Eigenisolate aus Weinproben

Stamm <sup>a</sup>	Gattung / Art	Herkunft	Region	Isoliert aus
St. 9A	<i>D. bruxellensis</i>	Schafhausen	Wonnegau	Spätburgunder
St. 9B	<i>D. bruxellensis</i>	Schafhausen	Wonnegau	Spätburgunder

Tab. 8. Fortsetzung

Stamm <sup>a</sup>	Gattung / Art	Herkunft	Region	Isoliert aus
St. 30A	<i>D. bruxellensis</i>	Alsheim	Nierstein	St. Laurent
St. 30B	<i>D. bruxellensis</i>	Alsheim	Nierstein	St. Laurent
St. 34A	<i>D. bruxellensis</i>	Mettenheim	Nierstein	Cabernet Sauvignon
St. 34B	<i>D. bruxellensis</i>	Mettenheim	Nierstein	Cabernet Sauvignon
St. 35A	<i>D. bruxellensis</i>	Mettenheim	Nierstein	Merlot
St. 35B	<i>D. bruxellensis</i>	Mettenheim	Nierstein	Merlot
St. 75A	<i>D. bruxellensis</i>	Abenheim	Wonnegau	Dornfelder
St. 75B	<i>D. bruxellensis</i>	Abenheim	Wonnegau	Dornfelder
St. 76	<i>D. bruxellensis</i>	Abenheim	Wonnegau	Dornfelder
St. 115	<i>D. bruxellensis</i>	Flornborn	Wonnegau	Portugieser
St. 128	<i>D. bruxellensis</i>	Framersheim	Wonnegau	Cabernet Sauvignon
St. 153A	<i>D. bruxellensis</i>	Guldental	Nahe	Regent
St. 153B	<i>D. bruxellensis</i>	Guldental	Nahe	Regent
St. 153C	<i>D. bruxellensis</i>	Guldental	Nahe	Regent
St. 179A	<i>D. bruxellensis</i>	Weinolsheim	Nierstein	Cabernet Sauvignon
St. 179B	<i>D. bruxellensis</i>	Weinolsheim	Nierstein	Cabernet Sauvignon
St. 183A	<i>D. bruxellensis</i>	Uelversheim	Nierstein	Frühburgunder
St. 183B	<i>D. bruxellensis</i>	Uelversheim	Nierstein	Frühburgunder
St. 190A	<i>D. bruxellensis</i>	Dolgesheim	Nierstein	Portugieser
St. 190B	<i>D. bruxellensis</i>	Dolgesheim	Nierstein	Portugieser
St. 198	<i>D. bruxellensis</i>	Alzey	Wonnegau	Dornfelder
St. 199	<i>D. bruxellensis</i>	Alzey	Wonnegau	Dornfelder
St. 200	<i>D. bruxellensis</i>	Alzey	Wonnegau	Spätburgunder
St. 230	<i>D. bruxellensis</i>	Biebelnheim	Nierstein	Dornfelder
St. 238A	<i>D. bruxellensis</i>	Gau-Odernheim	Nierstein	Cuvee
St. 238B	<i>D. bruxellensis</i>	Gau-Oderbheim	Nierstein	Cuvee
St. 243	<i>D. bruxellensis</i>	Bermersheim	Nierstein	St. Laurent
St. 244A	<i>D. bruxellensis</i>	Bermersheim	Nierstein	Regent
St. 244B	<i>D. bruxellensis</i>	Bermersheim	Nierstein	Regent
St. 253	<i>D. bruxellensis</i>	Weinsberg	Württemberg	Lemberger-Mitos
St. 254	<i>D. bruxellensis</i>	Weinsberg	Württemberg	Lemberger-Mitos
St. 255	<i>D. bruxellensis</i>	Weinsberg	Württemberg	Spätburgunder
St. 256	<i>D. bruxellensis</i>	Weinsberg	Württemberg	Lemberger-Mitos
St. 259A	<i>D. bruxellensis</i>	Mainz	Nierstein	Dornfelder
St. 259B	<i>D. bruxellensis</i>	Mainz	Nierstein	Dornfelder
St. 260A	<i>D. bruxellensis</i>	Mainz	Nierstein	Dornfelder
St. 260B	<i>D. bruxellensis</i>	Mainz	Nierstein	Dornfelder

**Tab. 8.** Fortsetzung

Stamm <sup>a</sup>	Gattung / Art	Herkunft	Region	Isoliert aus
St. 282	<i>D. bruxellensis</i>	Ingelheim	Bingen	Spätburgunder
St. 283	<i>D. bruxellensis</i>	Ingelheim	Bingen	Regent
St. 295	<i>D. bruxellensis</i>	Großwinternheim	Bingen	Dornfelder
St. 296	<i>D. bruxellensis</i>	Großwinternheim	Bingen	Dornfelder
St. 299	<i>D. bruxellensis</i>	Gau-Algesheim	Bingen	Merlot

<sup>a</sup> Verschiedene Stämme aus einer Weinprobe sind mit A, B, C bezeichnet.

### 2.10.3 Weitere verwendete Organismen

**Tab. 9.** Als Negativ-Kontrolle für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung verwendete Organismen

Stamm	Gattung / Art	Herkunft <sup>a</sup>	Isoliert aus
St. 43	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IMW	Wein
B70	<i>Oenococcus oeni</i>	IMW	Wein

<sup>a</sup> Institut für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW) in Mainz.

### 2.10.4 Probennahme

Für die Isolierung neuer *Brettanomyces/Dekkera*-Stämme aus Wein wurden insgesamt 299 Weinproben aus 113 Winzerbetrieben untersucht. Dabei wurden 291 Weinproben für die Untersuchung der regionalen Verbreitung dieser Hefen in der deutschen Weinbauregion Rheinhessen aus 110 Winzerbetrieben direkt vor Ort entnommen. Die Winzerbetriebe gehörten zu den Bereichen Wonnegau, Nierstein und Bingen in Rheinhessen. Die Probennahme richtete sich gezielt auf Rotweine in Holz- oder Barrique-Fässern. Laut Literatur (Fugelsang 1993, Chatonnet et al. 1995, Dittrich & Großmann 2005) konnte hier mit der größten Wahrscheinlichkeit eine *Brettanomyces/Dekkera* Infektion angenommen werden. Jeweils 50 ml der zu untersuchenden Weine wurden direkt aus den Gebinden entnommen und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

### 2.10.5 Isolierung von *Brettanomyces/Dekkera*-Stämmen

In einer Vorkultur wurden jeweils 5 ml YPG-Flüssigmedium (mit Cycloheximid und Ampicillin) mit 2 ml der aufgeschüttelten Weinproben in Reagenzgläsern angeimpft und aerob auf dem Schüttler (120 rpm) bei 30 °C für 1 Woche inkubiert. Danach wurden 50 µl

dieser Vorkultur auf YPG-Agarplatten (mit Cycloheximid und Ampicillin) ausplattiert und bei 30 °C für 7 bis 14 Tagen (oder bis Kolonien sichtbar wurden) inkubiert. Die Zellen einzelner Kolonien wurden mikroskopisch kontrolliert und bei Vorhandensein von apiculaten Hefen (Kurtzman & Fell 1998; Barnett et al. 2000) erneut ausgestrichen. Durch wiederholte Vereinzlung konnten nach mindestens zweimaligem Ausstreichen auf YPG-Agar schließlich Reinkulturen gewonnen werden. Eine physiologische Identifizierung der Hefe-Spezies erfolgte über Wachstumsversuche auf DBDM (*Dekkera-Brettanomyces*-Differenzierungs-Medium). Hierfür wurde eine Kolonie oder ein Tropfen einer Hefesuspension auf dem Differenzierungsmedium ausgestrichen und für 14 Tage bei 30 °C inkubiert. Die systematische Identifizierung der Isolate konnte molekularbiologisch mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit Gattungs- und Art-spezifischen DNA-Sonden, sowie über Sequenzvergleiche der 18S rDNA- und ITS-Regionen durchgeführt werden.

#### **2.10.6 Qualitativer Nachweis der Acetat-Produktion**

Die für Hefespezies der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* charakteristische Essigsäure-Produktion (Dittrich & Großmann 2005) wurde sowohl bei den Typstämmen der fünf Arten (Tab. 7) als auch bei den Eigenisolaten (Tab. 8) durch Wachstumsversuche untersucht. Zusätzlich zu dem pH-abhängigen Farbumschlag in den Wachstumsversuchen auf DBDM sollte die Auflösung von Calciumcarbonat als Indiz für die Säureproduktion verwendet werden. Hierfür wurden die jeweiligen Hefe-Stämme auf YPG-Agarplatten mit Calciumcarbonat ausgestrichen und 14 Tage bei 30 °C inkubiert.

#### **2.10.7 Qualitative Untersuchung der Hydrolyse von Cellulose**

Sowohl die fünf Typstämme von *Brettanomyces/Dekkera* als auch die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Stämme wurden auf ihre Fähigkeit zur Hydrolyse von Cellulose hin untersucht. Dazu wurden die Hefestämme auf YPG-Agarplatten mit einer oberen Schicht (0,5 cm) aus CMC (Carboxymethylcellulose) -Agar ausgestrichen und 14 Tage bei 30 °C inkubiert. Nach dem Entfernen des Zellmaterials von den Kulturplatten und Abspülen mit sterilem deion. Wasser erfolgte eine Anfärbung mit alkalischer Kongorot-Lösung für 1 - 2 h bei RT. Anschließend wurden die Agarplatten mit Entfärbelösung für mindestens 6 h oder ü. N. bei RT entfärbt und, wenn notwendig, mit 1 N HCl kontrastiert. Darüber hinaus wurde untersucht, ob eine Hydrolyse von Cellulose durch Essigsäure möglich ist. Hierzu wurde jeweils 5 µl Essigsäure in verschiedenen Konzentrationen (10 % - 100 % in deion. Wasser)

auf den Agar getropft und ü. N. bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die oben beschriebene Färbung und Entfärbung.

### **2.10.8 Untersuchung der Sporulation**

Die taxonomische Einordnung der in dieser Arbeit untersuchten Hefe-Spezies basiert auf der dokumentierten Beobachtung (Kurtzmann & Fell 1998) von Ascosporenbildung (teleomorphe Gattung *Dekkera*) bzw. dem Fehlen einer sexuellen Reproduktion (anamorphe Gattung *Brettanomyces*). Durch Wachstumsversuche auf verschiedenen sporen-induzierenden Medien sollte die Sporulation sowohl der Typstämme als auch der Eigenisolate untersucht werden. Die Hefestämme wurden hierfür auf Malzagar (Smith & van Grinsven 1984) und auf SPA-Sporulationsmedium (de Souza Liberal et al. 2007) ausgestrichen bzw. als Zellsuspension aufgetragen. Innerhalb einer Inkubationsdauer von 3 Wochen bei 30 °C erfolgte eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle der Hefezellen.

## **2.11 Untersuchung ribosomaler Gensequenzen**

Zur Identifizierung von Mikroorganismen wird häufig die Sequenzierung der SSU ribosomalen Gensequenzen (16S rDNA bei Bakterien und Archaeen bzw. 18S rDNA bei Eukaryoten) und der LSU ribosomalen Gensequenzen (26S/28S rDNA) sowie der Internal Transcribed Spacer-Regionen (ITS-Regionen) bei Eukaryoten verwendet. Da die Gene für die ribosomalen RNAs (rRNAs) zum Teil hoch konserviert sind, können Primer verwendet werden, die auch noch nicht bekannte Arten nachweisen. Die Sequenzen können dann mit allen bereits bekannten Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken verglichen werden. Mit dieser Methode können sowohl taxonomische Identifizierungen erfolgen, als auch die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse in einer Stammbaum-Analyse ermittelt werden. Darüber hinaus müssen für die Entwicklung von spezifischen rRNA gerichteten DNA-Sonden die Gensequenzen potentieller Zielregionen amplifiziert, sequenziert und miteinander verglichen werden.

### **2.11.1 DNA-Isolierung**

Die Isolierung genomischer DNA aus den Hefe-Stämmen erfolgte mit dem DNeasy<sup>®</sup>Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach den Vorgaben des Herstellers. Als Ausgangsmaterial wurde eine

Suspension (in deion. Wasser) mit  $5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen einer 2 - 3 Tage alten Kultur von YPG-Agarplatten eingesetzt. Die Zellwände konnten mit dem Enzym Lyticase und Sorbitol-Lösung nach Anleitung des Herstellers aufgeschlossen werden. Lyticase besitzt zusätzlich zu ihrer  $\beta$ -(1,3)-Glucanase-Aktivität auch eine Protease-Aktivität (Scott & Schekman 1980). Die Isolierung der genomischen DNA erfolgt mit dem Kit über eine Silica-Gel-Membran ohne organische Extraktion. Hierbei bindet die DNA nach der Zell-Lyse selektiv an die Membran der DNeasy-Säulen. Proteine und zweiwertige Kationen werden durch mehrere Waschschriffe von der Säule entfernt. Nach der Elution wurde die Reinheit der DNA photometrisch überprüft. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) erlaubte hierbei Rückschlüsse auf eine Kontamination mit Proteinen, die im UV-Bereich absorbieren. Bei pH 7,5 besitzt reine DNA ein  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis von 1,8 - 2,0 (Handbuch DNeasy<sup>®</sup>Tissue Kit, Qiagen, Hilden). Die isolierte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.11.2 Untersuchung der 18S rDNA-Sequenzen

Die Amplifizierung partieller 18S rDNA-Sequenzbereiche (Abb. 15) erfolgte mit den konservierten Primern Oxy 5.1 (For) und ITS2 (Rev) (White et al. 1990) in einer PCR. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 10 und das verwendete Thermocycler-Programm in Tabelle 11 dargestellt.

**Tab. 10.** Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze

Komponente	Volumen
PCR-Puffer (10x)	5 $\mu$ l
MgCl-Lösung (25 mM)	3 $\mu$ l
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	4 $\mu$ l
Forward (For)-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Reverse (Rev)-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Taq-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
steriles, deion. Wasser	28-31 $\mu$ l
Template DNA	2-5 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>



**Tab. 11.** Thermocycler-Programm zur Amplifizierung der 18S rDNA-Sequenz

Programm	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Zyklen
Initial-Denaturierung	95	3,0	1
Denaturierung	95	0,5	35
Annealing	58	1,0	
Elongation	72	1,0	
Finale Elongation	72	5,0	1

### 2.11.3 Untersuchung der ITS-Region

Die Amplifizierung der Internal Transcribed Spacer-Regionen (Abb. 15) erfolgte mit den konservierten Primern ITS1 und ITS4 (White et al. 1990) in einer PCR wie in Tabelle 10 beschrieben. Abweichend zum Thermocycler-Programm in Tabelle 11 betrug die Annealing-Temperatur in dieser Reaktion 55 °C und die Elongations-Zeit 0,5 min.

### 2.11.4 Untersuchung der 26S rDNA-Sequenzen

Die Amplifizierung und Sequenzierung der 26S rDNA-Sequenzen wurde bei den fünf *Brettanomyces/Dekkera*-Typstämmen (Tab. 7) und dem Isolat *D. bruxellensis* St. 579 durchgeführt. Für die PCR Reaktionen wurden Primer in konservierten Sequenzbereichen generiert. Der Forward-Primer For-26S-1 sollte durch Sequenzvergleiche der ITS1/ITS4 PCR-Produkte direkt hinter die ITS-Region an den Anfang der 26S rDNA gelegt werden. Der Reverse-Primer Rev-26S-2 wurde ebenso wie die Sequenzier-Primer durch den Vergleich mit hinterlegten LSU rRNA-Gensequenzen verschiedener Hefen und Ascomyceten in konservierte Regionen gelegt. Abweichend zum PCR-Programm in Tabelle 11 betrug bei der PCR zur Amplifizierung der 26S rDNA-Sequenzen die Annealing-Temperatur 50 °C und die Elongations-Zeit 3,5 min.

### 2.11.5 Agarose-Gelelektrophorese

Durch Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung konnte die erfolgreiche Amplifizierung der Gensequenzen überprüft werden. Hierzu wurde Agarose in 1x TBE-Puffer aufgeköcht und das Gel in eine Form gegossen in die ein Kamm eingesetzt wurde. Nachdem das Gel abgekühlt war und sich verfestigt hatte, wurde der Kamm entfernt und das Agarose-Gel in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt. In die Geltaschen wurden jeweils 5µl PCR-Produkt, gemischt mit 1 µl 6x Ladepuffer, pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 95 V für 20 - 30 min. Anschließend

wurde das Gel mit Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/l) angefärbt (30 min). Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht (312 nm) mit einem Transilluminator und wurde photographisch dokumentiert (Geldokumentationseinheit Polaroid, Offenbach mit Bedingungssoftware Intas, Göttingen).

#### **2.11.6 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Die PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt. Dadurch wurden unerwünschte PCR-Rückstände wie Primer, dNTPs und Taq-Polymerase entfernt, die sich negativ auf die Sequenzierung auswirken können.

#### **2.11.7 Sequenzierung**

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al. 1977) mit den jeweiligen PCR-Primern und wurde von den Firmen Genterprise (Mainz), MWG (Martinsried) und Brain (Zwingenberg) als Auftragsarbeit durchgeführt.

#### **2.11.8 Sequenzanalyse**

Neu identifizierte DNA-Sequenzen wurden mit hinterlegten Sequenzen aus der NCBI Datenbank (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen (Blast-Suche). Zur Generierung von Primern, fluoreszenzmarkierten Sonden sowie zur phylogenetischen Analyse wurden Sequenzvergleiche (Alignments) mit dem Programm ClustalX 1.83 (Thompson et al. 1997) erstellt.

#### **2.11.9 Generierung phylogenetischer Stammbäume**

Die Berechnung und Konstruktion von phylogenetischen Stammbäumen erfolgte mit den Programmen PHYLIP Package 3.65 (Felsenstein 1989) und Tree View 1.6.6 (Page 1996). Zur statistischen Absicherung wurden Bootstrap-Analysen durchgeführt (Felsenstein 1989) und aus den Datensätzen ein Konsensus-Baum erstellt. Der Bootstrap-Wert gibt für jede Verzweigung an, wie oft sie aus den Datensätzen berechnet werden konnte. Für die Generierung des phylogenetischen Stammbaums auf Basis der ITS-Regionen wurde eine Sequenz von *S. cerevisiae* (Acc. Z95939) als Außengruppe miteinbezogen. Für die Erstellung des 26S rDNA-basierenden Baums wurde die Sequenz von *S. cerevisiae* (Acc. J01355) als Außengruppe verwendet.

## 2.12 rRNA-Sekundärstrukturen

Eine Umwandlung der ribosomalen RNA-Sekundärstruktur eines verwandten Organismus (*Saccharomyces cerevisiae*) in die Sekundärstruktur der untersuchten Sequenz (*Brettanomyces/Dekkera* spp.) kann bei ausreichender Sequenzhomologie vorgenommen werden. Die Generierung von LSU rRNA-Sekundärstrukturen auf der Basis einer bereits bekannten rRNA-Sekundärstruktur erfolgte in einer komplexen Abfolge mehrerer Programmierungs- und Formatierungsschritte mit den Programmen ClustalX 1.83 (Thompson et al. 1997), Microsoft Word und Excel, sowie GSview 4.4 und RNAstructure 4.2 (Mathews et al. 2004). Das Prinzip und die genaue Durchführung basierten im Wesentlichen auf den Arbeiten von Fröhlich (1999) und Hirschhäuser (2002, 2005). Im Folgenden wird die Vorgehensweise erläutert und die Abfolge zusammenfassend beschrieben.

- Download der bereits bekannten LSU rRNA-Sekundärstruktur der nahe verwandten Hefe *Saccharomyces cerevisiae* von der Homepage des Institute for Cellular and Molecular Biology and The Section for Integrative Biology, University of Texas (<http://www.rna.cccb.utexas.edu>, Gutell et al. 1993, Cannone et al. 2002) und der zugehörigen Sequenz (Acc. U53879; Johnston et al. 1997) von der NCBI (National Center of Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.com>) Datenbank.
- Umformatierung der rDNA-Sequenzen in rRNA-Sequenzen durch Austausch von T (Thymin) gegen U (Uracil).
- Sequenz-Alignment der bekannten rRNA-Sequenz (*S. cerevisiae*) mit der rRNA-Sequenz der zu generierenden Sekundärstruktur (*Brettanomyces/Dekkera*) mit ClustalX 1.83.
- Programmierung und Einfügen der Sequenzhomologien und -unterschiede, sowie Löschen und Einfügen von Koordinaten bei Basen-Deletionen bzw. -Insertionen in MS Excel.

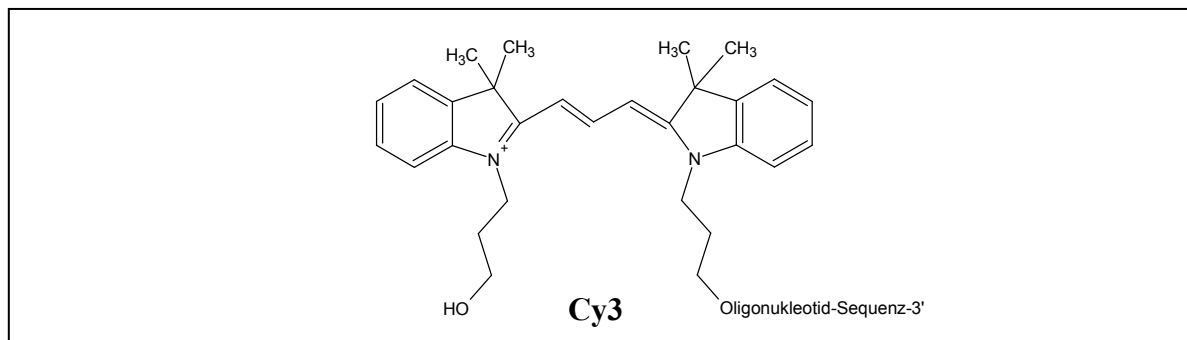
- Einfügen der geänderten Sequenz, der neuen Koordinaten und der Befehle zur farblichen Markierung von Sequenzunterschieden in das Programm der ursprünglichen Sekundärstruktur.
- Graphische Darstellung in GSview 4.4 und Korrektur der Bindungszeichen in doppelsträngigen rRNA-Bereichen, sowie Änderung des Layouts in MS Word zur Berücksichtigung von Insertionen und Deletionen.

Nach der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden neue, Art-spezifische 26S rRNA-Sekundärstrukturen für alle fünf *Brettanomyces/Dekkera*-Arten (Typstämme, Tab. 7) generiert. Dabei erfolgte die Konstruktion der ersten neuen Sekundärstruktur für *D. anomala* (DSM 70732<sup>T</sup>) auf Basis der ursprünglichen Sekundärstruktur von *S. cerevisiae*. Alle weiteren Strukturen wurden für jede *Brettanomyces/Dekkera*-Art nacheinander anhand der jeweils vorher generierten Sekundärstruktur erstellt (Röder et al. 2007a). Hochvariable Bereiche in den 26S rRNA-Sekundärstrukturen wurden unter Verwendung des Programms RNAstructure 4.2 (Zuker 2000) neu gefaltet und konnten somit ihrem nativen Zustand annähernd dargestellt werden. Die konformative Determination konservierter Bereiche begrenzt den Spielraum der neu zu berechnenden Faltungen soweit, dass ein auf thermodynamischen Algorithmen basierende Faltungsprogramm eine realistische Sekundärstruktur generiert (Fröhlich, persönliche Mitteilung). Die Strukturänderungen konnten durch Verschieben der Koordinaten-Punkte, die die genaue Position jeder Base in der zweidimensionalen Darstellung festlegen in MS Excel übernommen werden.

### 2.13 Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonden

Ein Sequenzvergleich der vollständigen LSU rRNA Gene von *D. anomala*, *D. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. naardsenensis*, *B. nanus* und *S. cerevisiae* wurde mit ClustalX 1.83 durchgeführt. Das Sequenzalignment und die Informationen aus den Sekundärstrukturen bezüglich der zweidimensionalen Anordnung der Sequenzen wurden in Kombination verwendet, um potentielle Art-spezifische Zielregionen für Oligonukleotid-Sonden zu lokalisieren. Die Sequenzen der Sonden sind hierbei revers komplementär zu ihrer

Zielregion. Wenn möglich, wurden Zielsequenzen ausgewählt, die teilweise komplementär zueinander oder direkt benachbart waren, um die *in situ* Zugänglichkeit der rRNA in dieser Region für die Sonden gemäß dem Helfer-Sonden-Prinzip (Fuchs et al. 2000) und dem Gemeinschafts-Sonden-Effekt (Fröhlich & König 2002, Fröhlich et al. 2003, Hirschhäuser et al. 2005, Röder et al. 2007a) zu verbessern. Durch Variation der Sequenzlängen konnten die mittleren Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) von Sonden, die in Kombination eingesetzt werden sollten, aufeinander abgestimmt werden. Zur Überprüfung der Spezifität der SONDENSEQUENZEN für die jeweilige *Brettanomyces/Dekkera*-Art wurde ein Datenbankvergleich (NCBI, BLAST-Suche) durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte eine Überprüfung der SONDENSEQUENZEN auf Komplementarität zu sich selbst und zu möglichen Gemeinschafts-Sonden über ein online-Programm (Oligo Analysis & Plotting Tool, <http://www.operon.com/oligos/toolkit.php>). Die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Abb. 9) markierten Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) und Operon (Köln) synthetisiert und mit HPLC gereinigt.



**Abb. 9.** Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs 5-N, -Ethyl-N'-Caprylsuccinimidtetramethylindocarbocyanin (Cy3) als Markierung für Oligonukleotid-Sonden.

## 2.14 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wird das Signal (Fluoreszenzlicht) direkt im biologischen Präparat (*in situ*) generiert. Sie dient in der vorliegenden Arbeit der spezifischen Detektion und Identifizierung von Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* in der Mikroflora von Weinproben bzw. in künstlichen Mischungen aus verschiedenen Hefen und Bakterien. Das Prinzip der FISH besteht in der Anlagerung von Oligonukleotid-Sonden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, an spezifische

Nukleinsäuresequenzen in der Zelle (Leitch et al. 1994). In dieser Arbeit wurde die FISH mit Cy3-markierten DNA-Sonden durchgeführt, deren Sequenzen komplementär zur Basenabfolge von Zielregionen der 18S (SSU) ribosomalen RNA bzw. der 26S (LSU) rRNA von *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen waren. Das Sondensignal wurde nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes im Präparat über Epifluoreszenzmikroskopie dargestellt. Als Negativ-Kontrollen wurden bei der Überprüfung der 18S rRNA-gerichteten Sonden auch Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Oenococcus oeni* (Tab. 9) hybridisiert.

#### **2.14.1 Präparation der Zellen**

Jeweils 1 ml der auf *Brettanomyces* zu untersuchenden Probenlösung bzw. der Zellsuspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und bei 5000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Mikroorganismen in 500 µl deion. Wasser suspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension in 1 ml Waschpuffer. Jeweils 5 µl der Suspension wurden gleichmäßig auf die Felder eines teflonbeschichteten Diagnostik-Objektträgers (Abb. 10 a) aufgetragen. Nach dem Antrocknen bei RT erfolgte eine Fixierung der Zellen auf dem Objektträger für 10 min bei 90 °C. Direkt im Anschluss an diese Hitzefixierung wurde das Präparat in aufsteigender Reihenfolge mit 50 Vol. % und 70 Vol. % wässrigen Ethanol-Gemischen und abschließend zweimal mit 96 Vol. % Ethanol für jeweils 5 min entwässert und dann luftgetrocknet.

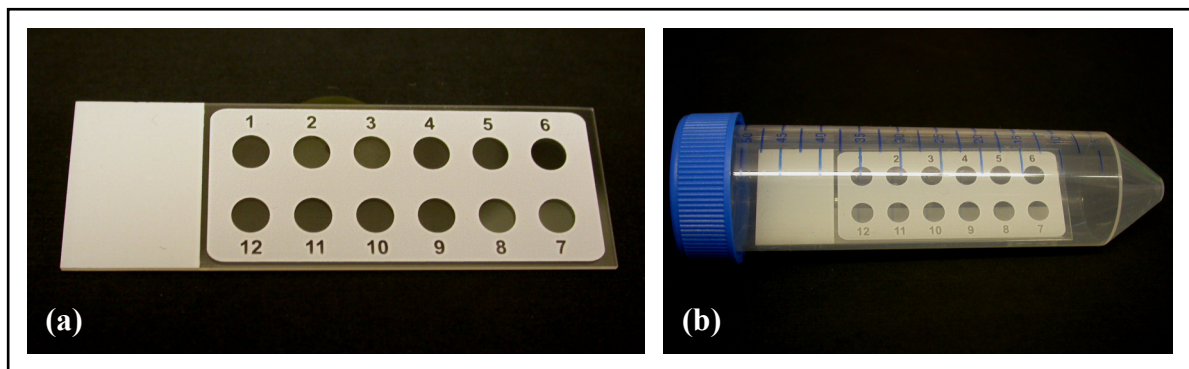
#### **2.14.2 Vorbehandlung der Oligonukleotid-Sonden**

Vor der Hybridisierungsreaktion wurden die Sonden in Form einer Hybridisierungslösung direkt auf das vorbereitete biologische Präparat gegeben. Diese enthielt Salze, Dextransulfat und Natriumdodecylsulfat. Die gelösten Salze bestimmen die Ionenstärke der Lösung und wirken stabilisierend auf Nukleinsäure-Doppelstränge. Dextransulfat ist ein Polymer mit hohem Molekulargewicht, das die Geschwindigkeit der Hybridisierung erhöht (Leitch et al. 1994). Natriumdodecylsulfat (SDS) erleichtert als Tensid das Eindringen der Sonden in die Zelle durch Permeabilisierung der Cytoplasmamembran.

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) wurden 45 µl Hybridisierungspuffer mit 5 µl Sondenmischung (äquimolar) gemischt und für 15 min bei 70 °C im Heizblock denaturiert. Dies verhindert mögliche Basenpaarungen innerhalb einer sowie zwischen verschiedenen Sonden. Da die Fluoreszenzmarkierung (Cy3) lichtempfindlich ist, erfolgten alle Versuchsabläufe mit den Sonden im Dunkeln.

### 2.14.3 Hybridisierung

Das denaturierte Sonden-Lösungsgemisch wurde direkt nach dem Verdampfen des Ethanol gleichmäßig auf den Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas (24 x 60 mm) abgedeckt. Der abgedeckte Objektträger wurde anschließend in eine vorgewärmte Hybridisierungskammer (50 ml Greiner Reaktionsgefäß, Abb. 10 b) gelegt, die zuvor mit einem befeuchteten (Waschpuffer) Filterpapierstreifen versehen worden war und im Hybridisierungs-ofen bei der jeweils benötigten Hybridisierungstemperatur für mindestens 3 h oder ü. N. inkubiert.



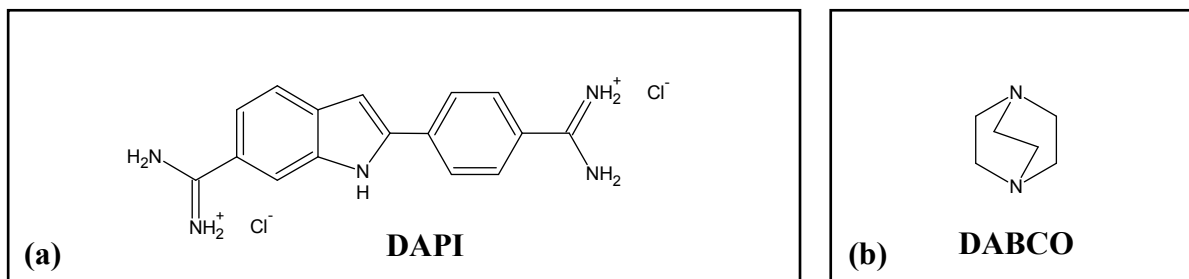
**Abb. 10.** Teflon-beschichteter Diagnostik-Objektträger mit 12 Proben-Fenstern (a) und Hybridisierungskammer mit Objektträger (b) für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung.

### 2.14.4 Nachbehandlung des Präparats

Nach erfolgter Hybridisierung wurde das Deckglas entfernt und der Objektträger zweimal bei der jeweils benötigten Waschttemperatur in jeweils 50 ml vorgewärmten Waschpuffer für 10 min unter stringenten Bedingungen inkubiert. Die Waschttemperaturen lagen hierbei 1 bis 4 °C (Tab. 14) über den Hybridisierungstemperaturen. Danach erfolgte die Gegenfärbung des Präparats mit DAPI. Dazu wurde der noch feuchte Objektträger mit 50 µl DAPI-Lösung überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte nach dem Entfernen des Deckglases ein kurzer Waschschrift mit deion. Wasser. Danach wurden 50 µl DABCO aufgetragen und das Präparat wieder mit einem Deckglas versehen. Bis zur mikroskopischen Auswertung erfolgte die Aufbewahrung des Objektträgers im Dunklen.

### 2.14.5 Eigenschaften von DAPI und DABCO

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Abb. 11 a) interkaliert in doppelsträngige DNA (Tanious et al. 1992) und bindet an Proteinen und färbt somit alle vorhandenen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen. DAPI wird durch UV-Licht angeregt (Absorptionsmaximum: 385 nm) und emittiert blaues Licht (Emissionsmaximum: 461 nm). Der Einsatz von DABCO (Abb. 11 b) beruht auf der Eigenschaft, Fluoreszenzsignale weniger schnell ausbleichen zu lassen (Leitch et al. 1994). Die Verbindung wirkt hierbei als Antioxidans.

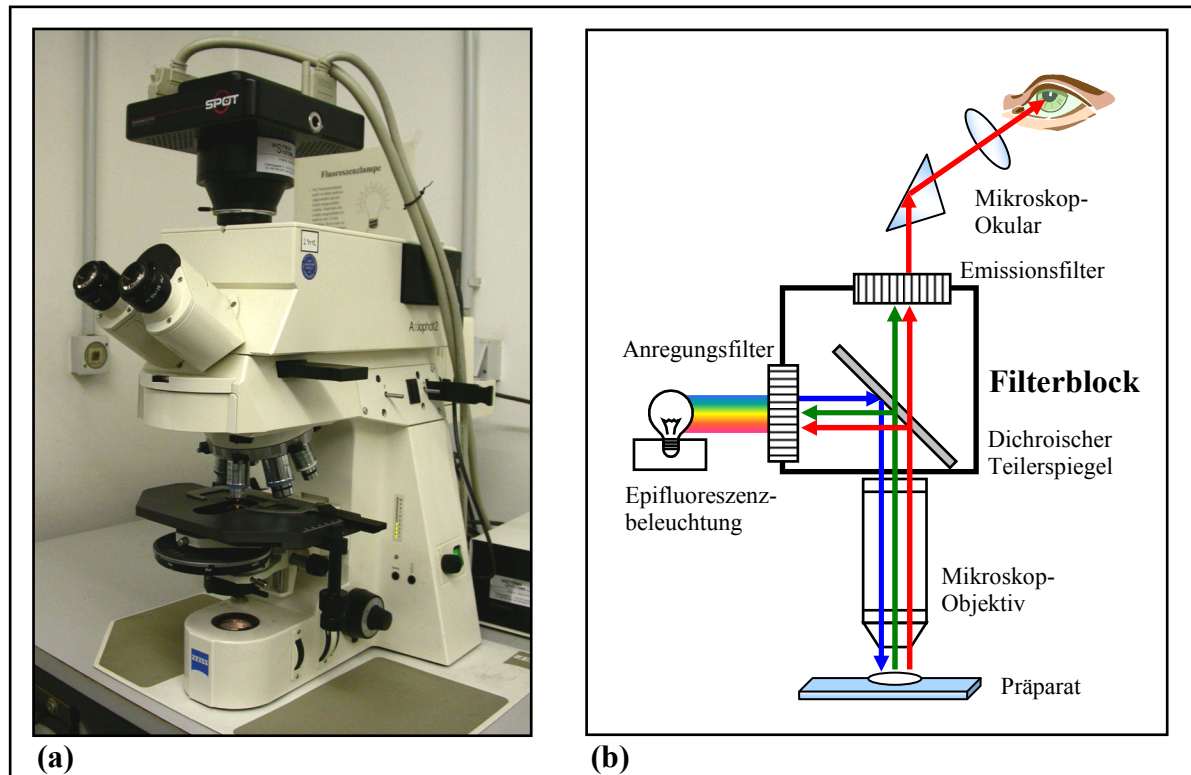


**Abb. 11.** Molekülstrukturen von (a) 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) und (b) 1, 4-Diazabicyclo-[2.2.2]oktan bzw. Triethyldiamin (DABCO).

### 2.14.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der Hybridisierung erfolgte mit einem Epifluoreszenzmikroskop Axiophot 2 (Zeiss, Göttingen; Abb. 12 a) bei 400- bzw. 1000-facher Vergrößerung. Bei der Epifluoreszenzmikroskopie (Abb. 12 b) trifft das Licht zur Anregung des Sonden-Farbstoffs von oben durch den Filterblock und das Objektiv auf das Präparat. Die emittierte, längerwellige Fluoreszenz-Strahlung gelangt durch das Objektiv und den Filterblock zu dem Okular. Für die jeweiligen Farbstoffe wurden die entsprechend geeigneten Filterblöcke verwendet (vgl. Tab. 3). Mit dem für Cy3 und DAPI konstruierten Kombinationsfilter 28 (Zeiss, Göttingen) konnten beide Signale parallel sichtbar gemacht werden. Die mikroskopischen Abbildungen wurden mit einer Digitalkamera (Coolpix 4500, Nikon, Tokyo) direkt über das Okular photographisch dokumentiert.





**Abb. 12.** Epifluoreszenzmikroskop Axiophot 2 (a) von Zeiss (Göttingen) und schematische Darstellung des Strahlengangs (b). Die verwendeten Filterblöcke (vgl. Tab. 3) bestehen jeweils aus den drei Komponenten Anregungsfilter, dichroischer Teilerspiegel und Emissionsfilter (siehe auch Kapitel 1.4).

## 2.15 Vitalitätsfärbungen

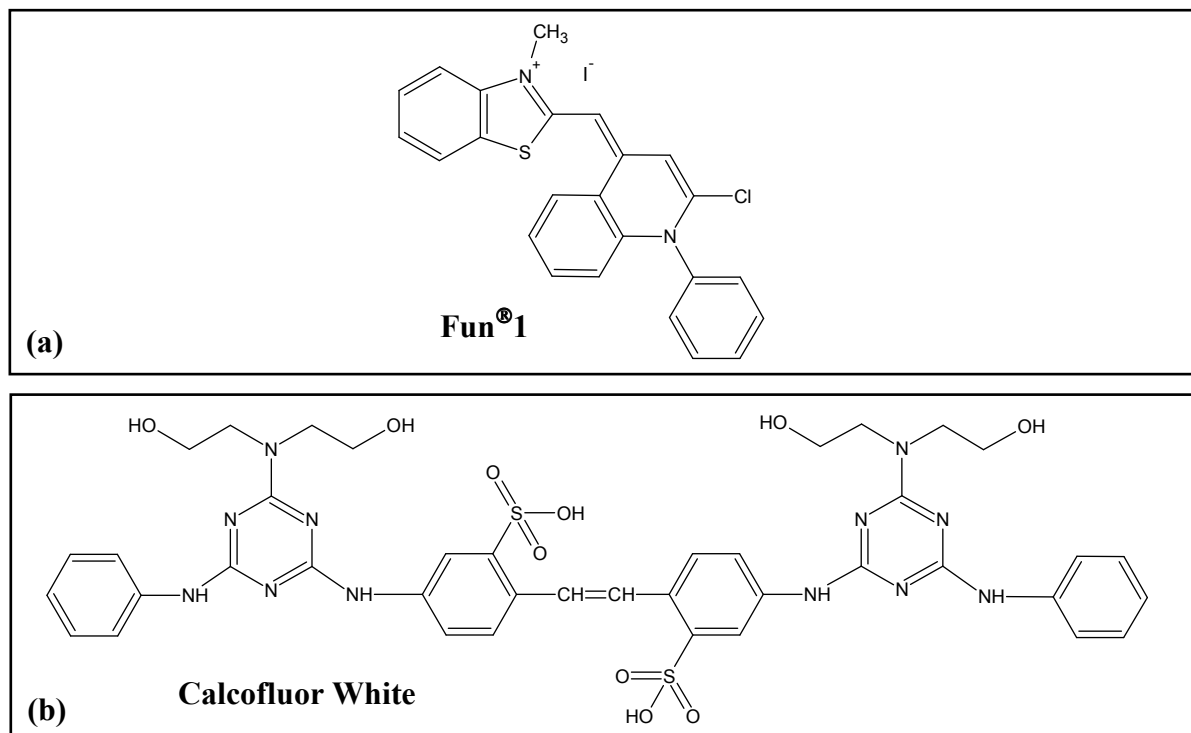
Neben der Detektion und Identifizierung von Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* ist die Differenzierung von toten und lebenden Zellen ein wichtiges Indiz für die Beurteilung der tatsächlichen Kontamination bzw. Infektion im Wein. Die Stoffwechselaktivität und folglich die Bildung der sensorisch auffälligen Sekundärmetabolite durch die Hefe-Zellen können so besser abgeschätzt werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Vitalitätsfärbungen bezüglich der Anwendbarkeit auf *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen überprüft. Die Lebend-/Totzellen-Differenzierungen erfolgten mit Reinkulturen verschiedener *D. bruxellensis*-Stämme parallel zur Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Zur gezielten Abtötung von Hefen für die Anfärbung toter Zellen wurde das in der Weinbereitung gebräuchliche Produkt „Kadifit“ (Erbslöh, Geisenheim) verwendet. Bei Kadifit (E 224) handelt es sich um reines Kaliumdisulfit ( $K_2S_2O_5$ ) zur

Schwefelung von Maische, Most und Wein. Kadifit wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt.

Sowohl bei Flüssigansätzen, als auch bei hitzefixierten Präparaten, wurden nach den Fluoreszenzfärbungen einige  $\mu\text{l}$  DABCO auf die gefärbten Zellsuspensionen gegeben, um ein zu schnelles Ausbleichen zu verhindern.

### 2.15.1 Färbung mit Fun<sup>®</sup> 1 und Calcofluor White

Die Hefezellen wurden mit dem Live/Dead<sup>®</sup> Yeast Viability Kit nach den Anweisungen des Herstellers (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon) angefärbt. Hierbei bilden nur die stoffwechselaktiven Zellen mit intakter Cytoplasmamembran durch den Fluoreszenzfarbstoff Fun<sup>®</sup> 1 (Abb. 13 a) die charakteristischen rot-fluoreszierenden Strukturen in den Vakuolen der Zellen aus (Lloyd & Hayes 1995). Calcofluor White (Abb. 13 b) ist ein, im UV-Bereich anregbarer Farbstoff der die Zellwände insbesondere von Pilzen und Hefen anfärbt (Mazzoni et al. 1993).



**Abb. 13.** Molekülstrukturen von (a) 2-Chlor-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methyliden)-1-phenylquinolinium Iodid (Fun<sup>®</sup>1) und (b) Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor White).

### 2.15.2 Färbung mit Fluoresceindiacetat

Fluoresceindiacetat (FDA, Abb. 14) ist eine Verbindung, die erst nach einer Esterspaltung als Fluoreszenzfarbstoff wirksam wird. Durch Esterase-Aktivität in der stoffwechselaktiven Zelle kann FDA in freies Fluorescein umgewandelt werden (Rotman & Papermaster 1966). Fluorescein ist ein Triphenylmethan-Farbstoff aus der Gruppe der Phthalsäurefarbstoffe. In vitalen Zellen emittiert FDA nach Abspaltung der beiden Acetat-Gruppen bei Anregung mit blauem Licht grünes Fluoreszenzlicht (Tab. 3). Die Hefesuspensionen (1 ml) wurden mit 10 µl FDA-Lösung [1 mg/ml, in Dimethylsulfoxid (50 %, in deion. Wasser)] versetzt und mindestens 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (5 min, 7000 rpm) erfolgte ein kurzer Waschschrift mit deion. Wasser. Die Zellen wurden anschließend in deion. Wasser resuspendiert und sofort mikroskopisch untersucht.

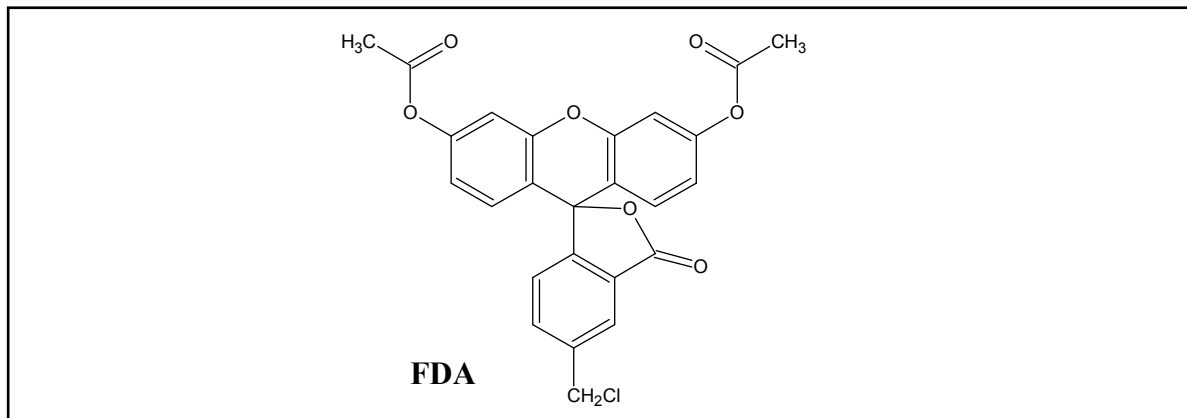


Abb. 14. Molekülstruktur von Fluoresceindiacetat (FDA).

### 2.15.3 Färbung mit SYTOX<sup>®</sup> Green

SYTOX<sup>®</sup> Green (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der ähnlich wie DAPI oder Ethidiumbromid in die doppelsträngige DNA von Pro- und Eukaryoten interkaliert. Da die Cytoplasmamembran von lebenden Zellen für SYTOX<sup>®</sup> Green in der Regel nicht permeabel ist, werden nur Nukleinsäuren in toten Zellen angefärbt (Lebaron et al. 1998). Ebenso wie FDA emittiert SYTOX<sup>®</sup> Green bei Anregung mit blauem Licht in den Zellen grünes Fluoreszenzlicht (Tab. 3). Eine Molekülstruktur des Farbstoffs konnte nicht ermittelt werden. Die Anfärbung der Hefezellen erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Hierzu wurden Hefe-Suspensionen (in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung) mit SYTOX Green (5 mM Lösung in Dimethylsulfoxid) in einer Konzentration von 25 µM

versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

## 2.16 Physiologische Art- und Stamm-Differenzierung

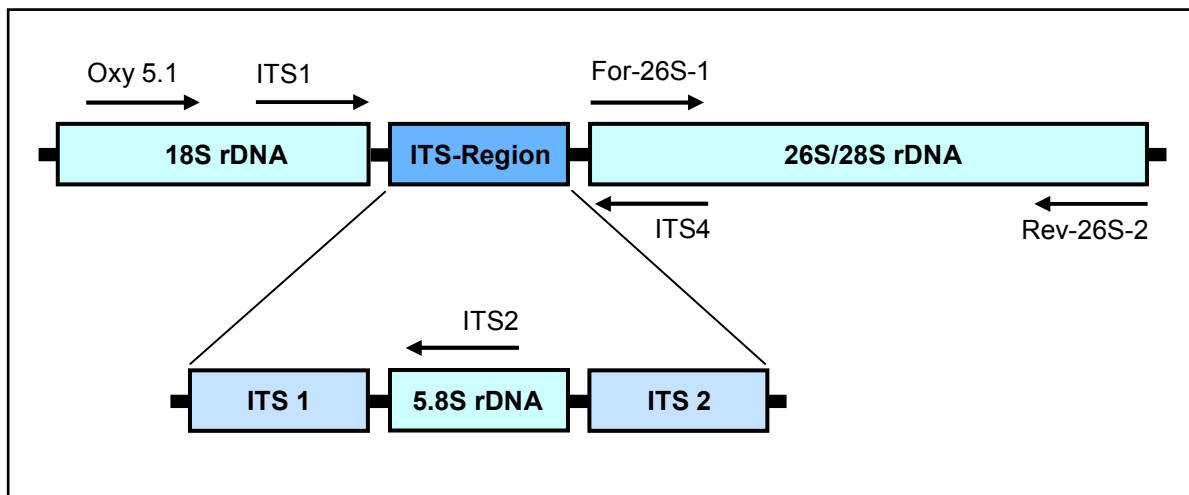
Hefen können nicht nur durch molekularbiologische Methoden wie Gensequenz-Analysen oder FISH (diese Arbeit), sondern auch durch Untersuchung ihrer physiologischen Eigenschaften differenziert werden.

### 2.16.1 Biolog YT Mikrotiterplatten-Test

Der YT MicroPlate™ Test (Biolog Inc., Hayward, USA) bietet die Möglichkeit zur Identifizierung und Charakterisierung von verschiedenen Hefe-Spezies. In dieser Arbeit sollte die Methode darüber hinaus zur Differenzierung auf Stamm-Niveau verwendet werden. Die Durchführung der Tests erfolgte nach den Angaben des Herstellers (<http://www.biolog.com/pdf/YT%20chart.pdf>). Alle untersuchten *Brettanomyces/Dekkera*-Stämme wurden vor dem Test drei Tage lang auf YPG-Agarplatten ohne Cycloheximid kultiviert. Die Zellen wurden nach der Ernte in sterilem deion. Wasser resuspendiert und die Zelldichte der Suspension über photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 578 nm auf einen vom Hersteller vorgegebenen Standard eingestellt. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension in die 96 Vertiefungen der Biolog YT Mikrotiterplatten gegeben, die verschiedene Kohlenstoff-Quellen enthielten (Anhang). Nach einer Anfangs-Messung (T = 0 h) mit dem Mikrotiterplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 620 nm und der Analyse-Software MikroWin 2000 erfolgten die weiteren photometrischen Messungen nach 72 h. Die Platten wurden während dieser Zeit bei 30 °C inkubiert. Da einige Hefe-Arten durch den im Testsystem verwendeten Redox-Farbstoff Tetrazolium-Violett gehemmt werden könnten, sind die YT Mikrotiterplatten sowohl mit Oxidations- als auch mit Assimilations-Tests bestückt. Tetrazolium-Violett diente in den Tests als kolorimetrischer Indikator für die Oxidation eines Substrats. Die Tests zur Assimilation von verschiedenen Kohlenstoffquellen wurden turbidimetrisch ausgewertet. Nach den photometrischen Messungen wurden die Daten (Extinktionswerte) als Stoffwechsellmuster graphisch dargestellt und zur Untersuchung der verwandtschaftlichen Verhältnisse für eine Cluster-Analyse mit dem PHYLIP Package 3.65 (Felsenstein 1989) verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 DNA-Sequenzanalysen bei *Brettanomyces/Dekkera*

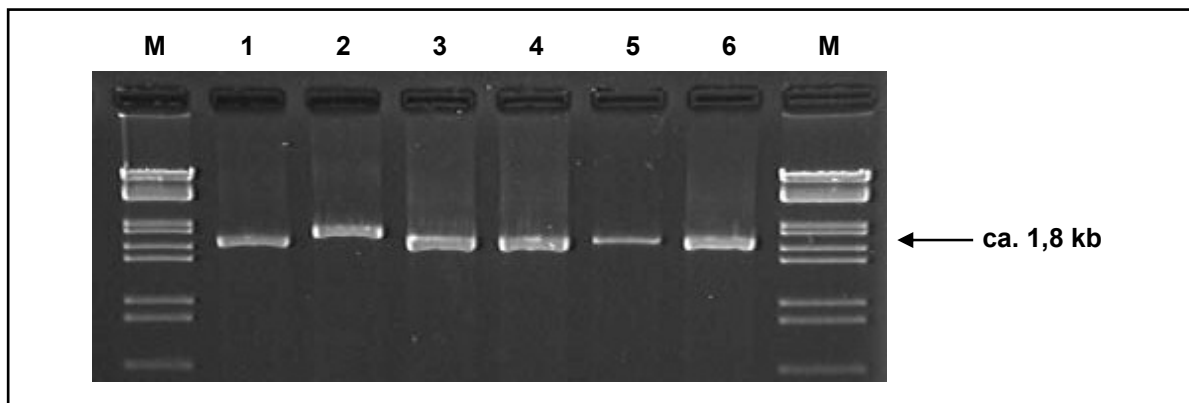


**Abb. 15.** Schematische Darstellung des repetitiven, ribosomalen Gen-Clusters in Eukaryoten. Die 26S/28S und die 5.8S rDNAs kodieren für die rRNAs der großen ribosomalen Untereinheit (LSU). Die 18S rDNA kodiert für die rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit (SSU). Zwei Internal Transcribed Spacer (ITS) - Regionen umgeben die 5.8S rDNA. Die Bindungspositionen der verwendeten Forward- und Reverse-Primer sind durch Pfeile dargestellt.

##### 3.1.1 18S rDNA-Sequenzen

Um die verwandtschaftlichen Verhältnisse der fünf bisher bekannten *Brettanomyces/Dekkera*-Arten darstellen zu können, wurden zunächst hinterlegte 18S rDNA-Sequenzen der Hefen miteinander verglichen. Die phylogenetische Analyse der SSU rDNA-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank zeigte die enge Verwandtschaft der verschiedenen *Brettanomyces/Dekkera*-Arten. Das Alignment (Daten hier nicht gezeigt) der hinterlegten Sequenzen ermöglichte zwar eine Differenzierung von *D. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* und *B. nanus*, aber die Art *D. anomala* unterschied sich nur in 9 Basen innerhalb der ca. 1,8 kb großen Gensequenz von der nächstverwandten Art *D. bruxellensis*. Die große Homologie der bisher untersuchten geringen Anzahl an 18S rDNA-Sequenzen ließ daher nur eine kleine Auswahl von Gattungsspezifischen Sonden für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung zu. Die 18S rDNA-Sequenzen aus mehreren

Eigenisolaten wurden auch hinsichtlich ihrer Mikroheterogenität auf Stamm-Niveau untersucht. Durch die Sequenzierung von ca. 700 bp der ca. 1,8 kb großen PCR-Amplifikate mit den Primern Oxy 5.1 und ITS 2 (Abb. 15 u. 16) und eine anschließende Datenbanksuche (BLAST, NCBI/GenBank) konnten fünf von sechs Isolaten eindeutig als *Dekkera bruxellensis* identifiziert werden. Bei einem Isolat handelte es sich um eine verwandte Hefe (*Candida spec.*). Ein Sequenzvergleich unter den fünf *D. bruxellensis*-Stämmen ergab eine Identität von 100 % in dem untersuchten 18S rDNA-Sequenzbereich.

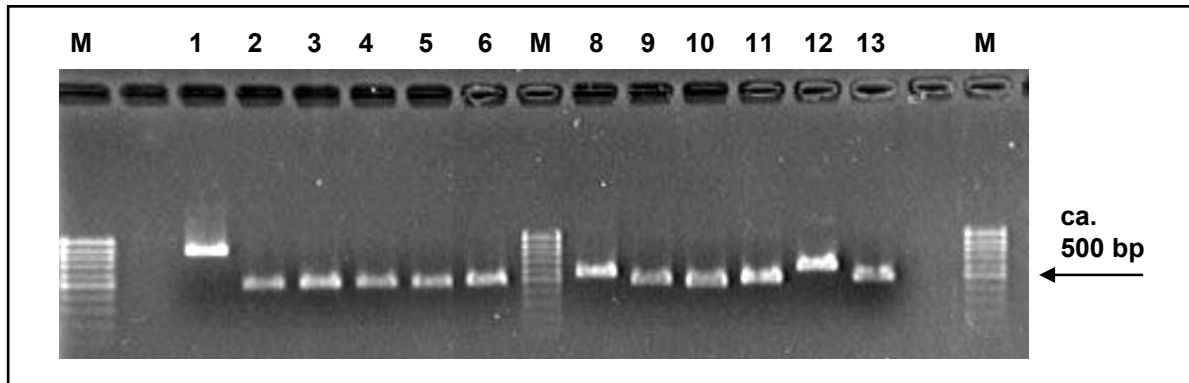


**Abb. 16.** PCR-Produkte der 18S rDNA-Sequenzen von den Isolaten St. 9A (1), St. 18 (2), St. 30A (3), St. 34A (4), St. 34B (5) und St. 35A (6) nach Amplifizierung mit den Primern Oxy 5.1 und ITS 2. Längenstandard M: Lambda DNA / EcoRI+HindIII. Bei Isolat St. 18 (2) handelte es sich um *Candida spec.*, bei allen anderen Isolaten um Stämme von *D. bruxellensis*.

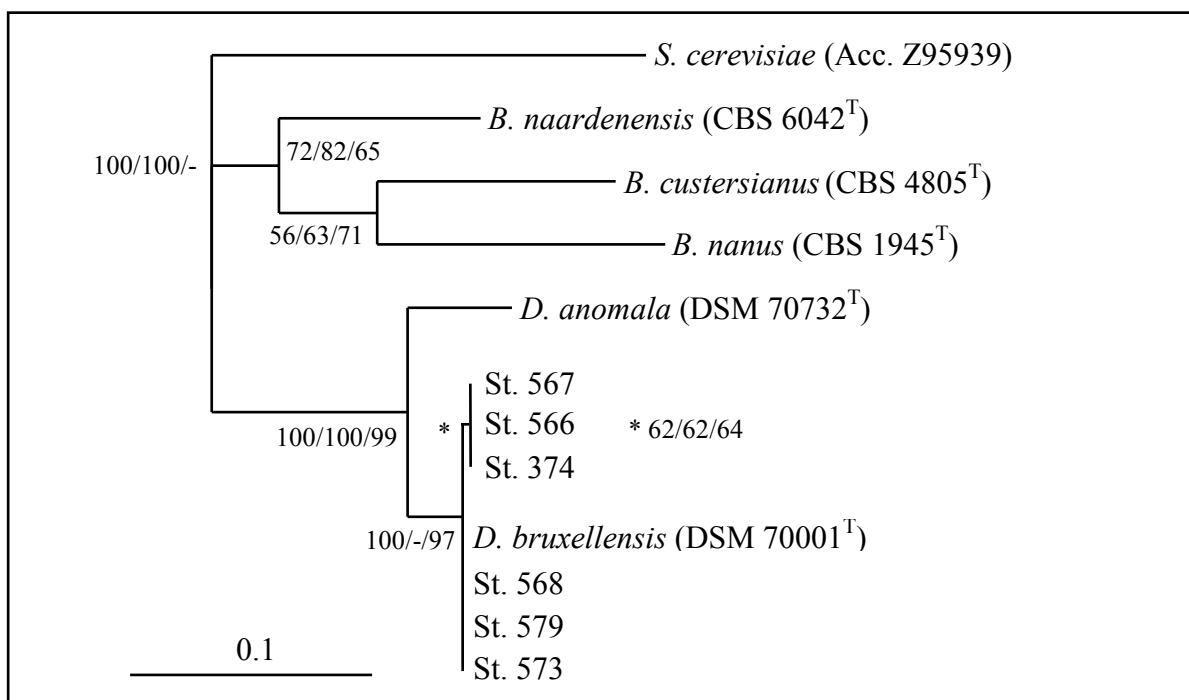
### 3.1.2 ITS-Regionen

Die ITS-Regionen von allen *Brettanomyces/Dekkera*-Typstämmen sowie von sechs Isolaten aus Wein- und Sekt-Proben (Tab. 6) konnten mit den Primern ITS 1 und ITS 4 amplifiziert werden (Abb. 15 u. 17). Nach der Sequenzierung der PCR-Produkte konnte ein Sequenzvergleich mit dem Programm ClustalX 1.83 durchgeführt werden und die ITS-Regionen der Stämme hinsichtlich ihrer Homologie bzw. Variabilität miteinander verglichen werden (siehe Anhang 8.1.1). Die Ergebnisse von phylogenetischen Analysen mit PHYLIP (Felsenstein 1989) konnten graphisch in einem Konsensus-Stammbaum (Abb. 18) unter Verwendung von Tree View 1.6.6 (Page 1996) dargestellt werden. Sowohl durch den Vergleich mit NCBI-Datenbank-Sequenzen als auch durch ihre Position im phylogenetischen Baum ließen sich die untersuchten Isolate eindeutig als Stämme der Art *Dekkera bruxellensis* identifizieren. Im Gegensatz zur 5.8S rDNA, die bei den *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen nur sehr wenige Art-spezifische Nukleotide aufwies, zeigten

die ITS 1 und ITS 2-Bereiche eine hohe Sequenz-Variabilität. Die 5.8S rDNA, der ITS 1 und der ITS 2-Bereich waren in allen untersuchten *D. bruxellensis*-Stämmen konserviert ( $\geq 99\%$  Sequenzhomologie).



**Abb. 17.** PCR-Produkte der ITS-Regionen von der Positiv-Kontrolle *S. cerevisiae* St. 43 (1) und den *D. bruxellensis*-Isolaten St. 374 (2), St. 566 (3), St. 567 (4), St. 568 (5), St. 573 (6), St. 579 (13), sowie den Typstämmen von *D. anomala* (8), *D. bruxellensis* (9), *B. custersianus* (10), *B. nanus* (11) und *B. naardenensis* (12) nach Amplifizierung mit den Primern ITS 1 und ITS 4. Längenstandard M: GeneRuler™ 100 bp DNA ladder.



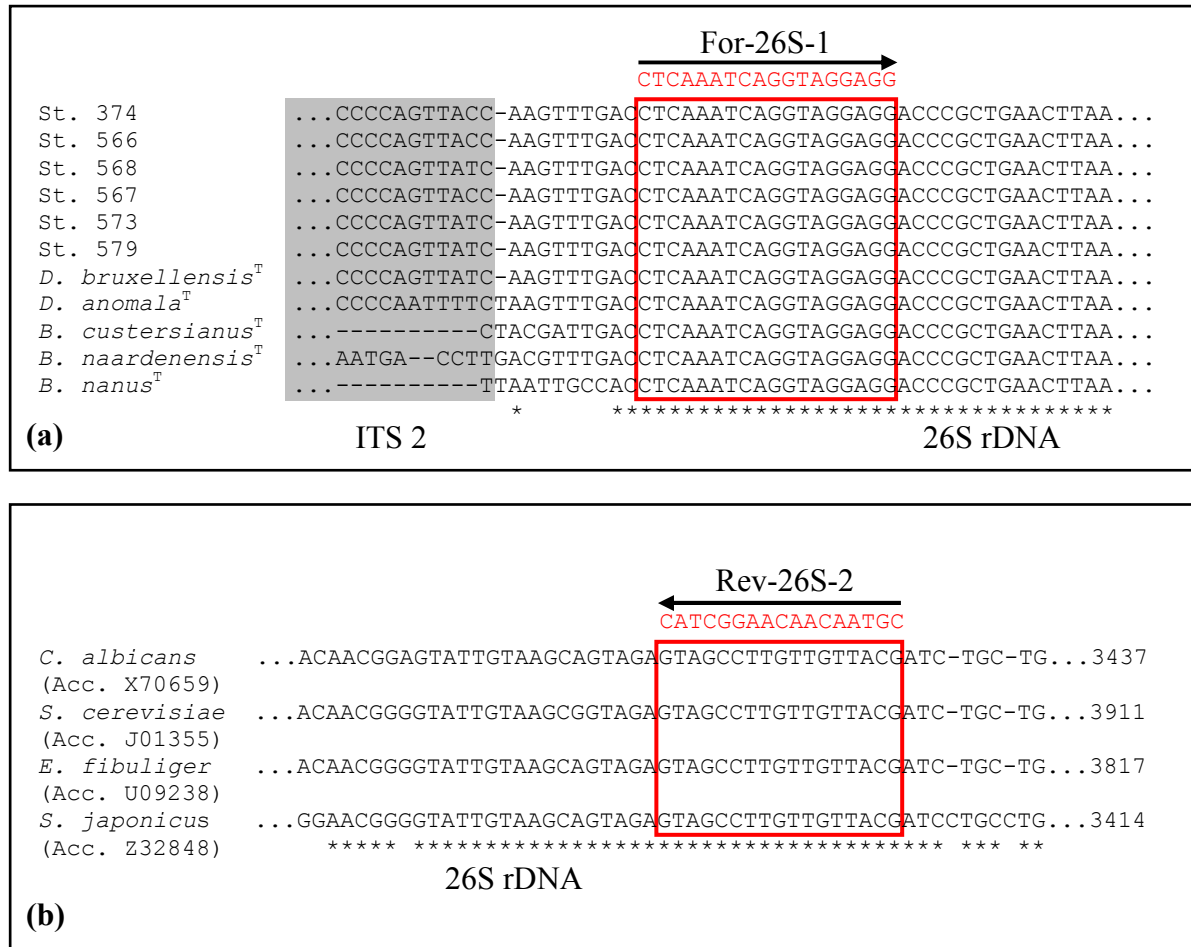
**Abb. 18.** Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der ITS-Regionen von *Dekkera/Brettanomyces*-Arten und *D. bruxellensis*-Stämmen (St.) mit *Saccharomyces cerevisiae* als Außengruppe. Der Konsensus-Baum wurde aus 100 Maximum Likelihood-Bäumen unter Einbeziehung von 304 Alignment-Positionen berechnet. Drei verschiedene Bootstrap-Analysen dienten der statistischen Absicherung: Parsimony, Neighbor-Joining, und Maximum Likelihood. Der Maßstrich entspricht einer phylogenetischen Distanz von 10 %.

### 3.1.3 26S rDNA-Sequenzen

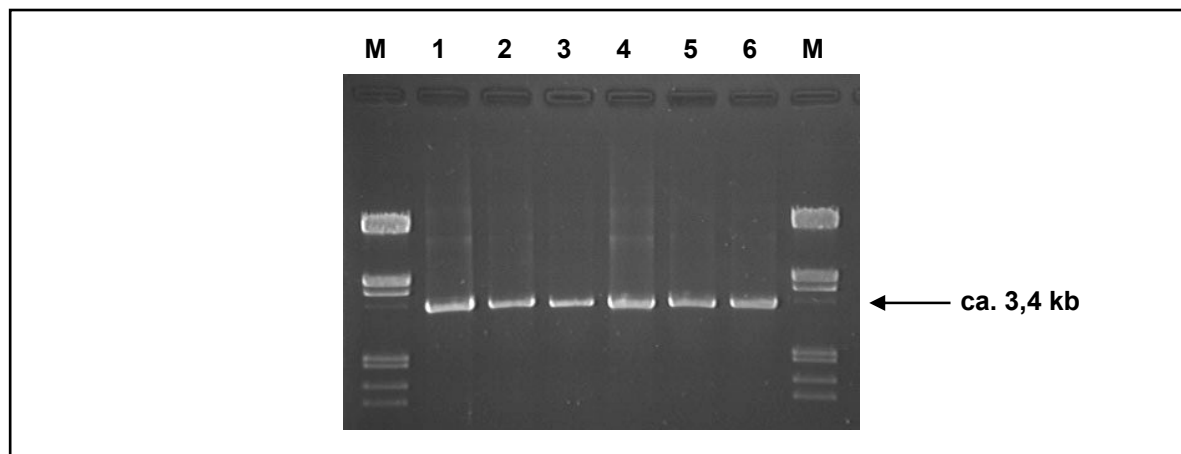
Für die Untersuchung der 26S rDNA standen für Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* nur Teilsequenzen der D1/D2-Region in der NCBI-Datenbank zur Verfügung. Die hinterlegten Sequenzen waren teilweise von geringer Qualität, mit mehrdeutigen Basenzuordnungen. Dennoch gilt diese Region als besonders geeignet, Hefen auf Artniveau zu unterscheiden (Kurtzman & Robnett 1998). Die vollständige Sequenzierung der 26S rDNAs aus den bisher bekannten *Brettanomyces/Dekkera*-Arten sollte in dieser Arbeit der Generierung von artspezifischen DNA-Sonden auf der Basis von rRNA-Sekundärstrukturen dienen.

Zur Amplifizierung der 26S rDNA-Sequenzen wurde ein Forward-Primer generiert, der in konservierten Sequenzbereichen innerhalb der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* bindet. Hierzu wurden die 3'-Bereiche der sequenzierten ITS-Regionen aller Typstämme und *D. bruxellensis*-Institutsstämme miteinander verglichen (ClustalX-Alignment; Abb. 19 a). Bei der Untersuchung der ITS-Regionen konnten auch die angrenzenden 5'-Enden der 26S rDNAs amplifiziert und sequenziert werden. Der Reverse-Primer wurde in einen Bereich am 3'-Ende des Gens gelegt, der in verschiedenen *Ascomyceten* konserviert ist (Abb. 19 b). Die Gen-Sequenzen von *Candida albicans* (Acc. X70659), *Saccharomyces cerevisiae* (Acc. J01355), *Endomyces fibuliger* (Acc. U09238) und *Schizosaccharomyces japonicus* (Acc. Z32848) waren in der NCBI-Datenbank (GenBank) hinterlegt. Durch Variation der Sequenzlänge konnten die Schmelztemperaturen der zwei Primer aufeinander abgestimmt werden. Die mittleren Schmelztemperaturen der Primer For-26S-1 und Rev-26S-2 sind in Tabelle 4 dargestellt.





**Abb. 19.** Generierung des Forward- (a) und des Reverse-Primers (b) in konservierten Sequenzbereichen zur Amplifizierung der 26S rDNA von *Brettanomyces/Dekkera* spec. Am 5'-Ende der 26S rDNA (a) wurden die ITS-Sequenzierungsergebnisse der *Brettanomyces/Dekkera*-Typstämme (<sup>T</sup>) und der *D. bruxellensis*-Isolaten (St.) miteinander verglichen. Für die Suche von konservierten Regionen am 3'-Ende der 26S rDNA wurden hinterlegte Sequenzen aus der NCBI-Datenbank von *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Endomyces fibuliger* und *Schizosaccharomyces japonicus* miteinander verglichen (b).



**Abb. 20.** PCR-Produkte der 26S rDNA-Sequenzen von den Typstämmen (1) *Dekkera anomala* (DSM 70732<sup>T</sup>), (2) *D. bruxellensis* (DSM 70001<sup>T</sup>), (3) *Brettanomyces custersianus* (CBS 4805<sup>T</sup>), (4) *B. nanus* (CBS 1945<sup>T</sup>), (5) *B. naardenensis* (CBS 6042<sup>T</sup>) und dem Isolat (6) *D. bruxellensis* 579 nach Amplifizierung mit den Primern For-26S-1 und Rev-26S-2. Längenstandard M: Lambda DNA / EcoRI+HindIII.

Die ca. 3,4 kb großen PCR-Produkte der 26S rDNA-Sequenzen (Abb. 20) wurden aufgereinigt und konnten schrittweise mit 14 Sequenzier-Primern (Tab. 4), die in konservierten Regionen von hinterlegten Sequenzen verschiedener *Ascomyceten* (Abb. 19 b) binden, in beiden Richtungen als Auftragsarbeit (Brain, Zwingenberg) sequenziert werden. Die Nukleotid-Sequenzen der 26S rDNAs wurden bei GenBank in der NCBI-Datenbank hinterlegt.

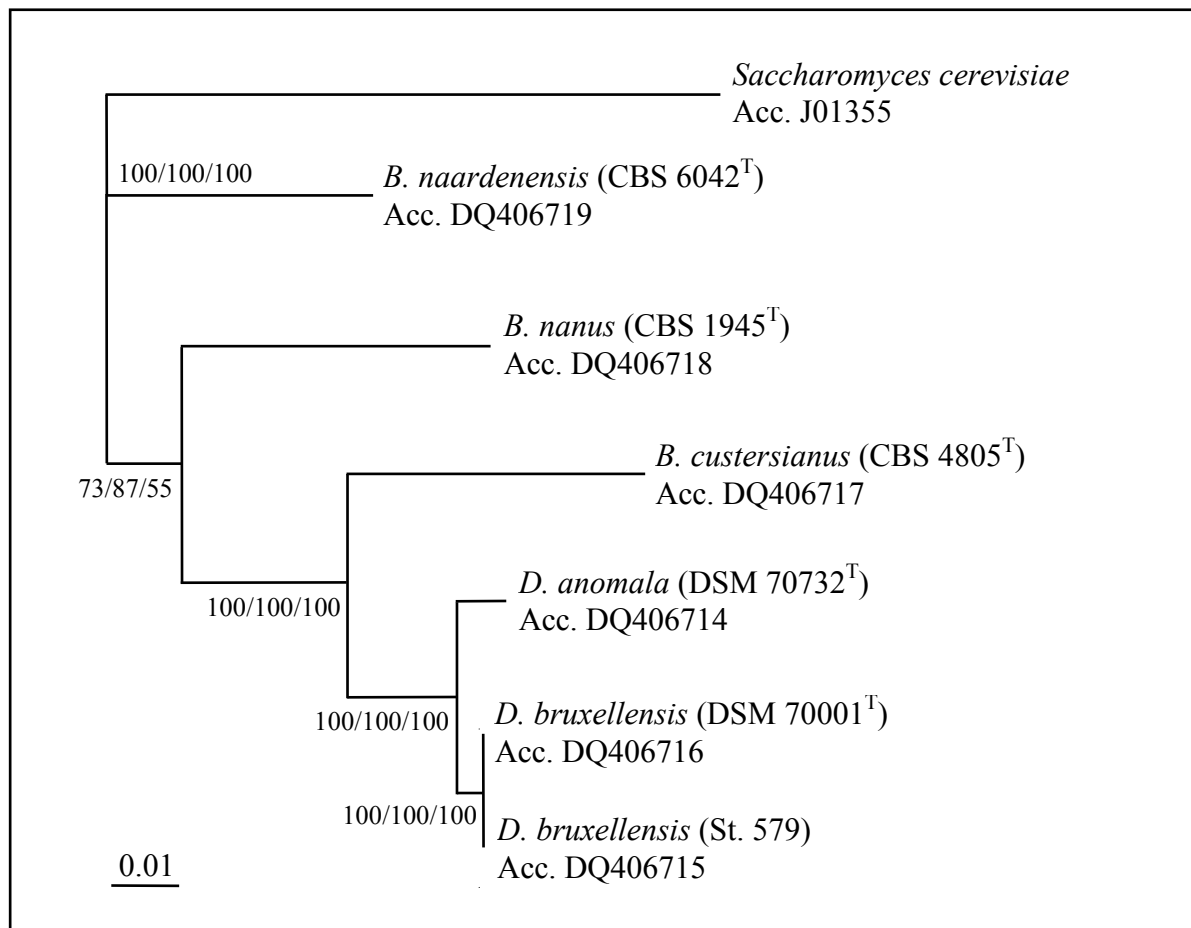
**Tab. 12.** Hefe-Stämme und GenBank-Zugriffsnummern der 26S rDNA-Sequenzen

Art	Stamm	Herkunft <sup>a</sup>	Zugriffsnummer (Acc.)
<i>D. anomala</i>	DSM 70732 <sup>T</sup>	DSMZ	DQ406714
<i>D. bruxellensis</i>	DSM 70001 <sup>T</sup>	DSMZ	DQ406715
<i>D. bruxellensis</i>	St. 579	AG Henick-Kling	DQ406716
<i>B. custersianus</i>	CBS 4805 <sup>T</sup>	CBS	DQ406717
<i>B. nanus</i>	CBS 1945 <sup>T</sup>	CBS	DQ406718
<i>B. naardenensis</i>	CBS 6042 <sup>T</sup>	CBS	DQ406719

<sup>a</sup> Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig; Cornell University, Department of Food Science and Technology (AG Henick-Kling) in New York (USA); Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Utrecht (Niederlande).

<sup>T</sup> = Typstamm.

Auf Basis der 26S rDNA-Sequenzen (siehe Anhang 8.1.2) von allen fünf *Brettanomyces/Dekkera*-Arten und von *Saccharomyces cerevisiae* (Acc. J01355) konnte nach dem Sequenzvergleich (ClustalX 1.83) eine phylogenetische Analyse mit PHYLIP (Felsenstein 1989) durchgeführt werden. Der phylogenetische Baum (Abb. 21) wurde mit dem Programm Tree View 1.6.6 (Page 1996) dargestellt und bearbeitet.



**Abb. 21.** Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der LSU rDNA-Sequenzen der *Brettanomyces/Dekkera*-Arten sowie von *Saccharomyces cerevisiae* als Außengruppe. Der Konsensus-Baum wurde aus 100 Maximum Likelihood-Bäumen unter Einbeziehung von 3240 Alignment-Positionen berechnet. Drei verschiedene Bootstrap-Analysen dienten der statistischen Absicherung: Parsimony, Neighbor-Joining und Maximum Likelihood. Der Maßstrich entspricht einer phylogenetischen Distanz von 1 %.

Durch die vollständige Sequenzierung der 26S rDNAs aller fünf bisher bekannter *Brettanomyces/Dekkera*-Arten (Tab. 11) konnten in dieser Arbeit weitere hochvariable Sequenzbereiche gefunden werden (Tab. 12). Diese Regionen wurden durch eine vergleichende Sequenzanalyse (ClustalX 1.83; Thompson et al. 1997) identifiziert. Dabei wurden sowohl alle *Brettanomyces/Dekkera*-Arten als auch die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, für die eine LSU rRNA-Sekundärstruktur existierte (Cannone et al. 2002; [www.rna.cccb.utexas.edu](http://www.rna.cccb.utexas.edu)), miteinander verglichen (Anhang 8.1.2). Das Alignment der rDNA-Sequenzen zeigte, dass sich die Art-spezifischen Bereiche nicht nur auf die ca. 600 bp großen D1/D2-Domänen am 5'-Ende der 26S rDNA beschränken, sondern in mehreren Clustern über die ca. 3,4 kb große Gensequenz verteilt sind. Eine Anzahl von sechs variablen Regionen, die hinter den D1/D2-Domänen (in 3'-Richtung) positioniert sind und als V1 bis V6 bezeichnet wurden, konnten zur Generierung von spezifischen DNA-Sonden verwendet werden.

Auf den 26S rDNAs der *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen befindet sich hinter den D1/D2-Domänen, in 3'-Richtung gesehen, der erste variable Bereich zwischen den Sequenz-Positionen 801 und 885 [bezogen auf die Sequenz von *S. cerevisiae* (Acc. J01355)]. Die nächsten zwei Regionen mit divergenten Nukleotiden erstrecken sich dicht neben einander über die Positionen 1649 bis 1740 (V3) und 1873 bis 1932 (V4). Die meisten artspezifischen Basen der 26S rDNAs (bezogen auf die Sequenzlänge) konnten im Cluster V1 zwischen den Positionen 2063 und 2202 gefunden werden. Diese Region übertrifft sogar die Variabilität der D1 oder D2-Domäne. Ein weiterer Bereich (V2) befindet sich zwischen den Positionen 2670 und 2695. Die letzte Region V6 (Position 3300 bis 3373) am 3'-Ende der 26S rDNA zeigt ebenfalls eine ausreichend hohe Variabilität zur Generierung von Art-spezifischen DNA-Sonden.

Die sechs hochvariablen Regionen (V1-V6) sind hinsichtlich ihrer Position, ihrer Größe und ihrer Spezifität im Vergleich mit den bekannten D1/D2-Domänen in Tabelle 13 dargestellt.

**Tab. 13.** Spezies-spezifische Nukleotide und Sequenzlängen der hochvariablen Regionen der 26S rDNAs

	rDNA-Region							
	D1/D2	V1-V6	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Relative Position <sup>a</sup>	121-748	802-3373	2064-2201	2671-2694	1649-1740	1872-1931	802-884	3300-3373
Sequenz-Länge (bp) <sup>b</sup>	385	505	137	26	100	75	89	78
	Spezifische Nukleotide							
<i>D. anomala</i> <sup>T</sup>	6	19	8	3	3	-	2	3
<i>D. bruxellensis</i> <sup>T</sup>	13	18	7	3	3	2	2	1
<i>B. custersianus</i> <sup>T</sup>	46	59	16	5	18	6	1	13
<i>B. nanus</i> <sup>T</sup>	53	75	35	3	10	8	14	5
<i>B. naardenensis</i> <sup>T</sup>	48	73	43	6	10	2	7	5

<sup>a</sup> Die Positionsangaben beziehen sich auf *Saccharomyces cerevisiae* (Acc. J01355).

<sup>b</sup> Hochvariable Sequenzbereiche ohne konservierte Abschnitte. Die Sequenz-Längen beziehen sich auf *D. bruxellensis* (Acc. DQ406715).

<sup>T</sup> = Typstamm.

### 3.2 Die Generierung von 26S rRNA-Sekundärstrukturen

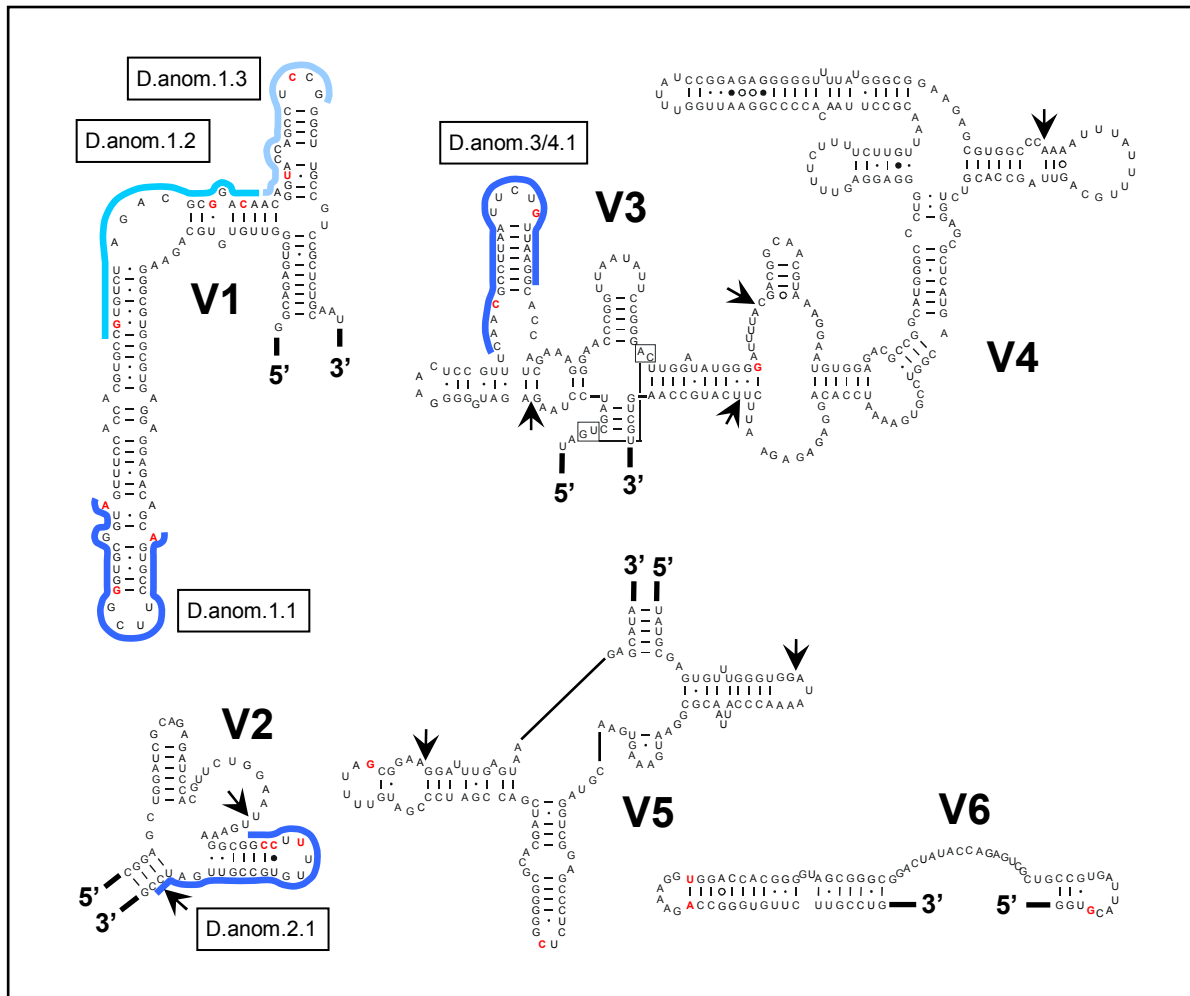
Für jede *Brettanomyces/Dekkera*-Art konnte jeweils eine spezifische Sekundärstruktur ihrer 26S rRNA generiert werden (Anhang 8.2). Dies wurde durch den Vergleich einer 26S rDNA-Sequenz von *Brettanomyces/Dekkera* mit einer hinterlegten Sequenz bzw. deren Sekundärstruktur von der nahe verwandten Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Cannone et al. 2002) ermöglicht. Die Sekundärstrukturen stimmten in allen fünf *Brettanomyces/Dekkera*-Arten zu über 80 % überein. Mit dem Programm RNAstructure 4.2 (Mathews et al. 2004) konnten die hochvariablen Bereiche hinsichtlich ihrer Struktur überprüft werden. Strukturänderungen wurden über MS Word in die Ausgangsstruktur von *S. cerevisiae* durch Verschieben von Basen und Bindungszeichen eingearbeitet. In den meisten Fällen führte dies zu Deletionen, Insertionen oder Positionsänderungen von Basen innerhalb einzelsträngiger Loops bzw. Verkürzungen oder Verlängerungen von doppelsträngigen Sequenzbereichen (Abb. 22 - 26).

### 3.3 Entwicklung von spezifischen DNA-Sonden

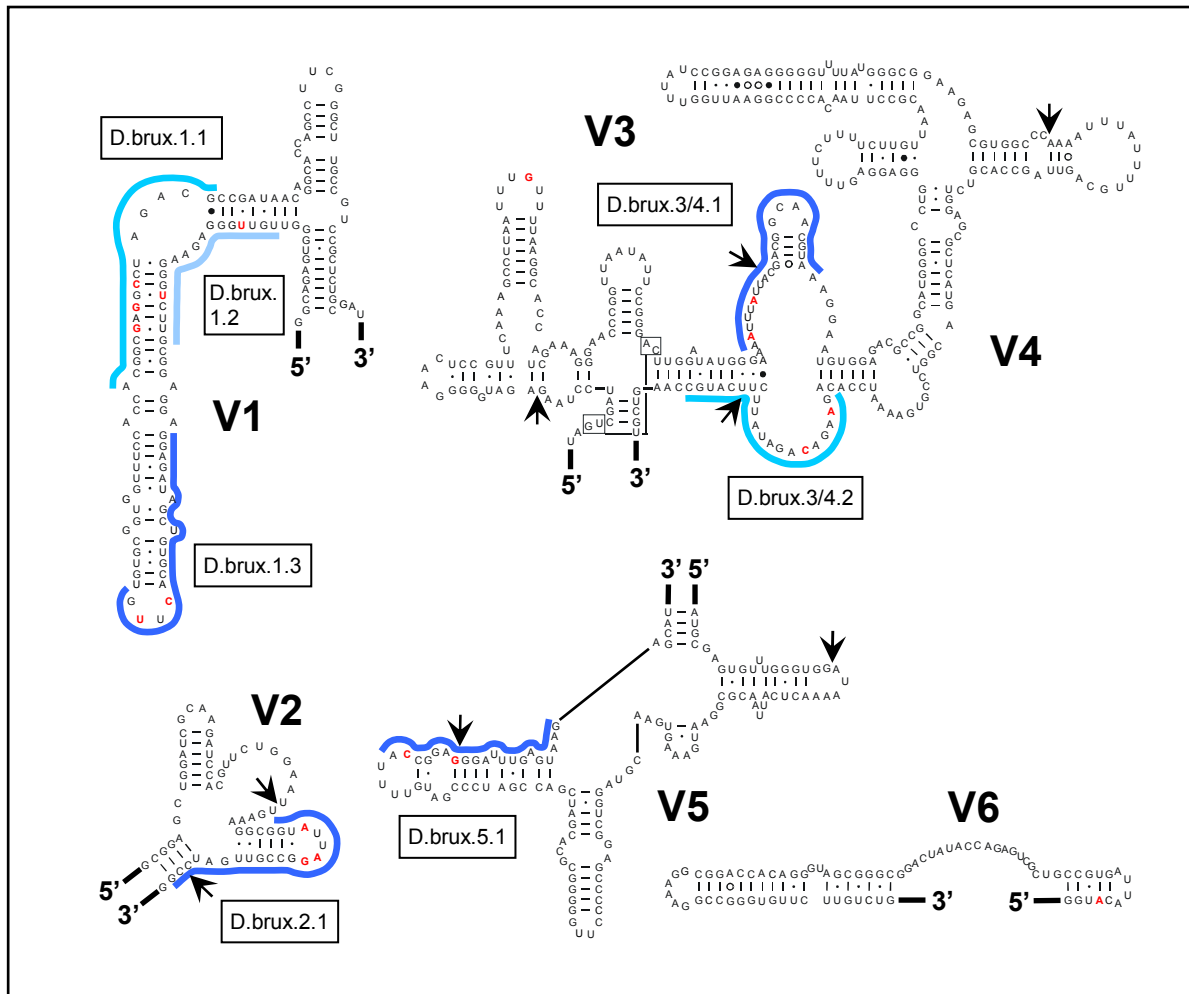
Eine Anzahl von 49 Cy3-markierten Oligonukleotiden (Tab. 6) konnte in dieser Arbeit als Sonden und Gemeinschafts-Sonden („side probes“, Röder et al. 2007a) generiert werden, die an hochvariable rRNA-Regionen strangabwärts der D1/D2-Domänen binden (Abb. 22 - 26). Nicht immer waren die Positionen der spezifischen Nukleotide in den Sekundärstrukturen dazu geeignet, Sonden zu entwickeln, die sich gegenseitig in ihrer Anbindung an die Zielsequenzen unterstützen (Gemeinschafts-Sonden). Um die Möglichkeit einer unspezifischen Sonden-Bindung auszuschließen, wurden keine allgemeinen Helfer-Sonden verwendet (O’Meara et al. 1998), sondern ausschließlich spezifische Oligonukleotide. Folgende grundlegenden Eigenschaften wurden bei der Generierung der DNA-Sonden berücksichtigt und haben sich in den Hybridisierungs-Experimenten bewährt:

- Sequenzlänge der Oligonukleotide 16 - 26 bp.
- GC-Gehalt zwischen 40 - 70 %.
- Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) zwischen 55 - 65 °C.
- $T_m$ -Differenz von Gemeinschafts-Sonden unter 5 °C.
- Keine Selbstkomplementarität in der Sequenz, die zu Haarnadelstrukturen führen kann.
- Keine Komplementärsequenzen zwischen verschiedenen Sonden.
- Keine PolyA- und GC-Folgen.
- Berücksichtigung der jeweiligen Sekundärstruktur der Zielregion:
  - Einzelsträngige Ziel-Bereiche können die Anbindung der Sonden erleichtern.
  - Teilweise komplementäre Gemeinschafts-Sonden können sich gegenseitig in der Anbindung an doppelsträngige Bereiche unterstützen.
  - Komplementärbereiche von Gemeinschafts-Sonden sollten nicht mehr als 50 % der Nukleotid-Längen umfassen.
  - Direkt benachbarte Sonden können sich gegenseitig unterstützen.

Die Sonden beinhalten jeweils zwei bis zehn Art-spezifische Basen (Tab. 6). Der Vergleich mit hinterlegten rDNA-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank (Blast-Suche) ergab hinsichtlich der Zielsequenzen keine Übereinstimmungen mit anderen Wein-relevanten Hefen, Pilzen oder Bakterien.

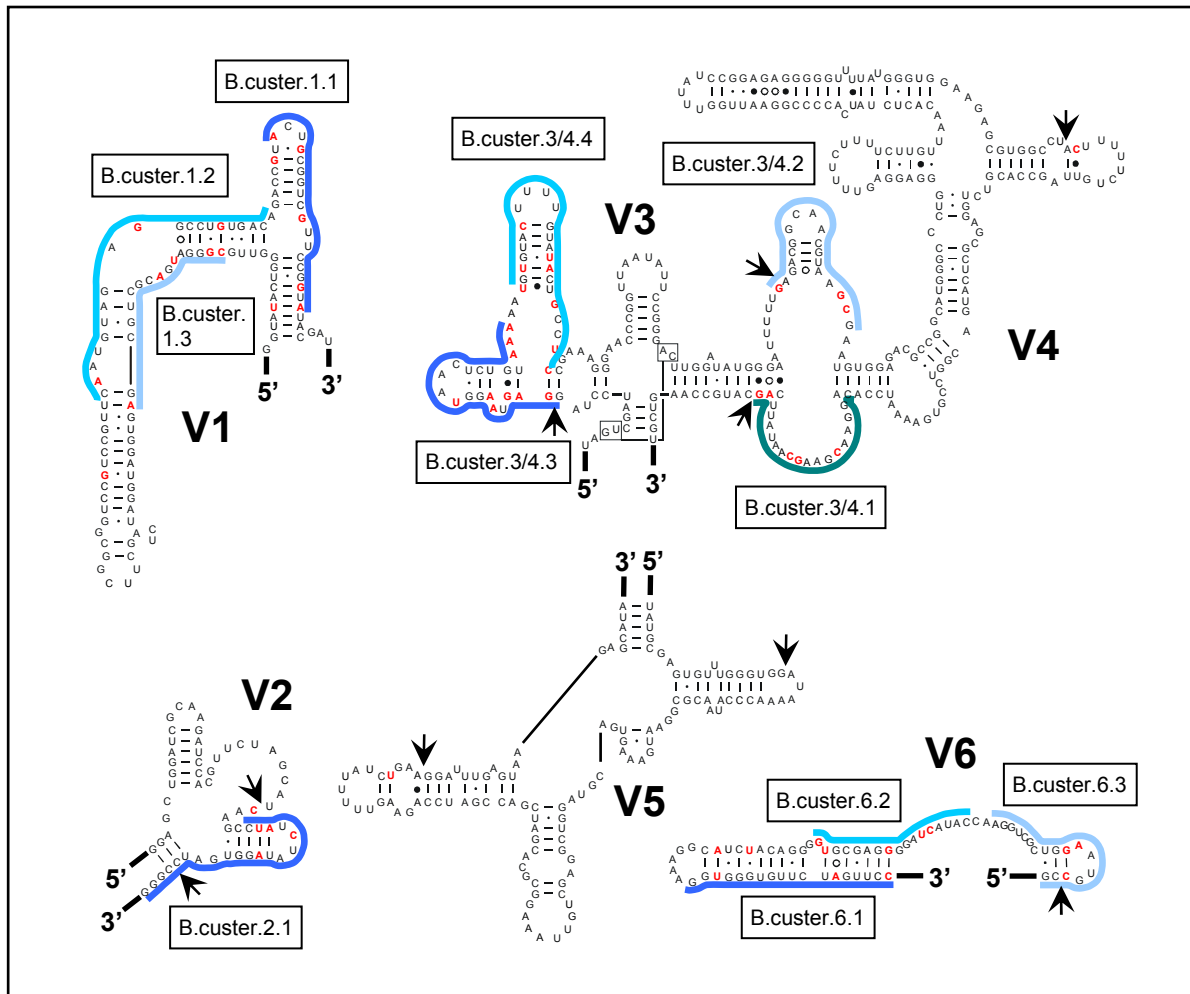


**Abb. 22.** Modelle der variablen LSU rRNA-Regionen von *D. anomala* (DQ406714). Die Strukturen sind Ausschnitte aus der Gesamtstruktur (Anhang 8.2). Sie basieren auf der LSU rRNA-Sekundärstruktur von *S. cerevisiae* (Cannone *et al.* 2002) und wurden mit Hilfe von RNAstructure 4.2 generiert. Die Begrenzungen der sechs variablen Sequenzereiche (V1-V6) sind durch kurze Pfeile dargestellt. Rot-markierte Nukleotide sind Art-spezifisch und unterscheiden sich von allen anderen *Brettanomyces/Dekkera*-Arten und von *S. cerevisiae*. Die Zielregionen für Cy3-markierte DNA-Sonden sind mit blauen Linien markiert.

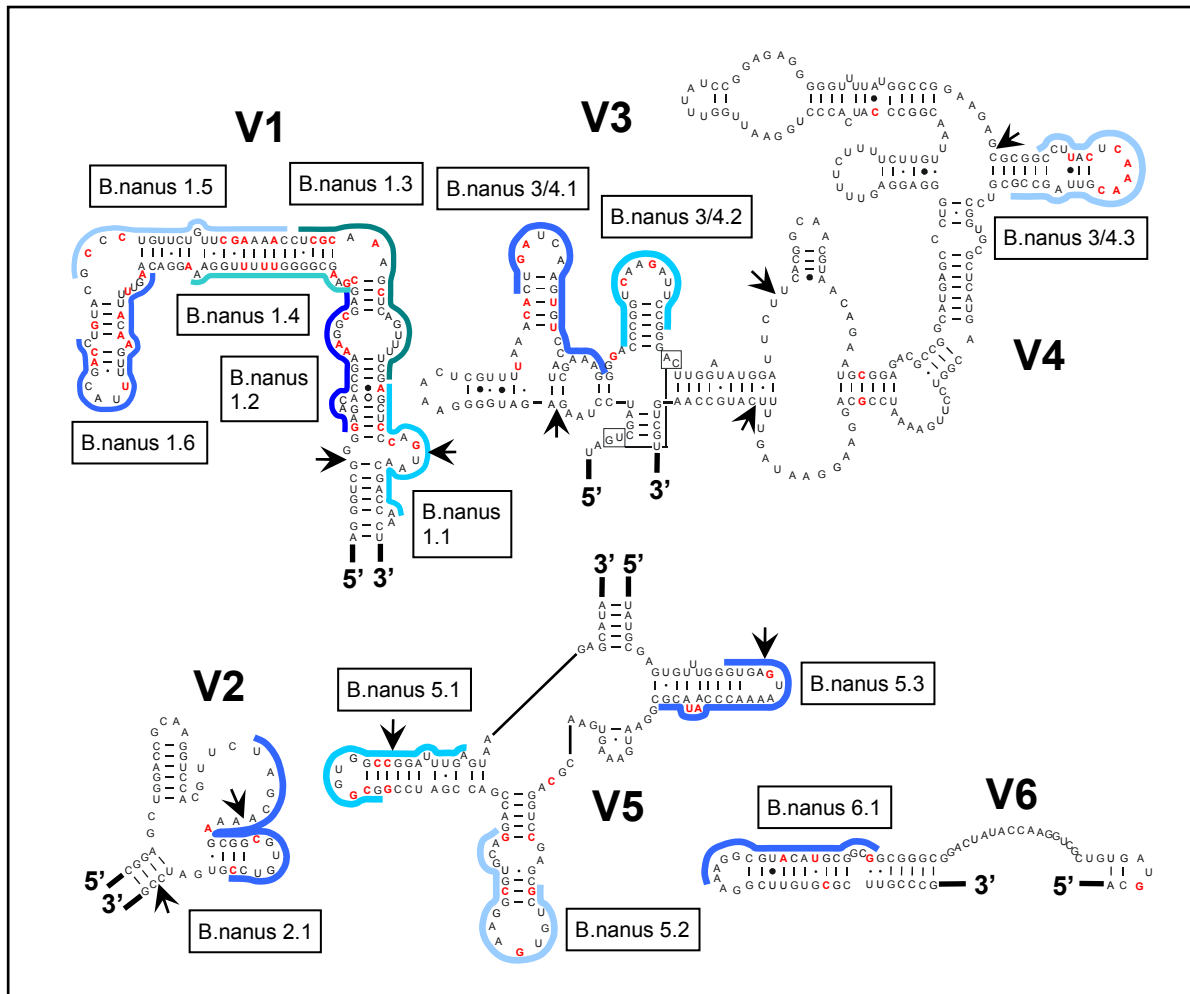


**Abb. 23.** Modelle der variablen LSU rRNA-Regionen von *Dekkera bruxellensis* (DQ406715). Die Strukturen sind Ausschnitte aus der Gesamtstruktur (Anhang 8.2). Sie basieren auf der LSU rRNA-Sekundärstruktur von *S. cerevisiae* (Cannone *et al.* 2002) und wurden mit Hilfe von RNAstructure 4.2 generiert. Die Begrenzungen der sechs variablen Sequenzbereiche (V1-V6) sind durch kurze Pfeile dargestellt. Rot-markierte Nucleotide sind Art-spezifisch und unterscheiden sich von allen anderen *Brettanomyces/Dekkera*-Arten und von *S. cerevisiae*. Die Zielregionen für Cy3-markierte DNA-Sonden sind mit blauen Linien markiert.

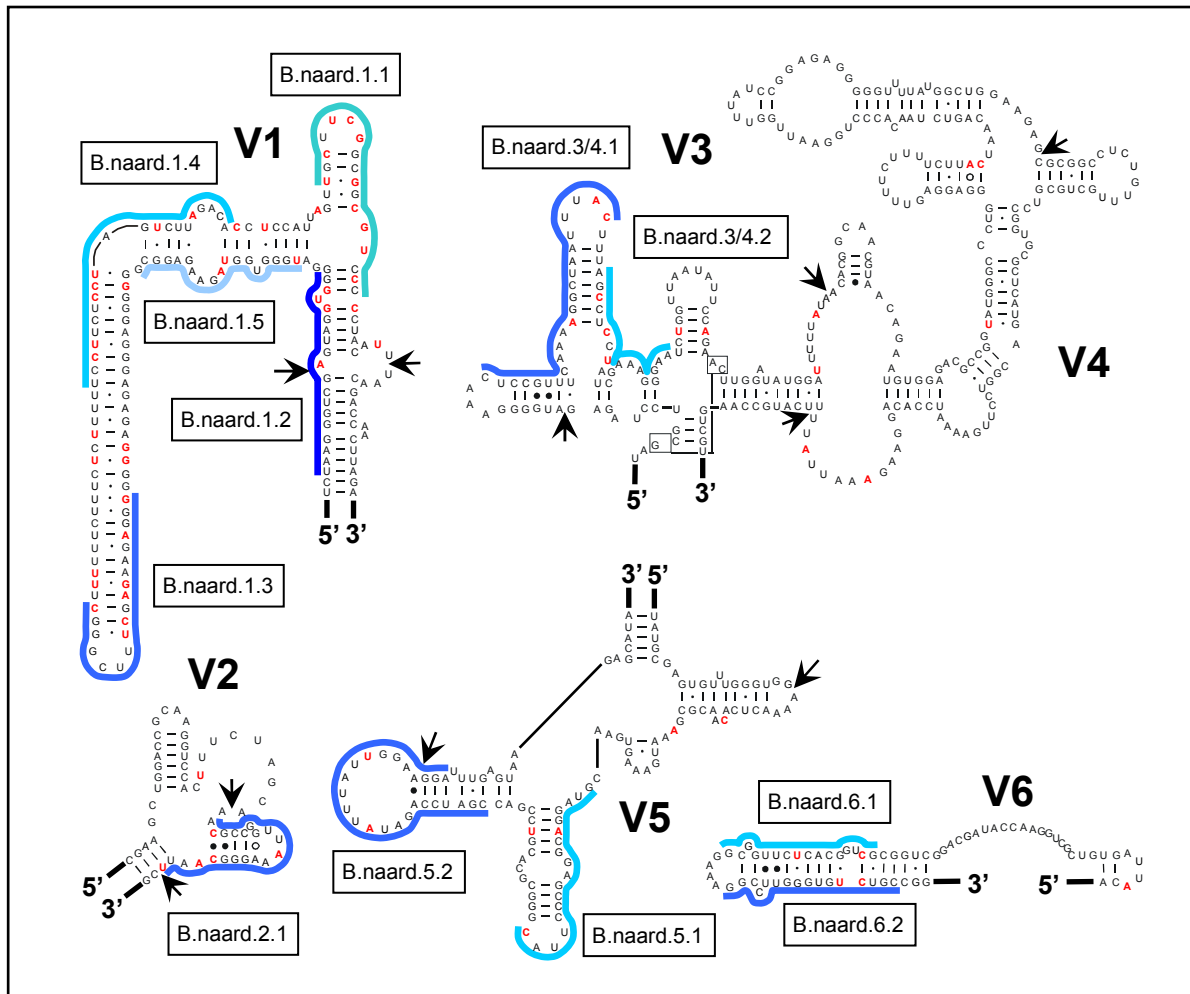




**Abb. 24.** Modelle der variablen LSU rRNA-Regionen von *B. custersianus* (DQ406717). Die Strukturen sind Ausschnitte aus der Gesamtstruktur (Anhang 8.2). Sie basieren auf der LSU rRNA-Sekundärstruktur von *S. cerevisiae* (Cannone *et al.* 2002) und wurden mit Hilfe von RNAstructure 4.2 generiert. Die Begrenzungen der sechs variablen Sequenzereiche (V1-V6) sind durch kurze Pfeile dargestellt. Rot-markierte Nukleotide sind Art-spezifisch und unterscheiden sich von allen anderen *Brettanomyces/Dekkera*-Arten und von *S. cerevisiae*. Die Zielregionen für Cy3-markierte DNA-Sonden sind mit blauen Linien markiert.



**Abb. 25.** Modelle der variablen LSU rRNA-Regionen von *Brettanomyces nanus* (DQ406718). Die Strukturen sind Ausschnitte aus der Gesamtstruktur (Anhang 8.2). Sie basieren auf der LSU rRNA-Sekundärstruktur von *S. cerevisiae* (Cannone *et al.*, 2002) und wurden mit Hilfe von RNAstructure 4.2 generiert. Die Begrenzung der sechs variablen Sequenzereiche (V1-V6) ist zum Teil durch kurze Pfeile dargestellt. Rot-markierte Nucleotide sind Art-spezifisch und unterscheiden sich von allen anderen *Brettanomyces/Dekkera*-Arten und von *S. cerevisiae*. Die Zielregionen für Cy3-markierte DNA-Sonden sind mit blauen Linien markiert.

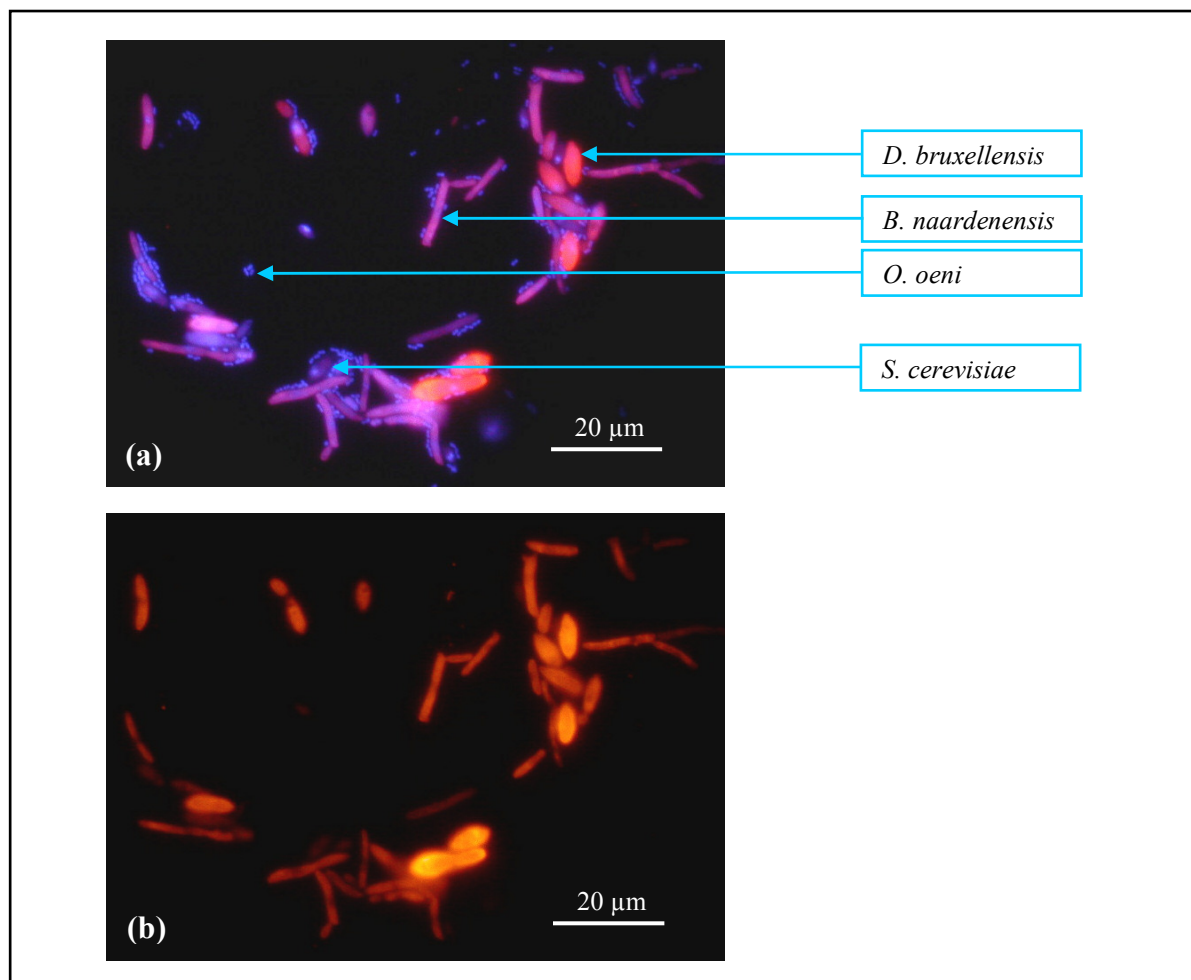


**Abb. 26.** Modelle der variablen LSU rRNA-Regionen von *Brettanomyces naardenensis* (DQ406719). Die Strukturen sind Ausschnitte aus der Gesamtstruktur (Anhang 8.2). Sie basieren auf der LSU rRNA-Sekundärstruktur von *S. cerevisiae* (Cannone *et al.*, 2002) und wurden mit Hilfe von RNAstructure 4.2 generiert. Die Begrenzung der sechs variablen Sequenzbereiche (V1-V6) ist zum Teil durch kurze Pfeile dargestellt. Rot-markierte Nukleotide sind Art-spezifisch und unterscheiden sich von allen anderen *Brettanomyces/Dekkera*-Arten und von *S. cerevisiae*. Die Zielregionen für Cy3-markierte DNA-Sonden sind mit blauen Linien markiert.

### 3.4 Die Detektion und Identifizierung durch FISH

#### 3.4.1 FISH mit 18S rRNA-gerichteten Sonden

In Vorversuchen wurden bereits vorhandene DNA-Sonden (Tab. 5), die an die 18S rRNA (SSU) von *Brettanomyces/Dekkera* binden, in Hybridisierungen eingesetzt. Die Sonden ermöglichten in künstlichen Mischungen aus verschiedenen Hefen und Milchsäurebakterien eine Identifizierung auf Gattungsniveau (Abb. 27). Eine zusätzliche Permeabilisierung der Hefezellwand durch Resuspension der Zellen mit Waschpuffer vor der Hitze-fixierung führte zu einer besseren Durchlässigkeit für die Oligonukleotid-Sonden und somit zu einem stärkeren Fluoreszenz-Signal.



**Abb. 27.** Mikroskopische Aufnahmen der FISH einer künstlichen Mischung aus *D. bruxellensis* (DSM 70001<sup>T</sup>), *B. naardenensis* (CBS 6042<sup>T</sup>), *Saccharomyces cerevisiae* (St. 43) und *Oenococcus oeni* (B 70) mit einer 18S rRNA-Sondenmischung (Tab. 5). (a) Ansicht mit Kombinationsfilter für Cy3-markierte DNA-Sonden (rot) und DAPI (blau). (b) Ansicht mit Cy3-Sondenfilter.

### 3.4.2 FISH mit 26S rRNA-gerichteten Sonden

Eine Art-spezifische Detektion und Identifizierung konnte erstmals mit den in dieser Arbeit entwickelten Sonden erreicht werden (Abb. 28, 29), die an hochvariable Sequenzbereiche der 26S rRNA in den *Brettanomyces/Dekkera*-Spezies binden. Die FISH-Experimente wurden mit unterschiedlichen Hybridisierungs- und Waschttemperaturen durchgeführt, um die Spezifität und das Signal zu optimieren. Die Signalstärken konnten visuell evaluiert und in vier Kategorien eingeteilt werden (Tab. 14, Abb. 28). Neunundzwanzig Cy3-markierte DNA-Sonden (67 % von allen untersuchten Sonden) lieferten ein deutliches Fluoreszenz-Signal mit einer zumindest „mittleren“ Intensität. Fünf von ihnen zeigten bei der mikroskopischen Auswertung sogar eine überdurchschnittlich hohe Intensität. Bei drei Sonden (26S-B.nanus 1.3, 26S-B.nanus 1.5, 26S-B.nanus 3/4.1) konnte kein eindeutiges Signal beobachtet werden. Darüber hinaus konnte eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz-Ausbeute durch die Applikation von Gemeinschafts-Sonden (26S-D.anom. 1.2, 1.3; 26S-B.custer. 1.2, 1.3; 26S-B.custer. 6.1, 6.2, 6.3; 26S-B.nanus 1.1, 1.2; 26S.-B.nanus 3/4.1, 3/4.2; 26S-B.naard. 1.1, 1.2; 26S-B.naard. 1.4, 1.5; 26S-B.naard. 3/4.1, 3/4.2) in den Hybridisierungs-Ansätzen festgestellt werden. Schließlich wurde auch eine Steigerung der Sonden-Spezifität in Ansätzen mit Gemeinschafts-Sonden (26S-D.brux. 3/4.1, 3/4.2; 26S-B.custer. 3/4.3, 3/4.4; 26S-B.custer. 6.1, 6.2, 6.3) beobachtet.

**Tab. 14.** Ergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierungen mit Cy3-markierten DNA-Sonden

In situ Hybridisierung				Fluoreszenz-Signal <sup>a</sup>				
Sonden <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> (°C) <sup>c</sup>	T <sub>H</sub> (°C) <sup>d</sup>	T <sub>W</sub> (°C) <sup>d</sup>	<i>D. anom.</i>	<i>D. brux.</i>	<i>B. custer.</i>	<i>B. nanus</i>	<i>B. naard.</i>
26S-D.anom.1.1	61.0	56.0	59.0	+	+/-	-	-	-
26S-D.anom.1.2	58.2	50.0	54.0	+	-	-	-	-
26S-D.anom.1.3	58.6	50.0	52.0	+	-	-	-	-
26S-D.anom.1.2	58.2	50.0	52.0	++	-	-	-	-
26S-D.anom.1.3	58.6							
26S-D.anom.2.1	59.4	55.0	57.0	+/-	-	-	-	-
26S-D.anom.3/4.1	56.5	50.0	52.0	+/-	-	-	-	-
26S-D.brux. 1.1	60.0	56.0	58.0	-	+	-	-	-
26S-D.brux. 1.2	60.2	53.0	55.0	-	++	-	-	-
26S-D.brux. 1.1	60.0	56.0	57.0	-	++	-	-	-
26S-D.brux. 1.2	60.2							
26S-D.brux. 1.3	56.7	54.0	56.0	-	+	-	-	-
26S-D.brux. 2.1	60.2	56.0	57.0	-	+	-	-	-

Tab. 14. Fortsetzung

In situ Hybridisierung				Fluoreszenz-Signal <sup>a</sup>				
Sonden <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> (°C) <sup>c</sup>	T <sub>H</sub> (°C) <sup>d</sup>	T <sub>w</sub> (°C) <sup>d</sup>	<i>D. anom.</i>	<i>D. brux.</i>	<i>B. custer.</i>	<i>B. nanus</i>	<i>B. naard.</i>
26S-D.bru.3/4.1	55.3	52.0	54.0	+	+	-	-	-
26S-D.bru.3/4.2	56.5	52.0	54.0	+/-	+	-	-	-
26S-D.bru.3/4.1	55.3	52.0	54.0	-	+	-	-	-
26S-D.bru.3/4.2	56.5							
26S-D.bru.5.1	57.3	54.0	57.0	+/-	++	-	-	-
26S-B.custer. 1.1	58.2	54.0	55.0	-	+/-	-	-	-
26S-B.custer. 1.2	57.3	54.0	57.0	-	-	+	-	-
26S-B.custer. 1.3	56.9	50.0	52.0	-	-	+	-	-
26S-B.custer. 1.2	58.2	55.0	56.0	-	-	++	-	-
26S-B.custer. 1.3	56.9							
26S-B.custer. 2.1	57.3	52.0	54.0	-	-	+	-	-
26S-B.custer.3/4.1	55.9	52.0	54.0	-	-	+	-	-
26S-B.custer.3/4.2	58.2	52.0	54.0	-	+/-	+	-	-
26S-B.custer.3/4.1	55.9	53.0	54.0	-	+/-	+	-	-
26S-B.custer.3/4.2	58.2							
26S-B.custer.3/4.3	54.0	52.0	54.0	-	+/-	+	-	-
26S-B.custer.3/4.4	59.7	56.0	58.0	-	-	+	-	-
26S-B.custer.3/4.3	54.0	52.0	54.0	-	-	++	-	-
26S-B.custer.3/4.4	59.7							
26S-B.custer.6.1	60.7	57.0	60.0	-	-	+	-	-
26S-B.custer.6.2	60.0	56.0	59.0	-	+/-	+	-	-
26S-B.custer.6.3	62.4	58.0	61.0	-	+/-	+	-	-
26S-B.custer.6.1	60.7	57.0	60.0	-	-	++	-	-
26S-B.custer.6.2	60.0							
26S-B.custer.6.3	62.4							
26S-B.nanus 1.1	56.7	53.0	55.0	-	-	-	+/-	-
26S-B.nanus 1.2	58.2	53.0	55.0	-	-	-	+/-	-
26S-B.nanus 1.1	56.7	53.0	55.0	-	-	-	+	-
26S-B.nanus 1.2	58.2							
26S-B.nanus 1.3	54.5	48.0	51.0	-	-	-	-	-
26S-B.nanus 1.4	56.7	50.0	52.0	-	+/-	-	-	-
26S-B.nanus 1.3	54.5	48.0	51.0	-	+/-	-	+/-	-
26S-B.nanus 1.4	56.7							
26S-B.nanus 1.5	57.3	52.0	54.0	-	-	-	-	-
26S-B.nanus 1.4	56.7	52.0	54.0	-	-	-	-	-
26S-B.nanus 1.5	57.3							
26S-B.nanus 1.6	54.8	52.0	54.0	+/-	+/-	-	-	-
26S-B.nanus 1.5	57.3	48.0	51.0	+/-	-	-	-	-
26S-B.nanus 1.6	54.8							
26S-B.nanus 2.1	58.8	50.0	54.0	-	-	-	++	-
26S-B.nanus 3/4.1	55.9	52.0	54.0	-	-	-	-	-

Tab. 14. Fortsetzung

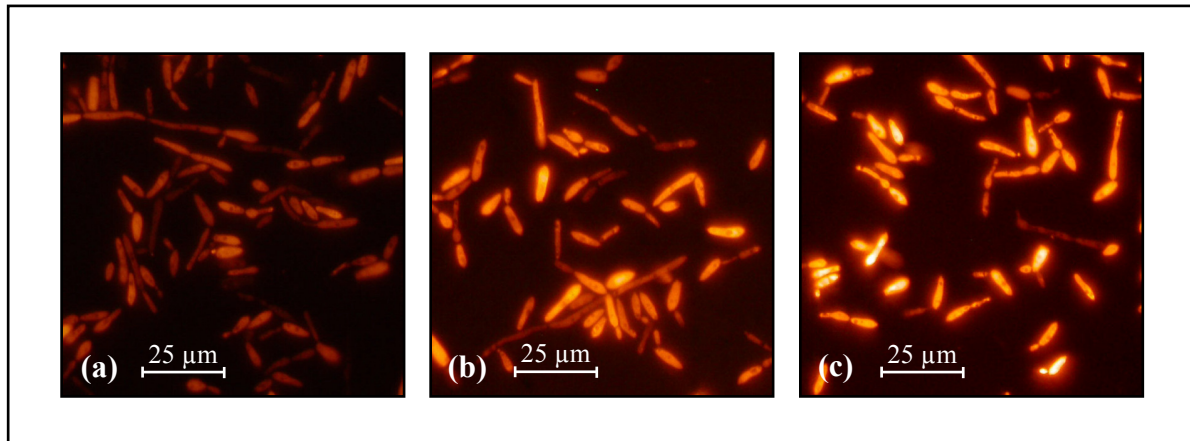
In situ Hybridisierung				Fluoreszenz-Signal <sup>a</sup>				
Sonden <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> (°C) <sup>c</sup>	T <sub>H</sub> (°C) <sup>d</sup>	T <sub>W</sub> (°C) <sup>d</sup>	<i>D. anom.</i>	<i>D. brux.</i>	<i>B. custer.</i>	<i>B. nanus</i>	<i>B. naard.</i>
26S-B.nanus 3/4.2	54.3	52.0	54.0	–	–	–	+/-	–
26S-B.nanus 3/4.1	55.9	52.0	54.0	–	–	–	+	–
26S-B.nanus 3/4.2	54.3							
26S-B.nanus 3/4.3	57.3	50.0	54.0	+/-	–	–	+/-	–
26S-B.nanus 5.1	57.6	53.0	55.0	–	–	–	+	–
26S-B.nanus 5.3	58.4	56.0	57.0	–	–	–	++	–
26S-B.naard. 1.1	62.4	58.0	59.0	–	–	–	–	+/-
26S-B.naard. 1.2	58.8	53.0	55.0	–	–	–	–	+
26S-B.naard. 1.1	62.4	54.0	56.0	–	–	–	–	++
26S-B.naard. 1.2	58.8							
26S-B.naard. 1.4	56.5	50.0	52.0	–	–	–	–	+/-
26S-B.naard. 1.5	58.2	53.0	55.0	–	–	–	–	+
26S-B.naard. 1.4	56.5	55.0	56.0	–	–	–	–	++
26S-B.naard. 1.5	58.2							
26S-B.naard. 1.1	62.4	54.0	58.0	+/-	+/-	+/-	+/-	++
26S-B.naard. 1.4	56.5							
26S-B.naard. 1.5	58.2							
26S-B.naard.2.1	57.3	52.0	54.0	+/-	+/-	–	–	+
26S-B.naard.3/4.1	57.6	52.0	54.0	–	–	–	–	+
26S-B.naard.3/4.2	57.3	52.0	54.0	–	–	–	–	+
26S-B.naard.3/4.1	57.6	52.0	54.0	–	–	–	–	++
26S-B.naard.3/4.2	57.3							
26S-B.naard.5.2	57.6	52.0	54.0	–	–	–	–	+

<sup>a</sup> Visuelle Klassifizierung in vier Kategorien: – kein Signal, +/- niedrig, + mittel, ++ hoch (vgl. Abb. 28).

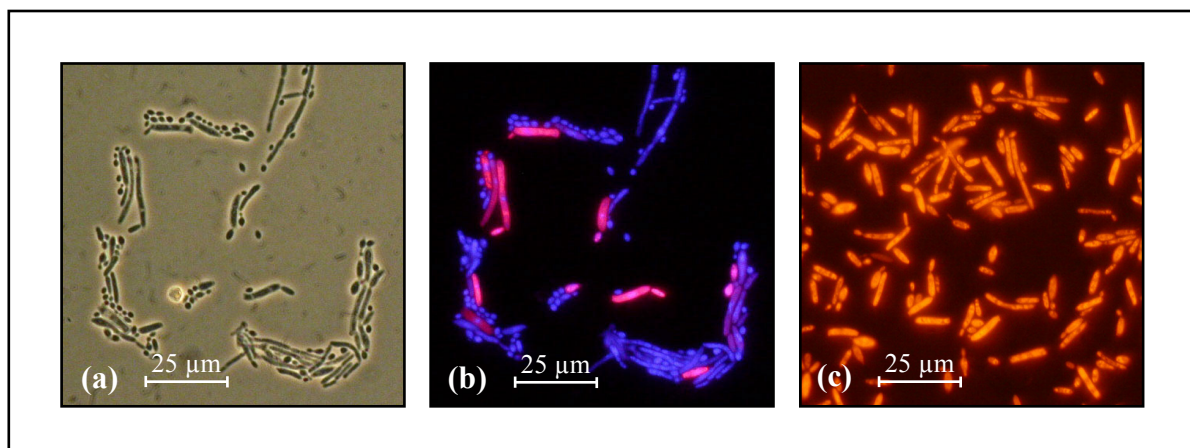
<sup>b</sup> Die Sonden wurden einzeln getestet und in Kombination (Gemeinschafts-Sonden).

<sup>c</sup> Mittlere Schmelztemperaturen laut Herstellerangaben (Formel siehe Kapitel 2.6).

<sup>d</sup> Verschiedene Temperaturen wurden für die Hybridisierung (T<sub>H</sub>) und die Waschritte (T<sub>W</sub>) angewandt. Die optimalen Temperaturen sind hier gezeigt.



**Abb. 28.** Evaluierte Fluoreszenz-Kategorien: (a) niedrig (+/-), *D. bruxellensis* (DSM 70001<sup>T</sup>) hybridisiert mit 26S-D.brux. 3/4.2; (b) mittel (+), *D. bruxellensis* (DSM 70001<sup>T</sup>) hybridisiert mit 26S-D.brux. 1.1; (c) hoch (++), *D. bruxellensis* (DSM 70001<sup>T</sup>) hybridisiert mit 26S-D.brux. 1.1, 1.2.



**Abb. 29.** Mikroskopische Aufnahmen aller *Brettanomyces/Dekkera*-Spezies nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit Art-spezifischen Cy3-markierten DNA-Sonden und Gegenfärbung mit DAPI. Es wurden Reinkulturen und Zellmischungen aus allen fünf Arten verwendet. Dargestellt sind Phasenkontrast-Aufnahmen (a, d, g, j, m), fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen mit Kombinationsfilter (b, e, h, k, n) für Cy3 (pink) und DAPI (blau) sowie mit Cy3-Sondenfilter (c, f, i, l, o) (orange). *D. anomala* (DSM 70732<sup>T</sup>) wurde mit den Sonden 26S-D.anom. 1.2, 1.3 in einer Speziesmischung (a, b) und in Reinkultur (c) hybridisiert. *D. bruxellensis* (DSM 70001<sup>T</sup>) mit der Sonde 26S-D.brux. 1.2 in Speziesmischung (d, e) und in Reinkultur (f). *B. custersianus* (CBS 4805<sup>T</sup>) mit der Sonde 26S-B.custer. 1.2 in Speziesmischung (g, h, i). *B. nanus* (CBS 1945<sup>T</sup>) mit der Sonde 2.1 in Speziesmischung (j, k) und in Reinkultur (l). *B. naardenensis* (CBS 6042<sup>T</sup>) mit den Sonden 26S-B.naard. 1.1, 1.2 in Speziesmischung (m, n) und in Reinkultur (o).



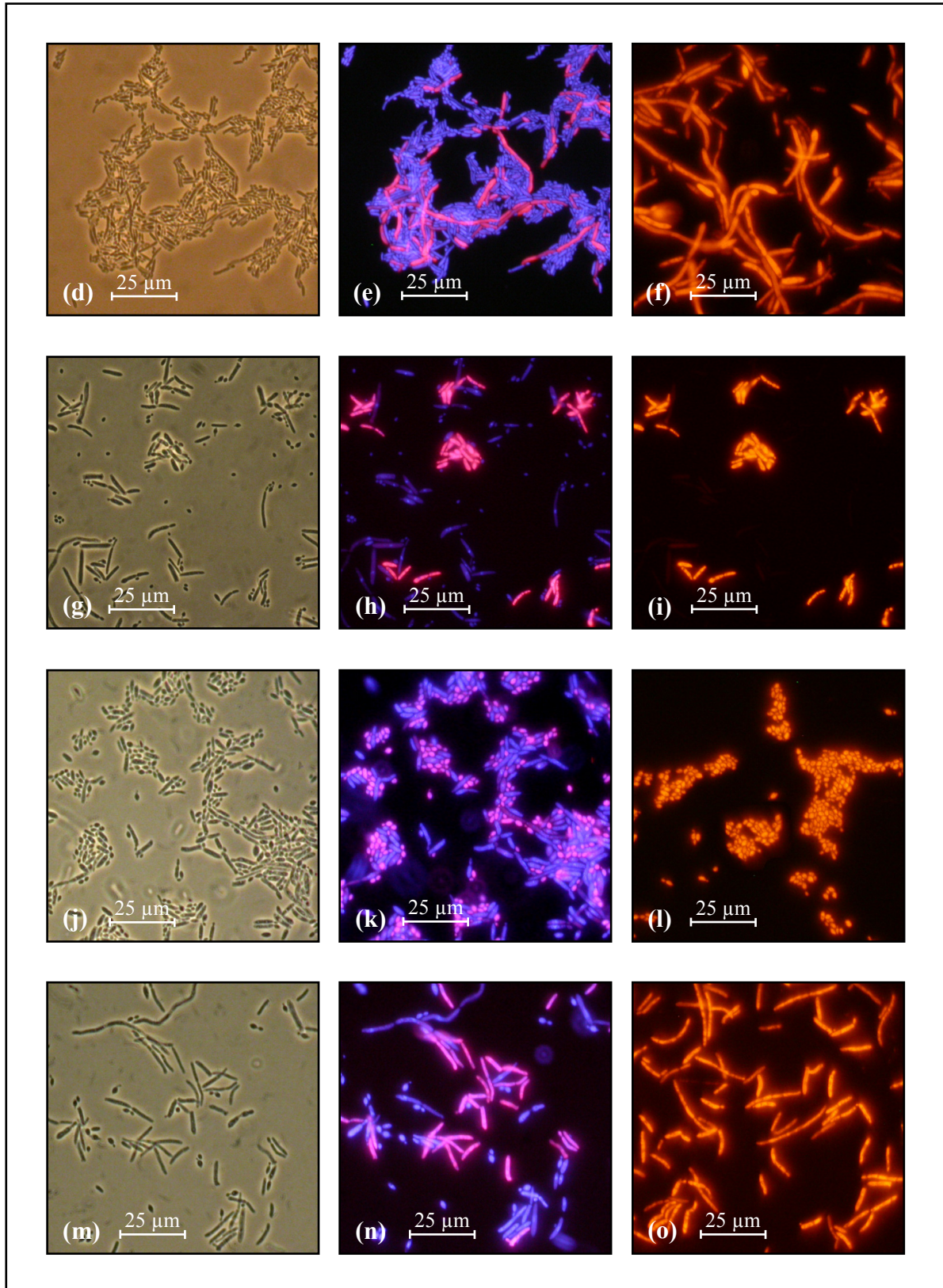


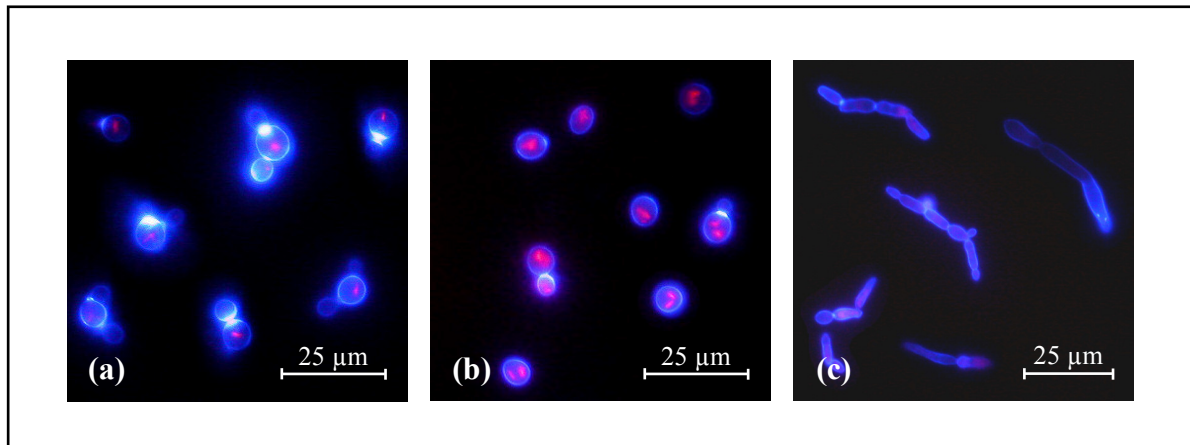
Abb. 29. Fortsetzung

### 3.5 Differenzierung von lebenden und toten Hefe-Zellen

Um das Ausmaß einer Infektion bzw. die tatsächliche Schadwirkung durch Spezies der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* in zukünftigen Untersuchungen abschätzen zu können, wurden verschiedene Färbetechniken hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf diese Hefen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass einige etablierte Methoden zur Unterscheidung von lebenden und toten Hefe-Zellen, wie die Anfärbung mit wässriger Methylenblau-Lösung (hier nicht gezeigt) oder die Verwendung des Live/Dead<sup>®</sup> Yeast Viability Kit (Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon) bei *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen zu keinem eindeutigen Ergebnis führten.

#### 3.5.1 Live/Dead<sup>®</sup> Yeast Viability Kit

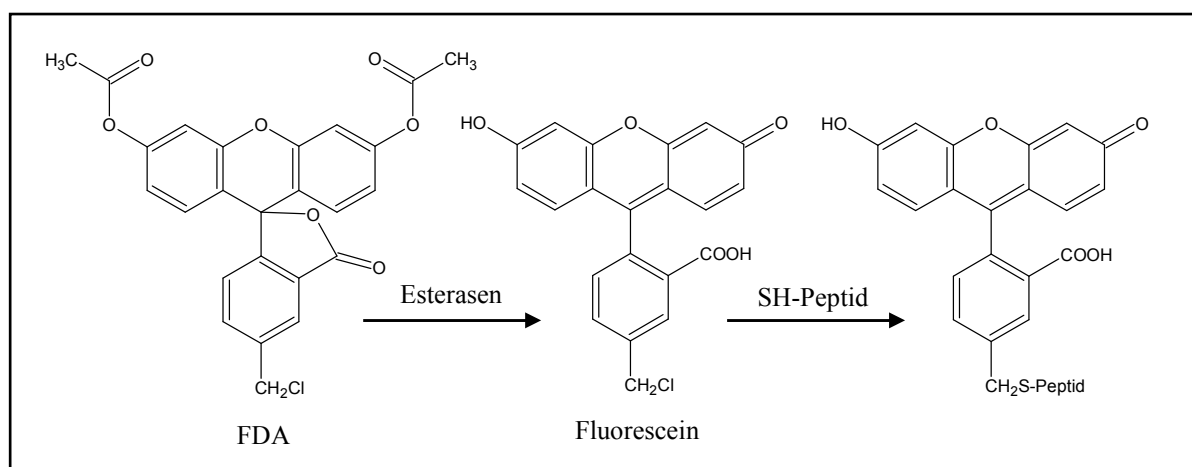
Das Live/Dead<sup>®</sup> Yeast Viability Kit ist für Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* als mikroskopisch auswertbarer Vitalitätsnachweis nicht geeignet, da die Ausbildung der charakteristischen rot-fluoreszierenden Strukturen (Abb. 30 b) in den Vakuolen von lebenden Zellen nicht oder nur in sehr geringem Maße stattfand (Abb. 30 c). In stoffwechselaktiven Zellen von *S. cerevisiae* wurden diese zylindrischen intravakuolären Strukturen (engl. „CIVS“) innerhalb einer Stunde produziert. Diese Strukturen haben einen Durchmesser von ungefähr 0.5-0.7  $\mu\text{m}$  und sind ein bis mehrere  $\mu\text{m}$  lang (Produktinformation, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon). Sie wurden häufig frei beweglich in den Vakuolen der Zellen beobachtet. Die Intensität der Färbung und das Ausmaß der CIVS in den Hefezellen konnte durch die Konzentration des Farbstoffs Fun<sup>®</sup> 1 (Lloyd & Hayes 1995) beeinflusst werden. Der im UV-Bereich anregbare Farbstoff Calcofluor White (Mazzoni et al. 1993) färbte zur Kontrastierung die Chitin-haltigen Zellwände der Hefen sehr gut an (Abb. 30 a - c).



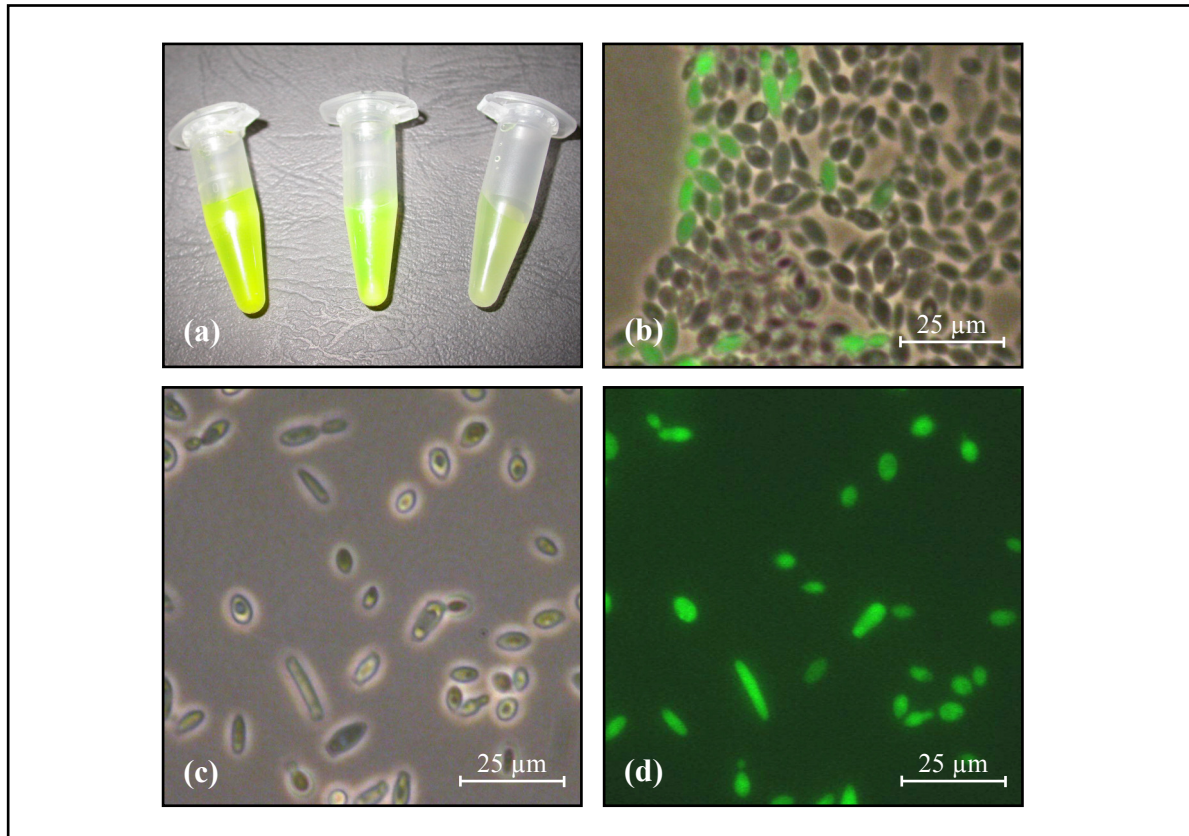
**Abb. 30.** Ergebnis der Anfärbung von *S. cerevisiae* nach 30 min Inkubation (a), nach 60 min Inkubation (b) und von *D. bruxellensis* nach 60 min Inkubation (c) mit Calcofluor White (blau, Zellwände) und Fun<sup>®</sup> 1 (rot, CIVS in stoffwechselaktiven Zellen). Ansicht im Fluoreszenzmikroskop mit Kombinationsfilter (28).

### 3.5.2 Fluoresceindiacetat

Mit Fluoresceindiacetat (FDA) konnte die Esterase-Aktivität in lebenden *Brettanomyces/Dekkera*-Zellen nachgewiesen werden. Die Cytoplasmamembran von lebenden Zellen ist für den unpolaren hydrophoben Ester permeabel. Die Substanz diffundiert in die Zellen und wird von unspezifischen, cytosolischen Esterasen in Fluorescein und Acetat hydrolysiert. Fluorescein kann aufgrund seiner Polarität aktive Zellmembranen nur langsam passieren und akkumuliert in vitalen (Esterase-aktiven) Zellen. Eine Bindung an Peptide verhindert darüber hinaus eine Diffusion durch die Membran („molecular trap“, Abb. 27). Freies Fluorescein leuchtet unter UV-Bestrahlung intensiv grün (Abb. 32).



**Abb. 31.** Umwandlung von Fluoresceindiacetat (FDA) in der Zelle.



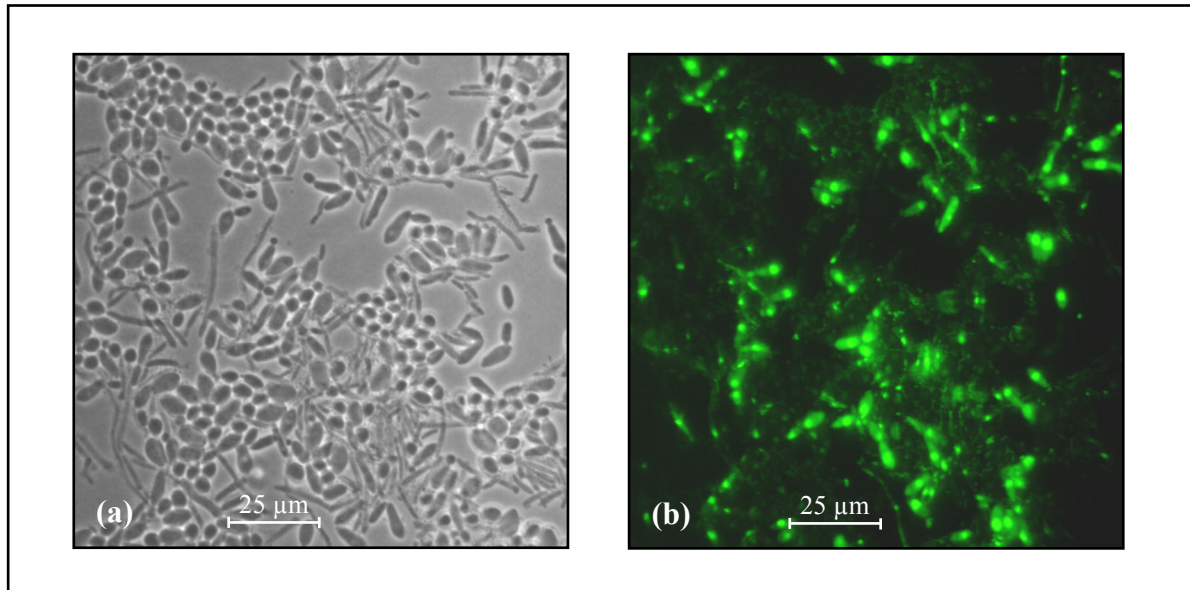
**Abb. 32.** Ergebnis der Anfärbung von *D. bruxellensis* mit FDA. Eine Zellzahl-abhängige Steigerung der Fluoreszenz-Intensität war bereits anhand verschiedener Verdünnungsstufen der Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (a) zu erkennen (links: unverdünnt, Mitte:  $10^{-1}$ , rechts  $10^{-2}$  Verdünnung, jeweils mit 10 µl FDA-Lösung versetzt, nach 1 h Inkubation bei RT). Mikroskopische Abbildungen einer Suspension, die mit Kadifit behandelt wurde (b) im Phasenkontrast mit Fluoreszenz-Darstellung (Doppelbelichtung) und einer unbehandelten Suspension im Phasenkontrast (c) und als Fluoreszenz-Aufnahme mit Filter 10 (d).

### 3.5.3 SYTOX<sup>®</sup> Green

Die Substanz Sytox<sup>®</sup> Green (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon) wurde ursprünglich zur Überprüfung der Vitalität von Bakterien entwickelt. Der Farbstoff besitzt eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren und kann die Membran von lebenden Zellen nicht passieren. Sytox<sup>®</sup> Green dient daher dem Nachweis von Zellen, die einen Verlust ihrer Membran-Integrität aufweisen und somit als nicht mehr lebensfähig angesehen werden können.

Die Anwendung des Tests auf abgestorbenen *Brettanomyces/Dekkera*-Zellen führte zu einem deutlich Fluoreszenz-Signal (Abb. 33). Dabei fluoreszierte der Farbstoff in den Zellen, ähnlich wie Fluorescein, bei Anregung mit UV-Licht im grünen Wellenlängenbereich.



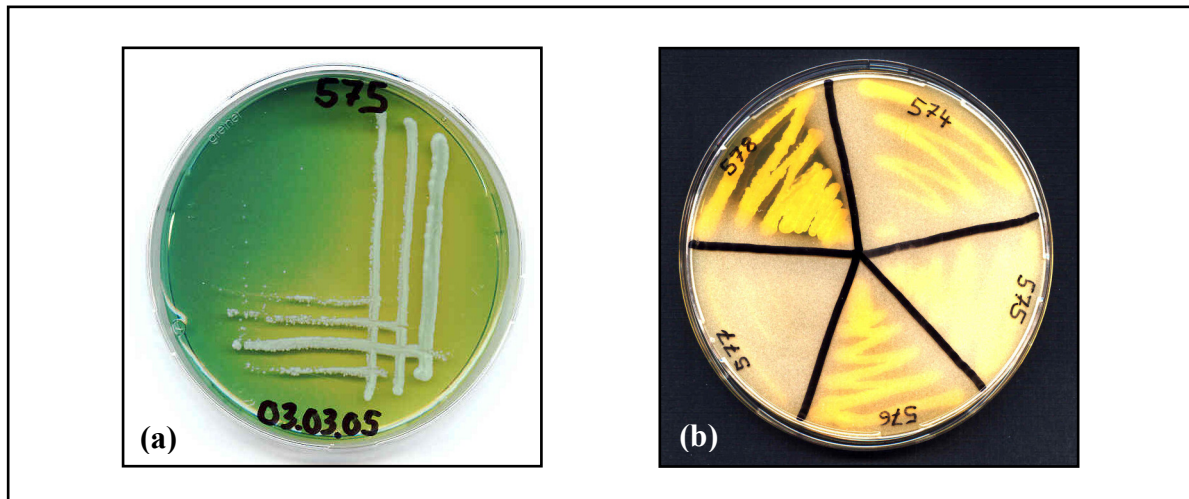


**Abb. 33.** Ergebnis der Anfärbung einer Zellsuspension aus allen fünf *Brettanomyces/Dekkera*-Arten mit SYTOX<sup>®</sup> Green. Ansicht im Phasenkontrast (a) und als Fluoreszenz-Aufnahme (b) mit Filter 10. Durch die Zugabe von Kadifit wurde der überwiegende Anteil der Hefezellen in diesem Versuch abgetötet. Das Fluoreszenz-Signal ging überwiegend von den Zellkernen aus, da SYTOX<sup>®</sup> Green hier in die DNA interkalierte.

### 3.6 Stoffwechselphysiologische Untersuchungen

#### 3.6.1 Acetat-Produktion bei *Brettanomyces/Dekkera spec.*

Die bereits bekannte und für diese Hefen charakteristische Acetat-Produktion (Dittrich & Großmann 2005) konnte bei allen fünf *Brettanomyces/Dekkera*-Arten sowie bei den untersuchten *D. bruxellensis*-Eigenisolaten durch den Farbumschlag von blau-grün (pH 5,4) nach gelb (< pH 4,0) beim Wachstum auf DBDM-Agar festgestellt werden (Abb. 34 a). Außerdem wurde in diesen Kultivierungsversuchen die Entwicklung eines eigentümlichen, phenolischen Geruchs durch die Bildung von 4-Ethylphenol aus p-Cumarsäure wahrgenommen. Die Typstämme lösten darüber hinaus die Calciumcarbonat-Schicht bei Wachstumsversuchen auf YPG-Medium unterschiedlich schnell auf (Abb. 34 b). *B. naardenensis* (CBS 6042<sup>T</sup>) löste das Calciumcarbonat am schnellsten auf, gefolgt von *B. custersianus* (CBS 4805<sup>T</sup>), *D. anomala* (DSM 70732<sup>T</sup>) und *D. bruxellensis* (DSM 70001<sup>T</sup>). Bei *B. nanus* (CBS 1945<sup>T</sup>) war die Acetat-Produktion im Vergleich zu den anderen Arten am geringsten.

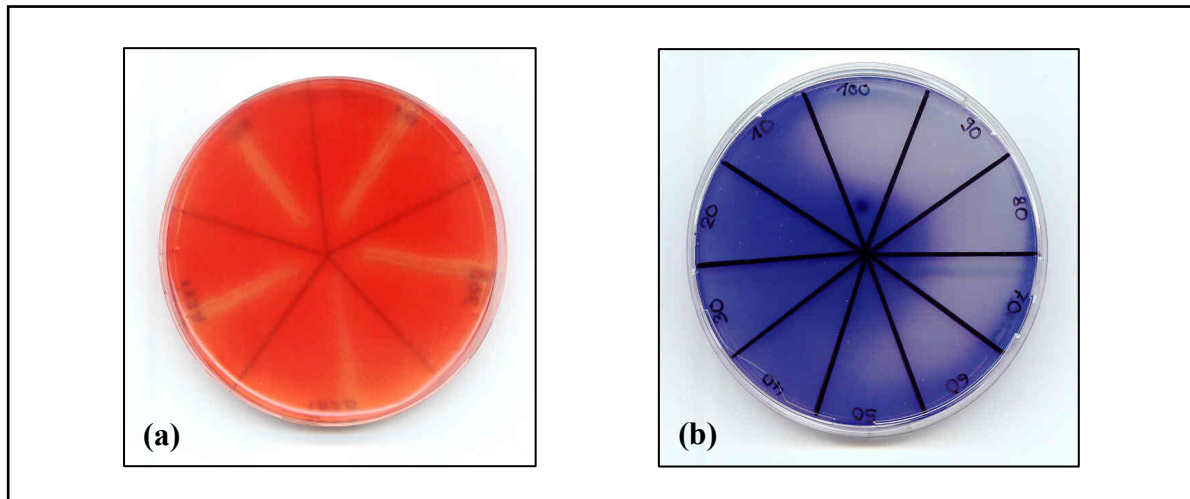


**Abb. 34.** Qualitativer Nachweis der charakteristischen Essigsäure-Produktion durch Wachstumsversuche von *Brettanomyces/Dekkera*-Spezies auf DBDM (a) und auf YPG-Medium mit Calciumcarbonat-Schicht am Plattenboden (b). Die Kulturen der Typstämme (574: *D. anomala*, 575: *D. bruxellensis*, 576: *B. custersianus*, 577: *B. nanus*, 578: *B. naardenensis*) wurden 14 Tage bei 30 °C auf dem jeweiligen Medium inkubiert. Aufnahme der Kulturplatten von oben (a) bzw. von unten (b). Durch Auflösung des Calciumcarbonats wurden die Ausstriche sichtbar.

### 3.6.2 Untersuchung der Hydrolyse von Cellulose

Spezies der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* können überwiegend aus Wein, der in Holz- bzw. Barrique-Fässern gelagert wurde, isoliert werden. Chatonnet et al. (1992) identifizierten Fässer aus Eiche als ökologische Nische für diese Hefen. Dabei kommen dem Holz-Polymer Cellulose bzw. dessen Abbauprodukte (Cellodextrine, Cellobiose) eine Rolle als potentielle Kohlenstoff-Quelle zu. Die Spaltung von Cellulose konnte in dieser Arbeit sowohl durch Wachstumsversuche von *D. bruxellensis*-Stämmen auf Nährboden mit Carboxymethylcellulose (CMC) als auch durch die Zugabe von Essigsäure in einem Kontrollversuch beobachtet werden (Abb. 34). Kongorot wurde bei der Anfärbung ausgesalzt und adsorbierte an die Cellulose-Polymere im Medium. Nach Inkubation mit der Entfärbelösung waren die Lyse-Zonen, in denen der Farbstoff nicht an die Cellulose angelagert werden konnte, als transparente Bereiche deutlich zu erkennen.

Die Aufspaltung von Cellulose in den Wachstumsversuchen (Abb. 35 a) kann anhand dieser Beobachtungen auf die Essigsäure-Produktion von *D. bruxellensis* zurückzuführen sein.



**Abb. 35.** Ergebnisse der Kongorot-Färbung. Wachstumsversuch mit fünf verschiedenen *D. bruxellensis*-Eigenisolaten, die mit der Impföse als radiale Striche auf YPG-Agar mit CMC aufgetragen und 14 Tage bei 30 °C inkubiert wurden (a). Nach dem Entfernen der Hefe-Zellen wurde das Medium 1 h mit Kongorot-Lsg. gefärbt und ÜN in Entfärbelösung inkubiert. Die Wirkung von Essigsäure auf CMC ist in (b) dargestellt. Verschiedene Konzentrationen (10 % - 100 %) wurden auf eine CMC-Platte aufgetragen und ÜN bei RT inkubiert. Nach Färbung und Entfärbung konnten die Lyse-Zonen durch Kontrastierung mit 1N HCL sichtbar gemacht werden.

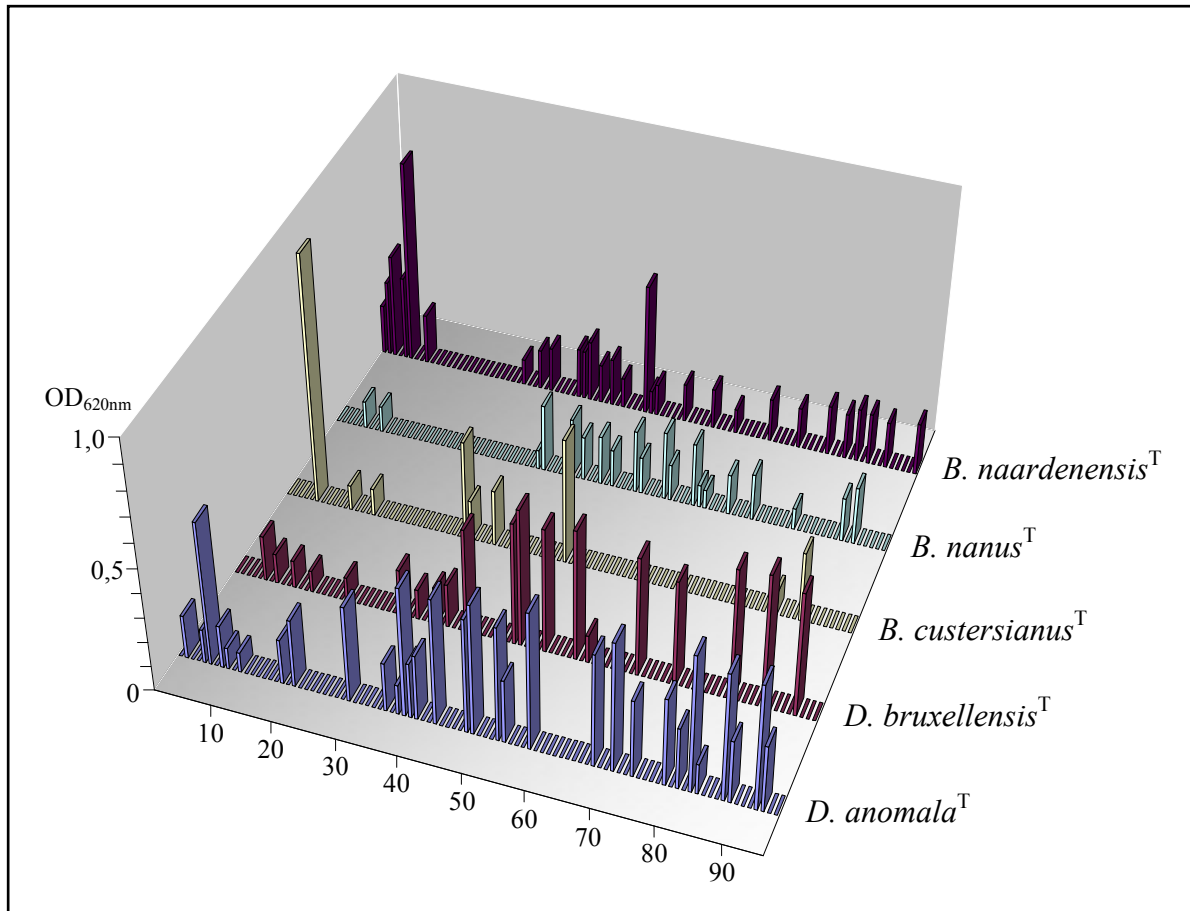
### 3.6.3 Untersuchung der Sporulation

Weder bei den Typstämmen der *Brettanomyces/Dekkera*-Arten noch bei den Eigenisolaten konnte eine Sporulation nach Inkubation auf Malzagar und SPA-Sporenmedium beobachtet werden. Auch nach mehrwöchiger Inkubation wurde keine Sporenbildung festgestellt. Die Schwierigkeit bei der Induzierung und Detektion von Sporen bei diesen Hefen ist bekannt (Kreger-van Rij 1984).

### 3.6.4 Art-Differenzierung durch Mikrotiterplatten-Tests

Neben den molekularbiologischen Methoden zur Spezies-Differenzierung konnte in der vorliegenden Arbeit der physiologischer Mikrotiterplatten-Test YT MicroPlate™ (Biolog Inc., Hayward, USA) zur Art- und Stammdifferenzierung verwendet werden. Die Fähigkeit der Hefe-Spezies zur Oxidation oder Fermentation eines bestimmten Substrats im Test durch ein Isolat ergab hierbei ein charakteristisches Stoffwechsellmuster. Diese physiologischen „Fingerabdrücke“ waren für jede *Brettanomyces/Dekkera*-Art spezifisch (Abb. 36). Die von diesen Ergebnissen abgeleiteten Verwandtschaftsverhältnisse der

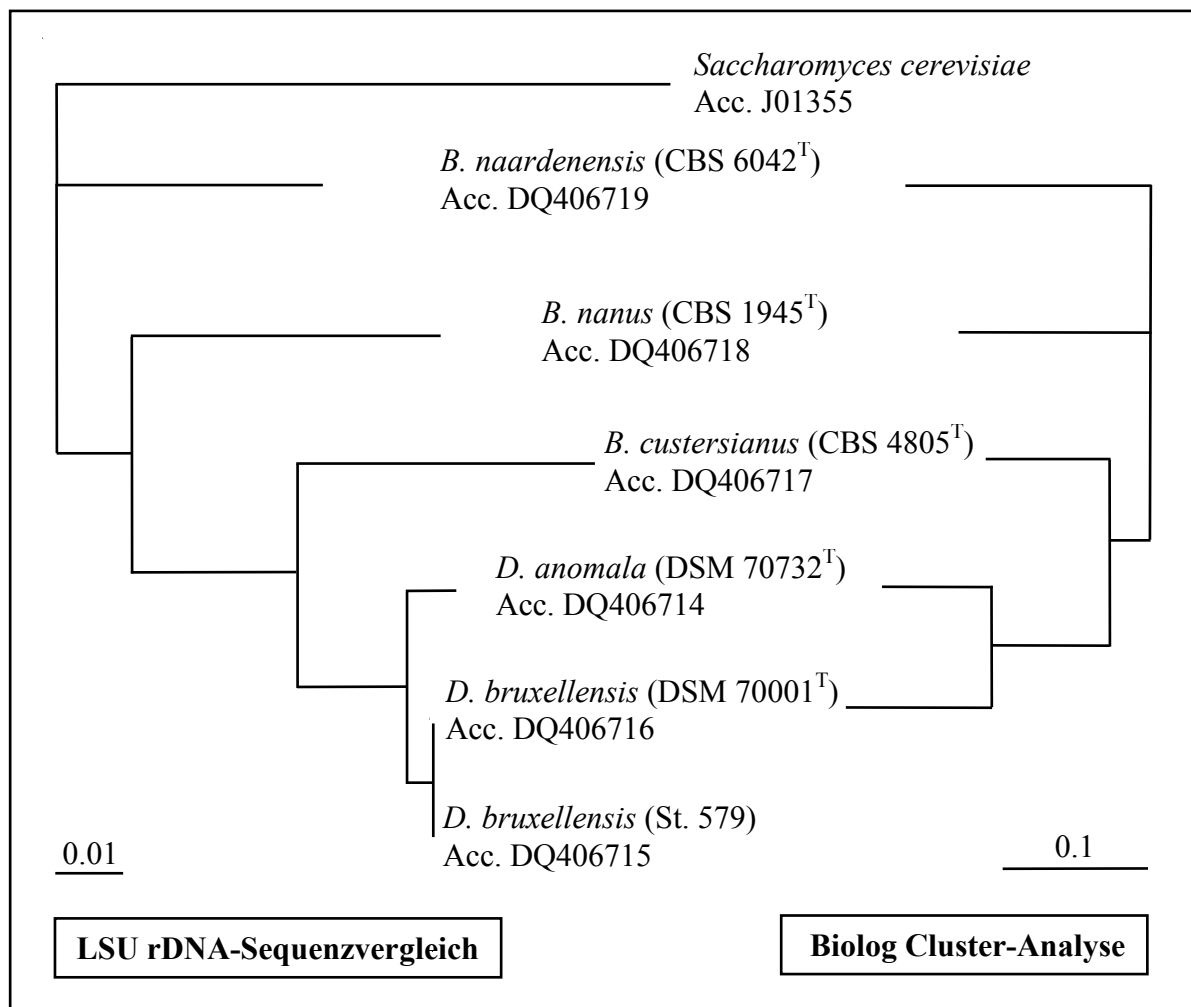
Typstämme konnten nach einer Cluster-Analyse mit ClustalX 1.83 in MS Excel graphisch dargestellt werden (Abb. 36).



**Abb. 36.** Ergebnisse des physiologischen Mikrotiterplatten-Tests (Biolog, USA). Die photometrisch bestimmten Wachstumsaktivitäten (Y-Achse, relative Einheiten) von den Typstämmen (<sup>T</sup>) der fünf *Brettanomyces/Dekkera*-Arten (Z-Achse) in Bezug auf die jeweiligen Substrate (X-Achse, 96 Ansätze, siehe Anhang 8.3) ergaben die spezifischen Stoffwechsellmuster („metabolic fingerprints“).

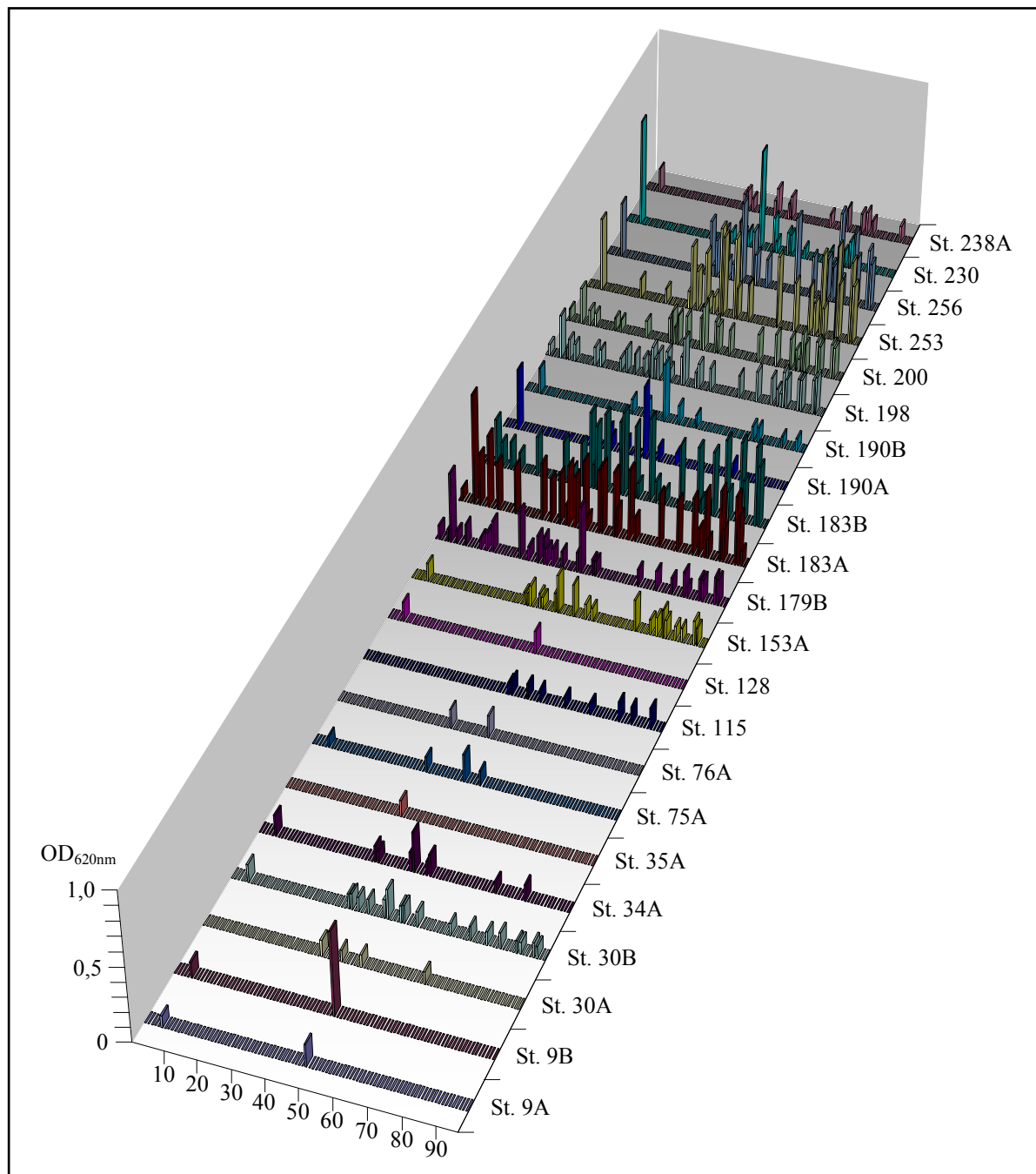


Bei der Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen (Abb. 37, 39) wurden alle photometrisch gemessenen Wachstumsaktivitäten nicht mehr quantitativ erfasst, sondern als 0/1-Matrix (0 = kein Wachstum, 1 = Wachstum) berücksichtigt. Mit dem PHYLIP Package 3.65 (Felsenstein 1989) konnte anhand dieser Daten eine Cluster-Analyse durchgeführt werden. Eine Darstellung des Baums erfolgte anschließend mit Tree View 1.6.6. Die Verwandtschaftsverhältnisse auf Basis dieser physiologischen Daten stimmten mit den phylogenetischen Ergebnissen durch den Vergleich der 26S rDNA-Sequenzen überein (Abb. 37).



**Abb. 37.** Gegenüberstellung der Verwandtschaftsverhältnisse auf Basis des LSU rDNA-Sequenzvergleichs mit dem Ergebnis der Cluster-Analyse anhand der physiologischen Daten aus dem Biolog Mikrotiterplatten-Test. Die Maßstäbe stellen die jeweiligen Unterschiede in Prozent dar (1 % phylogenetische Distanz, bzw. 10 Unterschiede hinsichtlich 100 positiv bewerteter Test-Reaktionen). *S. cerevisiae* und *D. bruxellensis* (St. 579) wurden im Mikrotiterplatten-Test nicht untersucht.

### 3.6.5 Stamm-Differenzierung durch Mikrotiterplatten-Test

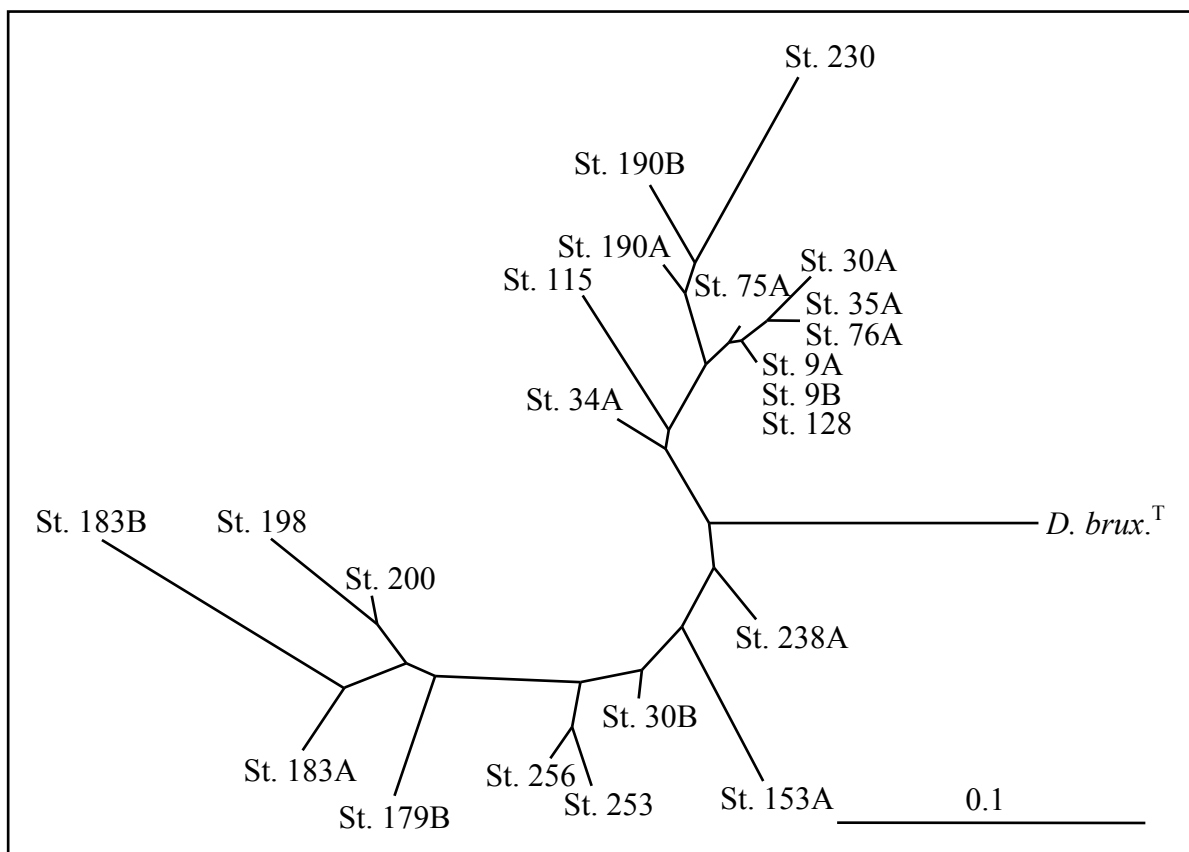


**Abb. 38.** Ergebnisse des physiologischen Mikrotiterplatten-Tests (Biolog, USA) bei Isolaten aus Wein. Die photometrisch bestimmten Wachstumsaktivitäten (Y-Achse, relative Einheiten) von 22 *D. bruxellensis*-Stämmen (Z-Achse) in Bezug auf die jeweiligen Substrate (X-Achse, 96 Ansätze, vgl. Anhang 8.3) ergaben die verschiedenen Stoffwechsellmuster („metabolic fingerprints“) der Eigenisolate.

Die Stoffwechsellmuster der Eigenisolate (Abb. 38) ermöglichten zum Teil eine Differenzierung auf Stamm-Niveau. Die isolierten Stämme zeigten ein sehr vielfältiges

Stoffwechselspektrum. Einige *D. bruxellensis*-Isolate konnten viele verschiedene Substanzen metabolisieren (z. B. St. 179B, St. 183A, St. 183B), wohingegen andere Stämme im Test (St. 9A, St. 9B, St. 128) nur Glucose verwerteten. Das schwache Wachstum der Isolate St. 9A, St. 30A, St. 35A und St. 128 erschwerte darüber hinaus eine genaue Differenzierung durch den Mikrotiterplatten-Test.

Alle untersuchten Isolate unterschieden sich hinsichtlich ihres Stoffwechsellusters deutlich von dem als Referenz mitgeführten Typstamm von *D. bruxellensis* (Abb. 39).



**Abb. 39.** Ergebnis der Cluster-Analyse von 22 *D. bruxellensis*-Isolaten und dem *D. bruxellensis*-Typstamm DSM 70001<sup>T</sup> (*D. brux.T*) auf Basis der physiologischen Ergebnisse (Mikrotiterplatten-Test, Biolog, USA). Der Maßstab entspricht einem Unterschied von 10 Merkmalen hinsichtlich 100 positiv bewerteter Test-Reaktionen.

### 3.7 Die regionale Verbreitung von *Dekkera bruxellensis*

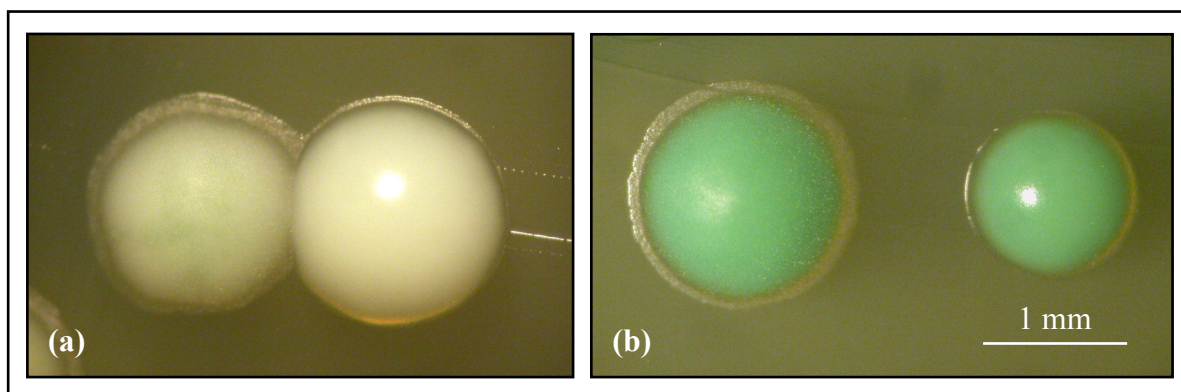
#### 3.7.1 Stamm-Isolierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich Weinproben aus der Weinbauregion Rheinhessen für eine Stamm-Isolierung von *Brettanomyces/ Dekkera*-Hefen verwendet. Die

Proben wurden in semiselektivem Hefe-Medium (YPG) mit Ampicillin und Cycloheximid vorkultiviert, um auch geringe Zellzahlen, die unterhalb der mikroskopischen Detektionsgrenze von ca. 15 Zellen pro ml liegen, mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) detektieren zu können. Ampicillin inhibierte hierbei bakterielles Wachstum und Cycloheximid die Vermehrung der meisten unerwünschten, eukaryotischen Mikroorganismen, die sensitiv auf dieses Antibiotikum reagierten. Nach anschließender Inkubation auf ebenfalls semiselektivem YPG-Agar konnte dann das Wachstum von Cycloheximid-resistenten Hefen beobachtet werden. Die mikroskopische Detektion einer apikulaten Zellmorphologie lieferte darüber hinaus ein weiteres Indiz für eine Infektion mit Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* (Dittrich & Großmann 2005). Während der Isolierungsversuche konnte in seltenen Fällen auch ein Wachstum von Hefen mit runder Zellmorphologie beobachtet werden. Ein Isolat wurde hierbei als Vertreter der Gattung *Candida* identifiziert (vgl. Abb. 16).

Parallel zu den Kultivierungsversuchen erfolgte eine direkte Untersuchung der Weinproben durch FISH, insbesondere dann, wenn die Probe schon sensorisch auffällig geworden war. Bei infizierten Proben wurden auch die Zelltiter durch FISH bestimmt. Durch Anwendung der in dieser Arbeit beschriebenen FISH-Methode mit spezifischen DNA-Sonden konnten alle 44 Isolate als Stämme der Art *Dekkera bruxellensis* identifiziert werden (vgl. Tab. 15 u. 16). Durch Ansequenzierung der Spezies-spezifischen ITS-Region bzw. der 26S rDNA und anschließendem Sequenzvergleich (Blast, GenBank) konnte dieses Ergebnis bestätigt werden.

Während der Isolierungsversuche wurden Unterschiede in der Kolonie-Morphologie einiger Hefen festgestellt (Abb. 40). Dies ließ auf das Vorhandensein unterschiedlicher Stämme in den betroffenen Weinproben schließen. Diese Vermutung konnte durch einen physiologischen Mikrotiterplatten-Test (Kapitel 3.5.2) und eine molekularbiologische Fingerprint-Methode (nSAPD-PCR, Pfannebecker 2005) bestätigt werden.



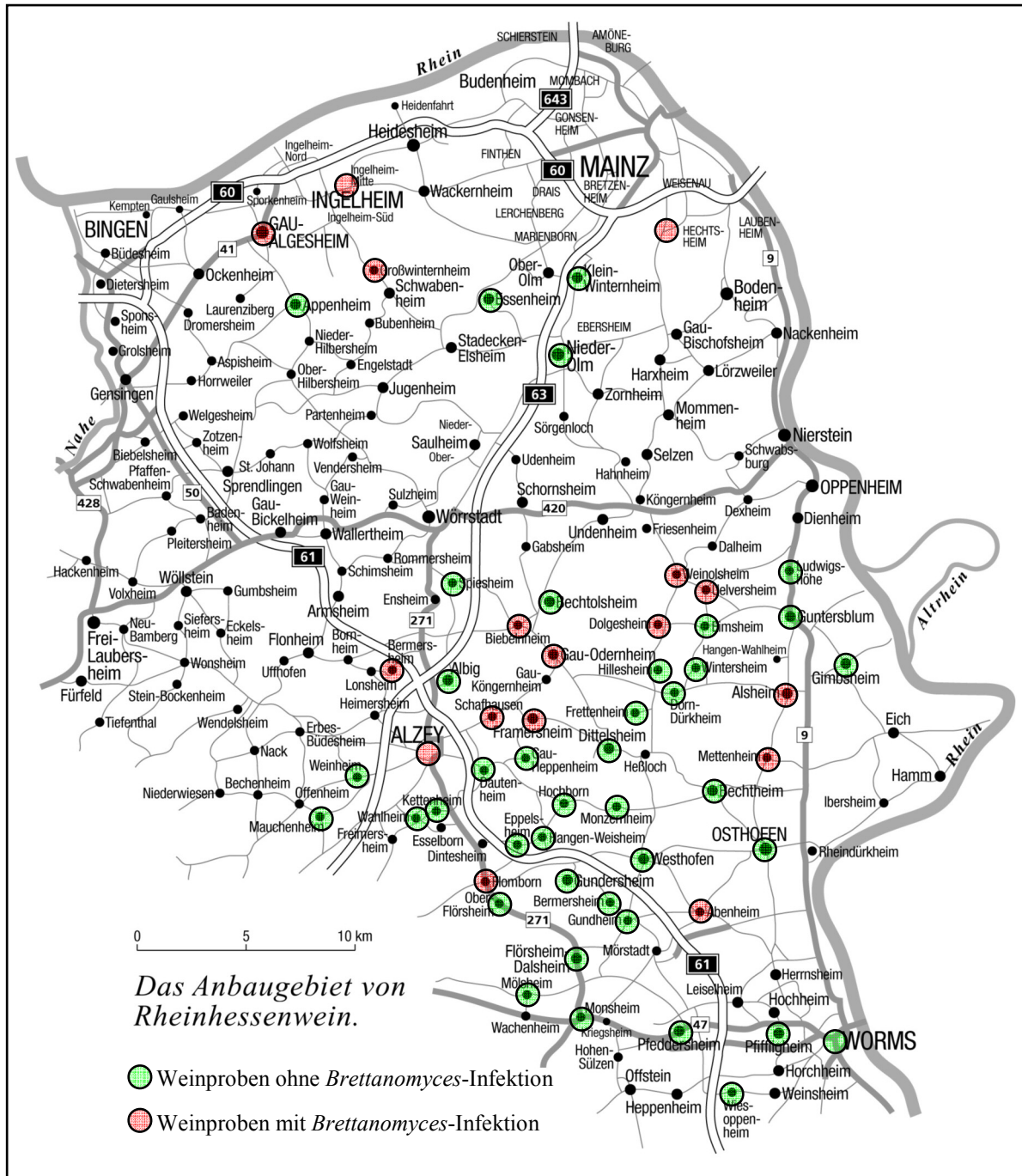
**Abb. 40.** Zwei unterschiedliche Kolonieförmungen („matt“ und „glänzend“) von *D. bruxellensis* aus einer infizierten Weinprobe nach 14-tägiger Inkubation bei 30 °C auf YPG-Agar (a) und auf DBDM (b). Der pH-Indikator Bromkresolgrün akkumulierte hierbei nach längerem Wachstum auf DBDM in den Kolonien.

### 3.7.2 Regionale Verbreitung in Rheinhessen

Die Weinprobennahme zur Untersuchung der regionalen Verbreitung von *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen in der deutschen Weinbauregion Rheinhessen erfolgte überwiegend im Bereich Wonnegau, aber auch in den Bereichen Nierstein und Bingen (Abb. 41). Sie umfasste 110 willkürlich ausgesuchte Winzerbetriebe mit Holz- und/oder Barrique-Ausbau. In 15 % dieser Betriebe konnte eine Infektion mit *D. bruxellensis* in mindestens einem Wein mit der neu entwickelten FISH-Methode nachgewiesen werden (vgl. Tab. 15). Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 299 Rotweinproben untersucht. Die Zellzahlen in den infizierten Weinproben konnten, sofern sie über der methodischen Auflösungsgrenze von ca. 15 Zellen/ml lagen, mit dem Zählraster im Okular des Fluoreszenzmikroskops bestimmt werden. Mit einer Umrechnungsformel (Anhang 8.4) ließen sich die Zelltitel, bezogen auf 1 ml Wein, berechnen (Tab. 16).

**Tab. 15.** Statistische Auswertung der Weinproben-Untersuchungen

Untersuchung	Gesamt	Rheinhessen
Weinproben	299	291
Weinproben, infiziert	31 (10 %)	25 (9 %)
Winzerbetriebe	113	110
Winzerbetriebe, infiziert	20 (18 %)	17 (15 %)
Identifizierung	<i>D. bruxellensis</i> (100 %)	<i>D. bruxellensis</i> (100 %)
Isolate / Stämme	44	37



**Abb. 41.** Ergebnis der Untersuchung der regionalen Verbreitung von Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* in den Bereichen Wonnegau, Nierstein und Bingen der Weinbauregion Rheinhessen in Rheinland-Pfalz.

**Tab. 16.** *Dekkera bruxellensis*-Isolate aus infizierten Weinproben von Rheinhessen

Probe	Rebsorte	Herkunft	Zellzahl/ml <sup>a</sup>	Isolate <sup>b</sup>
9	Spätburgunder	Schafhausen	< 15	St. 9A, St. 9B
30	St. Laurent	Alsheim	< 15	St. 30A, St. 30B
34	Cabernet Sauvignon	Mettenheim	< 15	St. 34A, St. 34B
35	Merlot	Mettenheim	< 15	St. 35A, St. 35B
75	Dornfelder	Abenheim	1,2x10 <sup>4</sup>	St. 75A, St. 75B
76	Dornfelder	Abenheim	3,6x10 <sup>4</sup>	St. 76
115	Portugieser	Flornborn	< 15	St. 115
128	Cabernet Sauvignon	Framersheim	< 15	St. 128
179	Cabernet Sauvignon	Weinolsheim	< 15	St. 179A, St. 179B
183	Frühburgunder	Uelversheim	< 15	St. 183A, St. 183B
190	Portugieser	Dolgesheim	< 15	St. 190A, St. 190B
198	Dornfelder	Alzey	3,4x10 <sup>6</sup>	St. 198
199	Dornfelder	Alzey	4,3x10 <sup>6</sup>	St. 199
200	Spätburgunder	Biebelnheim	< 15	St. 200
230	Dornfelder	Gau-Odernheim	< 15	St. 230
238	Cúvee	Gau-Odernheim	< 15	St. 238A, St. 238B
243	St. Laurent	Bermersheim	4,9x10 <sup>6</sup>	St. 243
244	Regent	Bermersheim	3,8x10 <sup>6</sup>	St. 244A, St. 244B
259	Dornfelder	Hechtsheim	7,4x10 <sup>7</sup>	St. 259A, St. 259B
260	Dornfelder	Hechtsheim	2,0x10 <sup>6</sup>	St. 260A, St. 260B
282	Spätburgunder	Ingelheim	6,7x10 <sup>3</sup>	St. 282
283	Regent	Ingelheim	6,3x10 <sup>6</sup>	St. 283
295	Dornfelder	Großwinternheim	< 15	St. 295
296	Dornfelder	Großwinternheim	< 15	St. 296
299	Merlot	Gau-Algesheim	< 15	St. 299

<sup>a</sup>Die Zellzahl-Abschätzung erfolgte durch Auszählung der Signal-gebenden Hefezellen in einer geeigneten Verdünnung bzw. Ankonzentrierung über ein Zählraster im Okular des Fluoreszenzmikroskops.

<sup>b</sup>Alle Isolate konnten über die Art-spezifischen FISH-Sonden und über Ansequenzierung der 26S rDNA als *Dekkera bruxellensis* identifiziert werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Sequenzanalysen im rRNA Gen-Cluster

Die ribosomalen DNA/RNA-Sequenzen vieler Mikroorganismen sind bekannt und bestehen aus Regionen höherer und geringerer Konservierung. Die phylogenetische Analyse der 18S rDNA, die für die kleine ribosomale Untereinheit kodiert, zeigt die enge Verwandtschaft der verschiedenen *Brettanomyces/Dekkera*-Arten (Abb. 1, Cai et al. 1996). Aufgrund der hohen Sequenzidentität ist eine Art-Differenzierung auf Basis der 18S rDNA nicht immer möglich. Insbesondere ließen sich keine spezifischen DNA-Sonden für *D. bruxellensis* und *D. anomala* generieren, deren Sequenzen sich hier nur in sehr wenigen Basen voneinander unterscheiden. Folglich ist eine Differenzierung auf Stamm-Niveau anhand dieser Sequenzen nicht möglich, wie vergleichende Analysen von partiellen 18S rDNA-Sequenzen aus *D. bruxellensis*-Isolaten zeigten (Daten hier nicht gezeigt). Eine frühere Studie (Cai et al. 1996) beschrieb bereits eine vollständige Identität der 18S rDNA-Sequenzen von drei *Brettanomyces anomalus* (heute: *Dekkera anomala*)-Stämmen.

Zwei „Internal Transcribed Spacer“-Bereiche (ITS1 und ITS2) trennen in allen Eukaryoten die konservierte 18S und 26S von der 5.8 S rDNA (Abb. 15). Sie werden zwar auch transkribiert, besitzen aber keine genau definierte Funktion und werden im Zuge der rRNA-Prozessierung aus dem Primärtranskript herausgespleißt (Knippers 2006). Daher unterliegen die ITS-Bereiche einem geringeren evolutionären Selektionsdruck (Musters et al. 1990) und sind weniger konserviert als die rRNA-Gene. Folglich können sie für die Unterscheidung von Hefe-Spezies in verschiedenen Gattungen verwendet werden. In mehreren Arbeiten wurde die RFLP oder die Sequenzanalyse der 5.8S rDNA und der flankierenden ITS1- und ITS2- Bereiche für eine effiziente, relativ einfache und gut reproduzierbare Identifizierung von Weinhefen vorgeschlagen (Egli & Henick-Kling 2001, Nisiotou & Gibson 2005). Die geringe variable Länge der ITS-Region (450-850 bp in Hefen) beschränkt natürlich den Informationsgehalt der Sequenz, so dass umfangreiche phylogenetische Analysen einer großen Anzahl verschiedener Spezies nicht möglich sind. In einigen Fällen kann dagegen die Längen-Variabilität der ITS-Regionen zu einer vorläufigen Differenzierung von Hefe-Arten verwendet werden (Nisiotou & Gibson 2005). Die mit den Primern ITS1 und ITS4 amplifizierten PCR-Produkte der ITS-Region von *Brettanomyces/Dekkera* besitzen im



Vergleich zu den meisten anderen Weinhefen eine sehr geringe Größe (Nisiotou & Gibson 2005). So unterschieden sich die Amplifikate der *D. bruxellensis*-Isolate von dem PCR-Produkt der DNA aus *S. cerevisiae* um ca. 400 bp (Abb. 17). Dieses Merkmal könnte den ersten Hinweis für das Vorkommen dieser Hefen in dem betreffenden Wein liefern. Wie die Sequenzvergleiche (Anhang 8.1.1) der vorliegenden Untersuchung gezeigt haben, ist die 5.8S rDNA in *Brettanomyces/Dekkera* konserviert und besitzt nur wenige spezifische Nukleotide in einigen Arten. In der Arbeit von Nisiotou & Gibson (2005) wurden in den untersuchten *Saccharomyces*-Arten gar keine variablen Basen in diesem Bereich gefunden. In dieser Arbeit konnten vergleichende Sequenzanalysen auf Basis der sequenzierten ITS-Regionen aus fünf *Brettanomyces/Dekkera*-Typstämmen durchgeführt werden und in einem phylogenetischen Baum dargestellt werden (Abb. 18). Im Unterschied zu den Ergebnissen der phylogenetischen Analyse von Egli & Henick-Kling (2001), die auf Restriktionsmustern der ITS-Regionen basieren, ist *D. bruxellensis* hier am nächsten mit *D. anomala* verwandt, und nicht mit *B. custersianus*. Dieses Ergebnis entspricht auch den phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen, die hier anhand der 26S rDNA-Sequenzvergleiche gefunden wurden (Abb. 21). Innerhalb der variablen ITS1- und ITS2-Bereiche unterschieden sich nur sieben Sequenzpositionen in einigen der hier untersuchten *D. bruxellensis*-Stämme (Anhang 8.1.1) voneinander. Ein nahezu identisches Resultat beschrieben Egli & Henick-Kling (2001) nach ihrer Untersuchung von zehn Isolaten dieser Hefe-Spezies.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder die 18S rRNA noch die 5,8S rRNA von *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen als Zielregionen für einen Satz aus mehreren, sensitiven und sich gegenseitig unterstützenden Sonden, die diese Hefen auf Art-Niveau sicher differenzieren, geeignet sind. Da die variablen ITS1- und ITS2-Bereiche aus dem prä-rRNA-Transkript herausgeschnitten werden und in den Ribosomen nicht mehr vorhanden sind, können sie ebenfalls nicht als effizientes Sonden-Ziel dienen, sondern allenfalls für PCR- und Restriktions-Analysen herangezogen werden (Loureiro & Querol 1999).

Im Vergleich zu den Sequenzen der 18S rRNAs und der ITS-Regionen waren die 26S rRNA-Sequenzen aufgrund ihrer Größe und ihrer hohen Variabilität als Zielregionen für die Entwicklung von Spezies-spezifischen DNA-Sonden besonders geeignet. Die Sequenzierung der vollständigen 26S rRNA-Gene von den fünf derzeit bekannten *Brettanomyces/Dekkera*-Arten *D. bruxellensis*, *D. anomala*, *B. custersianus*, *B. nanus* und *B. naardenensis* lieferte neue Sequenz-Daten für eine taxonomische Diskriminierung und phylogenetische Analysen. Alle Sequenzen wurden daher in der NCBI-Datenbank (GenBank) öffentlich hinterlegt (Tab. 12). Darüber hinaus ermöglichte die Sequenzierung

eine Generierung von spezifischen Primern und Sonden für die Entwicklung geeigneter PCR- und FISH-Methoden.

Die auf Basis dieser 26S rDNA-Sequenzen ermittelten phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse (Abb. 21) unterscheiden sich zum Teil von der D1/D2-basierenden Phylogenie früherer Studien (Kurtzman & Robnett, 1998). Anhand des phylogenetischen Baums, der die kompletten 26S rDNA-Sequenzen berücksichtigt, zeigt sich in Übereinstimmung mit dem D1/D2-Baum, dass die in der Weinherstellung verbreitete und bekannteste Art *D. bruxellensis* sehr nahe mit *D. anomala* verwandt ist. Die genetische Ähnlichkeit spiegelt sich scheinbar in den physiologischen und ökologischen Gemeinsamkeiten wieder. Beide Spezies gehören der teleomorphen ascosporenbildenden Form *Dekkera* an und wurden von der anamorphen Form *Brettanomyces* taxonomisch getrennt. Auch *D. anomala* wurde bereits aus Wein isoliert (Barnett et al. 1990, Thomas 1993, Coton et al. 2006), die drei übrigen *Brettanomyces*-Arten dagegen nicht. Im Gegensatz zu dieser phylogenetischen Übereinstimmung ist *B. custersianus*, nach den eigenen Ergebnissen, mit *D. bruxellensis* und *D. anomala* näher verwandt und *B. naardenensis* sowie *B. nanus* von allen anderen Arten phylogenetisch weiter entfernt, als dies im D1/D2-Stammbaum von Kurtzman & Robnett (1998) dargestellt wurde.

Durch vergleichende Sequenzanalysen konnten in der vorliegenden Arbeit sechs variable 26S rDNA-Regionen hinter den bekannten D1/D2-Domänen identifiziert werden. Zur Unterscheidung der Hefe-Arten wurden in früheren Studien bereits verschiedene Sequenzbereiche der LSU rRNA-Gene untersucht. Yamada et al. (1994) analysierten die Divergenz von zwei 26S rRNA-Regionen in *Brettanomyces/Dekkera*-Spezies. Ein variabler Bereich überschneidet sich hierbei mit der Region V3, die in dieser Arbeit identifiziert wurde. Die phylogenetischen Beziehungen von Vertretern der Pilz-Gattung *Coprinus* (*Basidiomyceten*) wurden anhand von sieben divergenten Domänen der LSU rRNA-Gensequenzen überprüft (Hopple & Vilgalys 1999). Von den zwei divergentesten Domänen (D2 und D8) überschneidet sich D8 [entspricht nach Hassouna et al. (1984) den relativen Sequenzpositionen 1909-2114 in *S. cerevisiae*] mit V1 (Tab. 13), der variable Bereich mit den meisten Art-spezifischen Nukleotiden in dieser Arbeit. Auf der anderen Seite korrespondiert eine der am wenigsten divergenten Domänen (D7) mit der hochvariablen Region V3 (diese Arbeit), die auch von Yamada et al. (1994) zur Differenzierung von *Brettanomyces/Dekkera*-Spezies verwendet wurde.

Der Vergleich der vollständigen 26S rDNA-Sequenzen von zwei *D. bruxellensis*-Stämmen (Anhang 8.1.2) sowie der partiellen Gensequenzen (5'-Anfang) aus 7 *D. bruxellensis*-

Isolaten (Daten hier nicht gezeigt) zeigte keine Stamm-spezifischen Sequenzpositionen im D1/D2-Bereich. Dennoch wurden in einer anderen Studie (Curtin et al. 2007), bei der Untersuchung von 18 *D. bruxellensis*-Isolaten aus Australien, in 4 Sequenzen 1 - 2 Substitutionen innerhalb der D1/D2-Region gefunden. Möglicherweise basiert diese Diversität auf fehlerhaften Sequenzierungen oder aber auf den Folgen geographischer Gegebenheiten (Herkunft der Isolate z. T. bis 4000 km voneinander entfernt).

Das rRNA Gen-Cluster beinhaltet Sequenzbereiche, die in unterschiedlichem Maße konserviert sind und daher zur Identifizierung von Organismen unterschiedlicher Taxa dienen können. In Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* bietet nur die 26S rDNA aufgrund ihrer Länge und ihrer teilweise hohen Variabilität das Potential für die sichere Differenzierung auf Spezies-Ebene durch eine FISH-Methode. Eine Stamm-Differenzierung ist anhand von rDNA-Sequenzen bei *D. bruxellensis* aufgrund der hohen Identität nicht möglich. Die variableren ITS1/2-Bereiche lassen nichtsdestotrotz die Differenzierung einiger *D. bruxellensis*-Stämme bzw. Stamm-Gruppen (Abb. 18) durch geeignete PCR-Methoden zu.

## 4.2 Das Sonden-Design auf Basis von Sekundärstrukturen

Im Vorfeld dieser Arbeit konnten bereits DNA-Sonden entwickelt werden, die an die 18S rRNA von *Brettanomyces/Dekkera* binden und somit eine Gattung-spezifische Detektion derselben ermöglichen (diese Arbeit). Auch hierbei diente eine adaptierte 18S rRNA-Sekundärstruktur von *S. cerevisiae* (U53879) als Orientierungs-hilfe für die Wahl geeigneter Sonden-Zielregionen.

Bei der Generierung neuer 26S rRNA-Sekundärstrukturen hat es sich als sehr vorteilhaft herausgestellt, dass auf die Referenzstruktur einer relativ nahe verwandten Art (*S. cerevisiae*) zurückgegriffen werden konnte. Aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl variabler Sequenzpositionen blieb die Grundstruktur größtenteils erhalten. Vor dem Hintergrund, dass die Anpassung der rRNA-Sekundärstruktur an die neue Sequenz dennoch einen sehr komplexen und aufwendigen Prozess darstellte, der viele manuell ausgeführte Arbeitsschritten benötigte (Kapitel 2.12, Hirschhäuser 2002), entstand auch die Überlegung, zur Entwicklung einer geeigneten Software (siehe Ausblick). Durch Kombination der Ergebnisse aus vergleichenden Sequenzanalysen mit der auf die jeweilige Hefe-Spezies

adaptierten Sekundärstruktur ließen sich die variablen Sequenzbereiche der 26S rRNA zweidimensional darstellen. Die Positionen der variablen Bereiche (V1-V6) in den neu generierten rRNA-Sekundärstrukturen stimmen weitgehend mit den Ergebnissen zur Kartierung der Variabilität von verschiedenen eukaryotischen LSU rRNA-Gensequenzen (Ben Ali et al. 1999) überein. Die Sequenzbereiche V1-V6 beinhalten Regionen mit den höchsten Substitutionsraten, die aus vergleichenden Sequenzanalysen von 77 phylogenetisch diversen eukaryotischen Organismen resultierten. Anhand dieser Daten wurde von Ben Ali et al. (1999) eine Variabilitäts-Karte für LSU rRNA-Gene auf Basis einer Sekundärstruktur von *S. cerevisiae* generiert (Ben Ali et al. 1999, [http://psb.ugent.be/rRNA/varmaps/Scer\\_1-su.html](http://psb.ugent.be/rRNA/varmaps/Scer_1-su.html)). Die Bereiche V1 [E20-E20\_2; Helix-Nummerierung nach De Rijk et al. (1999)] und V6 (H1\_1-H1\_3) gehören zu den hochvariablen Regionen, die in *S. cerevisiae*, aber nicht in den meisten ( $\geq 75\%$ ) anderen Organismen vorhanden sind, die in der Studie untersucht wurden. V2 (G5\_1 und G5\_2) und V5 (D3-D5\_1) entsprechen in ihrer Position ebenso Teilabschnitten von insgesamt 10 hochvariablen Regionen, die von Ben Ali et al. (1999) identifiziert wurden. Obwohl die Bereiche V3 (E8-E11\_1) und V4 (E15) eine große Anzahl variabler Nukleotide in der Karte aufweisen, wurden sie von den Autoren dennoch nicht als distinkte variable Regionen angesehen. Folglich gibt es auf der LSU rRNA weitere potentielle Ziel-Regionen für die Entwicklung von spezifischen DNA-Sonden (Abb. 22 a - e). Darüber hinaus sollte berücksichtigt werden, dass es bei der praktischen Anwendung von Sonden, insbesondere im hochvariablen D1/D2-Bereich (Stender et al. 2001), patentrechtlich festgelegte Beschränkungen gibt (Hyldig-Nielsen et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch eine neue Sonden-Methode die Hybridisierung der Sonden mit den Ziel-Regionen erleichtert und folglich die Signalstärke erhöht werden. Dies wurde durch den Einsatz von teilweise komplementären oder direkt benachbarten fluoreszenzmarkierten Gemeinschafts-Sonden („side“ probes, Röder et al. 2007a) ermöglicht, die die Zugänglichkeit der hoch strukturierten rRNA verbessern. Die Sonden unterstützen sich hierbei gegenseitig in ihrer Bindung an die Zielregionen. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen aus früheren Studien (Fuchs et al. 2000) überein, in denen unmarkierte Oligonukleotide als Helfer-Sonden zu einer signifikanten Verbesserung der FISH von 16S rRNA in *E. coli* geführt haben. Fuchs et al. (2000) schlussfolgerten, dass Helfer und Sonden unabhängig von einander reagieren und daher die Spezifität der Hybridisierungs-Reaktion nicht negativ beeinflussen. Diese Feststellung konnte auch mit den Gemeinschafts-Sonden bestätigt werden. Bis auf eine Ausnahme (Sondenmischung

26S-B.naard. 1.1, 1.4, 1.5) wurde keine Signal-Abschwächung und kein Spezifitäts-Verlust bei der Verwendung von mehreren DNA-Sonden in den FISH-Experimenten festgestellt.

Durch die Berücksichtigung der Sekundärstrukturen der Zielregionen und des Gemeinschafts-Sonden-Konzepts bleibt das Sonden-Design kein rein empirischer Prozess, wie von Stahl & Amann (1991) beschrieben, sondern lässt eine gewisse Voraussage der Effizienz und Sensitivität zu.

### 4.3 Die FISH-Analyse

Im Verlauf der Überprüfung der neu generierten Sonden wurden verschiedene Hybridisierungs- und Waschttemperaturen getestet. Dabei lagen die Hybridisierungstemperaturen bis zu 10 °C unterhalb der mittleren Schmelztemperaturen der Oligonukleotide und die Waschttemperaturen 1 bis 5 °C über den jeweiligen Hybridisierungstemperaturen. Die physikalisch-chemischen Parameter, die die Ergebnisse von Hybridisierungs-Experimenten wesentlich beeinflussen können, werden unter dem Begriff „Stringenz“ zusammengefasst. Die Stringenz, mit der die FISH durchgeführt wird, bestimmt den ungefähren Prozentsatz korrekt gepaarter Nukleotide im Doppelstrang aus Sonde und Zielsequenz (Leitch et al. 1994). Mit folgender Formel lässt sich die Stringenz abschätzen:

$$\text{Stringenz (\%)} = 100 - M_f (T_m - T_a)$$

$M_f$  = Fehlpaarungsfaktor (1 für Sonden über 150 bp, 5 für Sonden unter 20 bp Länge),  
 $T_m$  = mittlere Schmelztemperatur (°C),  $T_a$  = Temperatur (°C), bei der die Hybridisierung bzw. die Waschschritte durchgeführt werden.

In den vorliegenden Hybridisierungsversuchen unterschied sich  $T_m$  von  $T_a$  zwischen 0 °C und 6.4 °C (Tab. 14), das entspricht einer Stringenz von 100 % bis 68 %. Im Durchschnitt betrug die Differenz zwischen  $T_m$  und  $T_a$  2.7 °C, was einer Stringenz von 87 % entspricht. Die Stringenz hängt von der Temperatur, der Ionenstärke und der Konzentration helixdestabilisierender Moleküle (z. B. Formamid, hier nicht verwendet) in den Hybridisierungs- und Waschlösungen ab (Leitch et al. 1994). Unter stringenten

Bedingungen bleiben nur Sonden mit nahezu perfekt komplementären Sequenzen gepaart. Mit abnehmender Stringenz erhöht sich in den Hybriden die Zahl der Basenfehlpaarungen. Mit der Abschätzung des Anteils falsch gepaarter Basen ergibt sich ein Anhaltspunkt für die Spezifität des Signals. Da die 26S rRNA jedoch in den Ribosomen mit Proteinen assoziiert ist, lässt sich die Stringenz nicht exakt berechnen.

In der Literatur wurde bereits sehr detailliert auf mögliche Probleme bei in situ Hybridisierungen mit rRNA-Zielregionen hingewiesen (Amann et al., 1995). Grundlegend von Bedeutung ist die Quantität und die Zugänglichkeit der Sonden-Zielregionen. Da der zelluläre Ribosomen-Gehalt direkt mit den Wachstumsraten der Organismen korreliert, könnte es bei langsam wachsenden Zellen, zu denen *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen insbesondere zählen, Schwierigkeiten bei der Detektion aufgrund eines niedrigen rRNA-Gehalts geben. Die Erreichbarkeit der Zielregionen in den Ribosomen kann darüber hinaus durch zwei verschiedene Faktoren beeinträchtigt werden. Zum einen muss die Permeabilität der Zellwand und Zellmembran für die fluoreszenzmarkierten Sonden gewährleistet sein. Auf der anderen Seite können rRNA-rRNA und/oder rRNA-Protein Interaktionen in den Ribosomen die Hybridisierung der Sonden negativ beeinflussen. Durch die Vorversuche mit bereits vorhandenen DNA-Sonden, die an die 18S rRNA von *Brettanomyces/Dekkera* binden, konnten in dieser Arbeit mögliche Probleme bezüglich eines eventuell zu niedrigen Ribosomen-Gehalts oder einer limitierten Sonden-Diffusion ausgeschlossen werden.

Der Einsatz von Gemeinschafts-Sonden in den Hybridisierungsversuchen resultierte in den meisten Fällen in einer Steigerung der Fluoreszenz-Ausbeute. Dies bewirkte ein besseres Kontrastverhältnis zu der teilweise störenden Eigenfluoreszenz von Weinbestandteilen und anderen speicherstoffhaltigen Hefen, insbesondere von *S. cerevisiae*, in den Untersuchungsproben. Dennoch ergaben einige Ansätze keine oder nur mangelhafte Ergebnisse, insbesondere in der Hefe *B. nanus* (vgl. Tab. 14). Es ist bisher nicht bekannt, ob die 26S rRNA in dieser Art spezielle rRNA-rRNA und/oder rRNA-Protein Wechselwirkungen aufweist, die sich von denen der anderen *Brettanomyces/Dekkera*-Spezies unterscheiden. Möglicherweise traten in diesem Fall auch andere Positions-Effekte als die erschwerte Zugänglichkeit der Ziel-Region auf. In einer früheren Untersuchung (Behrens et al. 2003a, b) variierten die gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten von einigen sich um wenige Nukleotide überlappende DNA-Sonden zwischen Klasse I (stärkstes Signal) und Klasse VI (schwächstes Signal). Behrens et al. (2003a, b) argumentierten, dass in diesen Regionen die Sonden-vermittelte Fluoreszenz auch durch Sequenz-spezifische Auslöschung des Fluoreszenz-Signals durch Elektronen-Energie-Transfer negativ beeinflusst werden

könnte. Gleichwohl konnten in der vorliegenden Arbeit schließlich zwei sensitive Oligonukleotid-Sonden (26S-B.nanus 2.1, 26S-B.nanus 5.3) generiert werden, die für *B. nanus* spezifisch sind und ein deutliches Fluoreszenz-Signal in den Hybridisierungsversuchen ergaben.

Im Unterschied zu vielen anderen Methoden zur Detektion von Schädlingshefen in Lebensmitteln, wie die Kultivierung auf selektiven Medien oder molekularbiologische Techniken (Loureiro & Malfeito-Ferreira 2003), verbindet die FISH die Vorzüge einer direkten Methode zur Detektion, Identifizierung und Zellzahl-Bestimmung ohne die Notwendigkeit einer vorausgehenden Kultivierung. Eine prozessbegleitende Qualitätssicherung ist durch die Anwendung zeitintensiver Testverfahren unmöglich. Die klassischen Methoden für eine Identifizierung und Quantifizierung einer *Brettanomyces*-Kontamination durch Kultivierungsversuche auf semiselektivem Anreicherungsmedium mit anschließender Charakterisierung durch biochemische und physiologische Analysen sowie mikroskopischer Untersuchung dauern 1 bis 2 Wochen (Fugelsang 1997). Demgegenüber kann die Hybridisierung bereits nach 3-4 Stunden über Mikroskopie ausgewertet werden. Eine verlängerte Inkubation der Sonden (z. B. über Nacht) liefert jedoch eine höhere Fluoreszenz-Ausbeute und damit intensivere Signale. Weitere Vorteile der FISH im Vergleich zu anderen Methoden sind, neben dem geringen Zeitaufwand, die relativ einfache Durchführung und Interpretation der Ergebnisse. Die Fluoreszenz-Signale in den Zellen sind in der Regel leichter zu interpretieren als z. B. unsichere Ergebnisse von Stoffwechsel-Tests oder komplexe Profile von Gel-Banden.

Neben der FISH gibt es heute ein Vielzahl weiterer, spezieller Sonden-Methoden wie z. B. die CARD (Catalyzed Reporter Deposition)-FISH (Pernthaler et al. 2002), Smart Probes (Yamane 2000), Kissing Probes (Brown et al. 2001) oder Molecular Beacons (Lenaerts et al. 2007). Eine frühere Forschungsarbeit (Stender et al. 2001) beschäftigte sich ebenfalls mit der Detektion von *Brettanomyces/Dekkera*. Stender et al. verwendeten aber Peptid-ähnliche Nukleinsäure-Sonden (PNA probes) zur Identifizierung von *D. bruxellensis*. Trotz ihrer hervorragenden Hybridisierungseigenschaften, wie ihre hohe Sensitivität und Spezifität, bleiben PNA-Sonden aufgrund ihrer hohen Herstellungskosten (ca. 10-20-mal höher als Oligonukleotid-Sonden) für Routine-Analysen in der Wein-Industrie ungeeignet. Außerdem erfassen die in der vorliegenden Arbeit generierten Sonden spezifisch alle fünf bisher bekannten *Brettanomyces/Dekkera*-Arten. Folglich kann diese Methode nicht nur zur Identifizierung von *D. bruxellensis* in Wein sondern auch zur Detektion von anderen Lebensmittel-schädigenden Spezies (Thomas 1993) angewendet werden.

Darüber hinaus kann man die hier entwickelte FISH-Methode mit einer zusätzlichen Anfärbung kombinieren, die eine Differenzierung von lebenden und toten Zellen ermöglicht. Dies ist ein sehr nützliches Werkzeug, insbesondere für die Kontrolle von Hefe-Populationen und die Beurteilung der tatsächlichen Auswirkung einer Infektion im Wein.

Trotz ihrer vielfältigen Möglichkeiten sind FISH-Techniken mit DNA- oder PNA-Sonden in der Wein- und Getränke-Analytik bisher nicht geläufig (Loureiro & Malfeito-Ferreira 2003). Dies hängt wahrscheinlich unter anderem damit zusammen, dass für die Geräteausstattung ein relativ kostspieliges Fluoreszenzmikroskop notwendig ist. Zudem stehen althergebrachte Methoden, wie Plattierungsversuche (z. B. MicroQit<sup>®</sup> Detect, Schliessmann, Schwäbisch Hall) und die chemische Analyse der Sekundärmetabolite weiterhin im Vordergrund und haben einen scheinbar unverrückbaren Platz in der gängigen Routine-Diagnostik eingenommen.

#### 4.4 Kritische Evaluierung von Vitalitätsfarbstoffen

Eine Zellzahlbestimmung gibt bei ökologischen Untersuchungen keine Auskunft darüber, ob die detektierten Mikroorganismen in der Untersuchungsprobe physiologisch aktiv sind. Oft befindet sich ein beträchtlicher Anteil der Zellen in einem Ruhezustand und ist physiologisch inaktiv. Aus diesem Grunde sind verschiedene Färbemethoden entwickelt worden, die es ermöglichen sollen, lebende, stoffwechselaktive Mikroorganismen mikroskopisch direkt zu erfassen und sie von toten bzw. inaktiven Zellen zu differenzieren (= „Vitalfärbungen“) (Bast 2001). Die Vitalitätsfärbung erlebt heute in Verbindung mit neuen mikroskopischen Verfahren eine „Renaissance“, nachdem zuvor die Möglichkeiten dieser Technik als ausgeschöpft galten. Da fluoreszierende Zellen wesentlich besser zu erkennen und zu zählen sind als nichtfluoreszierende, verwendet man für Vitalfärbungen bevorzugt Fluoreszenzfarbstoffe („Vitalfluorchromierung“).

Hinsichtlich des eigentlichen Nachweises gibt es unterschiedliche Prinzipien, z. B. die Verwendung von Redoxindikatoren, wie z. B. Methylenblau (Bast 2001), die über eine Farbänderung entsprechende Reaktionen in der stoffwechselaktiven Zelle ohne UV-Licht sichtbar machen. Viele Hefen (z. B. *S. cerevisiae*, jedoch nicht *Dekkera/Brettanomyces spec.*) und Bakterien lassen sich sehr einfach durch den basischen Anilinfarbstoff Methylenblau anfärben (Daten hier nicht gezeigt). Der wasserlösliche, blaue Farbstoff ist



ein guter Wasserstoff-Akzeptor und wird nur in lebenden (stoffwechselaktiven) Zellen in die reduzierte, farblose Leukoform überführt. Ein sehr häufig verwendetes Indiz für eine lebende Zelle ist das Vorhandensein einer intakten Plasmamembran. Ein Verlust der Membranintegrität ermöglicht im Gegenzug eine Diffusion von Farbstoffen, z. B. Sytox<sup>®</sup> Green (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon) in die geschädigte Zelle. Hier binden sie schließlich an verschiedene Zellbestandteile z. B. Proteine oder Nukleinsäuren (Sytox<sup>®</sup> Green) (Lebaron et al. 1998). Für eine Gegenfärbung der übrigen lebenden Zellen kann der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Tanius et al. 1992) oder Calcofluor White (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon), ein Farbstoff, der chitinhaltige Zellwände anfärbt (Mazzoni et al. 1993), als geeignete Kontrastierung eingesetzt werden. Der Nachweis von Enzym-Aktivitäten, z. B. von unspezifischen Esterasen bei Anfärbung mit Fluoresceindiacetat (FDA) (Rotman & Papermaster 1966), oder anderen, zum Teil unbekannt biochemischen Prozessen, wie bei Fun<sup>®</sup> 1 (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon) (Lloyd & Hayes 1995), dient ebenfalls der Identifizierung von stoffwechselaktiven Zellen in der Untersuchungsprobe.

Als Kontrolle der physiologischen Aktivität der untersuchten Hefen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe evaluiert. Die Farbstoffe Fun<sup>®</sup> 1, Calcofluor White, Fluoresceindiacetat (FDA) und Sytox<sup>®</sup> Green wurden hierbei zur Differenzierung von lebenden und toten Hefezellen in Kulturen und Weinproben eingesetzt. Das Live/Dead<sup>®</sup> Yeast Viability Kit (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon) wurde laut Herstellerangaben bereits an verschiedenen Hefe- und Pilz-Spezies unter verschiedenen Laborbedingungen getestet. Der Farbstoff Fun<sup>®</sup> 1 fluoresziert nicht in wässriger Lösung. Er bindet in Zellen an Nukleinsäuren und Proteinen und führt zu einer grün-gelben Fluoreszenz in Hefen mit geringer oder keiner Stoffwechselaktivität (Henry-Stanley et al. 2004). In physiologisch aktiven Zellen entstehen hingegen sogenannte CIVS (zylindrische intravakuoläre Strukturen) in weniger als einer Stunde. Durch biochemische Reaktionen, von denen bisher nur bekannt ist, dass sie sehr Temperatur- und ATP-abhängig sind (Millard et al. 1997) wird Fun<sup>®</sup> 1 modifiziert und fluoresziert im roten Wellenlängenbereich. Der Transport des Fluorogens von dem Cytosol der Zelle in die Vakuole erfolgt nicht in toten Zellen (Millard et al. 1997), daher können hier keine CIVS beobachtet werden. Grundlegend benötigt eine Bildung der CIVS sowohl Membranintegrität als auch Stoffwechselaktivität von lebenden Hefen (Henry-Stanley et al. 2004). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist das Standardprotokoll mit Fun<sup>®</sup> 1 jedoch nicht für Hefen der

Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* geeignet. Die Produktion der für diese Färbemethode charakteristischen CIVS erfolgte, im Gegensatz zu Versuchen mit *S. cerevisiae*, in den untersuchten Zellen dieser Hefe-Gattungen nicht oder nur in sehr geringem Maße (Abb. 30). Eine eindeutige Differenzierung der Zellen war nicht möglich. Nichtsdestotrotz ließen sich die Zellwände von *Brettanomyces/Dekkera* mit Calcofluor White sehr gut anfärben.

Die Zellfärbungen mit den Fluoreszenzfarbstoffen FDA und Sytox<sup>®</sup> Green lieferten in dieser Arbeit vergleichbar gute Ergebnisse in den untersuchten Hefen. Der Vorteil von FDA gegenüber Sytox<sup>®</sup> Green besteht darin, dass die Zellen nach der Anfärbung gleichmäßig stark fluoreszieren (Abb. 32 d), da das freie Fluorescein im Cytoplasma akkumuliert. Da Sytox<sup>®</sup> Green in toten Zellen mit hoher Affinität an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet, konzentriert sich das Signal bei Eukaryoten auf den Zellkern (Abb 33 b) und wird zur Zellperipherie hin deutlich schwächer. Demgegenüber blieb das Fluoreszenz-Signal von Sytox<sup>®</sup> Green längere Zeit (z. T. mehrere Tage) stabil und mikroskopisch auswertbar, während das freie Fluorescein in den Ansätzen mit FDA bereits nach kurzer Zeit ( $\leq 1$  Stunde) wieder aus den Zellen diffundierte. Zudem zeigte FDA nach einer gewissen Lagerzeit durch natürliche Hydrolyse in Lösung eine hohe „Eigenfluoreszenz“. Beide Prozesse führten zu einem unvorteilhaften Hintergrund in den Präparaten, der die mikroskopische Auswertung gelegentlich sehr erschwerte. Die Effektivität des bekannten und häufig verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs Sytox<sup>®</sup> Green wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Veldhuis et al. (1997) untersuchten die Eigenschaften des Farbstoffs zur Anfärbung von marinem Phytoplankton in Verbindung mit einer Quantifizierung der zellulären DNA über Durchflusscytometrie. Sie beschrieben in ihrer Studie vor allem die positiven Eigenschaften des Farbstoffs Sytox<sup>®</sup> Green, der in ihren Versuchen bereit nach 15 min Inkubationszeit die maximale Fluoreszenz-Ausbeute zeigte. Das grüne Fluoreszenz-Signal überlappte nicht mit der roten Autofluoreszenz des Planktons und ermöglichte in ihren Experimenten eine Differenzierung von lebenden und toten Zellen. Demgegenüber beobachteten Lebaron et al. (1998) in einer Studie über die Effektivität von Sytox<sup>®</sup> Green zur Abschätzung der Vitalität in *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*, dass die Färbung mit Sytox<sup>®</sup> Green im Vergleich mit Plattierungsversuchen den Anteil der toten Zellen unter Umständen zu niedrig bestimmt. Sie begründeten diese Ergebnisse mit dem Auftreten von strukturellen Änderungen der doppelsträngigen DNA („coiling“) in Zellen mit permeabilisierter Membran, das ein Interkalieren des Farbstoffs verhindern könnte.

Alle untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe sind als zusätzliche Färbung für die FISH-Methode nur bedingt geeignet. Die Vorbehandlung der Zellen für die Hybridisierung, insbesondere die Hitze-fixierung und die Entwässerung schließen eine direkte Anfärbung desselben Ansatzes aus. Fixiert man die Zellen erst nach der Vitalitätsfärbung auf dem Objektträger, wird zum einen die ursprüngliche Anordnung der Zellen im Präparat verändert und zum anderen ist das Wiederfinden des Objektausschnitts für die FISH problematisch. Für eine mikroskopische Auswertung können jedoch Vitalitätsfärbungen mit Reinkulturen parallel zur FISH-Methode in separaten Ansätzen durchgeführt werden.

## 4.5 Erste physiologische Charakterisierungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben dem hauptsächlich molekularbiologisch ausgerichteten Schwerpunkt auch einige physiologische Eigenschaften von *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen untersucht. In der Wein-relevanten Hefe-Forschung werden die Essigsäure-Produktion, die  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität und die Differenzierung der ascosporogenen Gattung *Dekkera* von der asexuellen, nicht sporulierenden Gattung *Brettanomyces* immer wieder diskutiert (Loureiro & Malfeito-Ferreira 2003, Fia et al. 2005, de Souza Liberal et al. 2007, Uscanga et al. 2007). Die Versuche zu den oben erwähnten Themen besaßen in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich qualitativen Charakter und lieferten die Grundlagen für weiterführende Forschungsarbeiten.

Schließlich konnten physiologische Eigenschaften, insbesondere die Stoffwechselfähigkeiten, zur Differenzierung von *Brettanomyces/Dekkera*-Arten und *D. bruxellensis*-Isolaten herangezogen werden. Die Ergebnisse hierzu wiesen darauf hin, dass eine Differenzierung von Hefen anhand ihrer Stoffwechselformen mit einem Mikrotiterplatten-Test bis auf Stamm-Niveau erfolgen kann.

### 4.5.1 Acetat-Produktion

Die Bildung von Essigsäure in geruchlich und geschmacklich unangenehmen Konzentrationen ist der häufigste und folgenschwerste Weinfehler (Dittrich 1984). Acetat kann in Most und Wein von vielen verschiedenen Mikroorganismen gebildet werden (Dittrich & Großmann 2005). Die nach ihr benannten Essigsäurebakterien sind jedoch in der

Weinherstellung weniger an der Essigsäureproduktion beteiligt, da sie Acetat nur unter aeroben Bedingungen durch Oxidation von Ethanol bilden. Heterofermentative Milchsäurebakterien, wie *Oenococcus oeni*, *Leuconostoc*- und *Lactobacillus*-Spezies sind die wichtigsten Verursacher des sogenannten Essigstichs. Darüber hinaus können die im Most vorhanden „Wildhefen“ größere Konzentration an Essigsäure produzieren. Die „echte“ Weinhefe *S. cerevisiae* bildet während der Weinbereitung 0,2 - 0,4 g/l Essigsäure (Dittrich & Großmann 2005). Die bekannten Schädlingshefen *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces* spec., *Saccharomyces ludwigii*, *Pichia anomala* und *Candida* spec. können dagegen mehr als 1 g/l bilden. Die gesetzlich festgelegten Grenzwerte für Essigsäure liegen für verkehrsfähige Weine bei 1,08 g/l (Weißwein) bzw. 1,20 g/l (Rotwein) (VO EG Nr. 1493/1999). Darüber hinaus darf der zulässige Gehalt an flüchtiger Säure in den Qualitätsstufen „Beerenauslese“ bzw. „Eiswein“ 1,8 g/l und in der Qualitätsstufe „Trockenbeerenauslese“ bis zu 2,1 g/l betragen (VO EG Nr. 1622/2000). Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* werden in der Literatur als starke Acetat-Produzenten bezeichnet (Chatonnet et al. 1995). Dittrich & Großmann (2005) beschrieben für *Brettanomyces/Dekkera* spec. die Produktion von 7,2 g/l Essigsäure in zwölf Monaten bei aerober Kultur in Most. Der für diese Hefen typische „Custers-Effekt“ (Scheffers 1969, Wijsman et al. 1984, Kunkee & Bisson 1993) äußert sich in einer Steigerung der Fermentationsleistung unter aeroben Bedingungen, verbunden mit einer starken Tendenz zur Acetat-Bildung unter gleichzeitiger Reduzierung von  $\text{NAD}^+$  (Carrascosa et al. 1981).

Die Bildung von Acetat kann bei *Brettanomyces/Dekkera* zum einen über die Verwertung von Ethanol erfolgen (Gancedo & Serrano 1989). Ethanol wird hierbei durch eine Alkohol-Dehydrogenase zu Acetaldehyd oxidiert. In einem zweiten Schritt erfolgt die Oxidation zu Essigsäure durch eine Aldehyd-Dehydrogenase. Durch Freisetzung aus Acetylphosphat, das aus dem Pentosephosphat-Abbau des Zuckers stammt, entsteht ebenfalls Essigsäure (Dittrich & Großmann 2005). Der größte Anteil von Acetat wird in *Brettanomyces/Dekkera* jedoch im Zuge der Glucose-Fermentation durch Oxidation von Acetaldehyd durch Aldehyd-Dehydrogenasen gebildet. Acetaldehyd entsteht als ein primäres Gärungsnebenprodukt durch Decarboxylierung von Pyruvat.

Die Essigsäureproduktion steigt mit zunehmendem Glucose-Gehalt, sowohl im Most als auch unter Kulturbedingungen und verursacht bei *Brettanomyces/Dekkera* das langsame Wachstum und das frühe Absterben der Kulturen (Selbstvergiftung). Acetat ist bei niedrigen pH-Werten für die Hefen toxisch. Die Säure kann nur in der undissoziierten Form durch die Plasmamembran diffundieren, woraufhin es zu einer intrazellulären Ansäuerung kommt und

schließlich zur Denaturierung von Proteinen. Aus diesem Grund wurde für Isolierungs- und Kultivierungsversuche generell Calciumcarbonat (1 % w/v) in Flüssig- und Festmedien zugegeben. Das Calciumcarbonat wird in Abhängigkeit von der Acetatproduktion der jeweiligen Spezies unterschiedlich schnell zu Calcium-Acetat und Kohlenstoffdioxid aufgelöst (Abb. 34 b). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *D. bruxellensis*-Stämme zeigten zum Teil eine unterschiedlich stark ausgeprägte Tendenz zur Bildung von Essigsäure, wie anhand der Auflösung der Calciumcarbonat-Schicht in YPG-Agar (Abb. 34 b) und dem Farbumschlag des pH-Indikators in DBDM (Abb. 34 a) zu erkennen war. Das *Dekkera/Brettanomyces*-Differenzierungsmedium (DBDM) nach Rodrigues et al. (2001) hat sich als aussagekräftiger, qualitativer Test zu einem vorläufigen Nachweis dieser Hefen in Wein bewährt. Gegenüber dem kommerziell erhältlichen *Brettanomyces*-Nachweistest MicroQit<sup>®</sup> Detect (Schliessmann Kellerei-Chemie GmbH & Co.KG, Schwäbisch Hall) bietet es den Vorteil einer wesentlich höheren Selektivität. Es differenziert nicht nur über die Cycloheximid-Resistenz von *Brettanomyces/Dekkera*, die auch bei anderen Wildhefen zu finden ist (z. B. *Candida*, diese Arbeit), sondern ermöglicht einen sensorischen Nachweis der Produktion von 4-Ethylphenol und weist die hohe Essigsäure-Bildung durch einen pH-Indikator nach.

Betrachtet man die großen Unterschiede hinsichtlich der Stoffwechsel-Aktivitäten in den Eigenisolaten (Abb. 38), kann man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, dass auch die Acetat-Produktion Stamm-abhängig ist. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass *B. naardenensis* wesentlich schneller und/oder größere Mengen Essigsäure in Kultur auf YPG-Medium produziert, als die übrigen *Brettanomyces/Dekkera*-Arten. Dies konnte auch bei Wachstumsversuchen auf DBDM beobachtet werden. In einer früheren Studie wurde die Essigsäureproduktion von vier *Brettanomyces/Dekkera*-Stämmen (*D. bruxellensis* und *B. custersianus*) quantifiziert (Castro-Martinez et al. 2005). Dabei stellt sich heraus, dass *D. bruxellensis* die höchste Produktivität besaß. Die Spezies *B. naardenensis* wurde hierbei nicht untersucht. Aufgrund der hohen Produktionsrate von 7 g/l Essigsäure in 100 h bei aerobem Wachstum in Batch-Kultur wurden diese Hefen als potentielle Acetat-Produzenten für die industrielle Essigsäure-Produktion vorgestellt. In einer vor kurzem erschienenen Arbeit (Uscanga et al. 2007) konnte die Essigsäure-Produktion durch *D. bruxellensis* sogar auf 13 g/l in 100 h gesteigert werden. Nach diesem Zeitraum betrug der Anteil an lebenden Zellen in der Batch-Kultur allerdings weniger als 40 %. Dies zeigt wiederum die toxische Wirkung dieser Säure bei niedrigen pH-Werten. Für die Möglichkeit einer industriellen Verwendung der Eigenschaften dieser Hefen spricht auch eine weitere Beobachtung von

Uscanga et al. (2007). Der höchste Ertrag und die beste Produktivität in der Essigsäurebildung wurde durch Inkubation dieser Hefen in Zuckerrohr-Sirup (6 % Saccharose) erreicht, dem billigsten Ausgangsmaterial unter allen getesteten Substanzen.

#### 4.5.2 Cellulose-Abbau

Die Fähigkeit zur Verwertung von Cellulose-Fragmenten (Cellodextrine, Cellobiose) durch  $\beta$ -Glucosidasen wurde schon in verschiedenen Wein-relevanten Hefen, unter anderen auch in *Brettanomyces/Dekkera*, untersucht (Freer 1991, McMahon et al. 1999, Fia et al. 2005). Dabei stellte sich heraus, dass diese Enzym-Aktivitäten in „Wildhefen“ größer sind als in *S. cerevisiae* (McMahon et al. 1999).

Der Ausbau von Wein im Holz- oder Barrique-Fass ermöglicht selbst bei sehr niedrigem Restzuckerhalt (< 1 g/l) das Überleben von *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen. Dies hängt mit ihrer Fähigkeit zur Verwertung von Cellulose-Fragmenten (Cellodextrine, Cellobiose) zusammen. Ihre Glucosidase-Aktivität wurde bereits in mehreren Publikationen beschrieben (Van der Walt 1984a, b; Freer 1991; Shantha Kumara et al. 1993, McMahon et al. 1999, Fia et al. 2005). Eine  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität wurde erstmals von Shantha Kumara et al. (1993) in *Brettanomyces lambicus* (heute: *D. bruxellensis*) sowohl intra- als auch extrazellulär beobachtet. Freer (1991) beschrieb die Cellobiose-Verwertung von *B. clausenii*, *D. intermedia* (heute: *D. bruxellensis*) und *B. anomalus* (heute: *D. anomala*) durch eine cytoplasmatisch lokalisierte  $\beta$ -Glucosidase. Außerdem fand er auch enzymatische Aktivitäten zur Hydrolyse von Cellodextrinen, allerdings nur in homogenisierten Zellen. Acht von zehn untersuchten *Brettanomyces*-Stämmen zeigten in der Arbeit von McMahon et al. (1999)  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität. In *D. anomala* wurde sowohl extra- als auch intrazelluläre Aktivität gefunden (Fia et al. 2005). Dieselbe Studie beschreibt darüber hinaus eine hohe Variation der Aktivität in den untersuchten Stämmen. Unter den im Wein vorhandenen Bedingungen, bei niedrigen pH-Werten, hohen Alkohol-Konzentrationen und Sauerstoffmangel, wird jedoch die Synthese und Aktivität der  $\beta$ -Glucosidase gehemmt (McMahon et al. 1999). Ebenso ist bekannt, dass Glucose die Produktion und Aktivität des Enzyms reprimiert (Freer 1991, McMahon et al. 1999, Fia et al. 2005). Da hohe pH-Werte und aerobe Bedingungen für die Enzym-Aktivität und folglich für eine Vermehrung von *Brettanomyces* in einer ansonsten nährstoffarmen Umgebung förderlich sind, sollten diese Bedingungen im Sinne einer Prävention bei der Weinherstellung vermieden werden.

*Brettanomyces/Dekkera*-Hefen besitzen keinen Cellulase-Enzym-Komplex und können daher Cellulose auch nicht direkt verwerten. In der Regel entstehen die verwertbaren

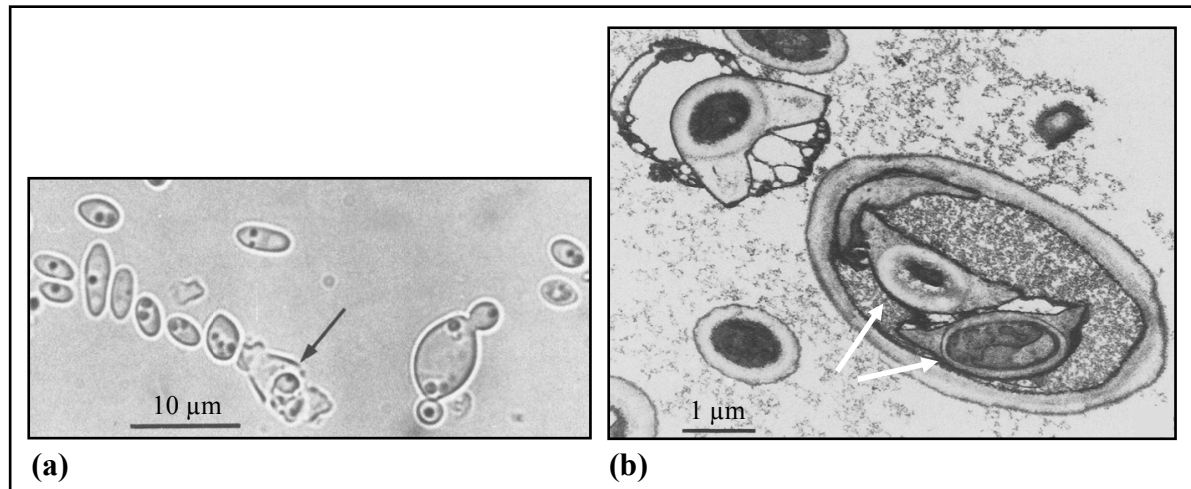
Abbauprodukte der Cellulose aus dem Fass-Holz durch starke Hitzeeinwirkung (Pyrolyse) im Röstungs-Prozess bei der Herstellung von Barrique-Fässern. Deshalb ist das Risiko einer Vermehrung von *Brettanomyces/Dekkera* auch bei der Verwendung von frischen Barriques groß, da diese vermehrt Cellobiose enthalten (Eder 2000). Erste Ergebnisse aus dieser Arbeit (Abb. 35) weisen darauf hin, dass die Hefen durch Sezernierung großer Mengen von Essigsäure (Dittrich & Großmann 2005) die entsprechenden Fragmente durch Säurehydrolyse lokal aus Cellulose selbst generieren können. Dies würde unter anderem auch erklären, warum nicht geröstete Holz-Fässer und ältere Barriques, deren Gehalt an Cellulose-Fragmenten nach mehreren Belegungen stark reduziert ist, trotzdem eine hohe Anfälligkeit für eine *Brettanomyces*-Infektion aufweisen.

#### 4.5.3 Sporenbildung

Die Bildung von Ascosporen ist ein wichtiges Kriterium für die taxonomische Einordnung von Hefen (Kreger-van Rij 1987). Zur Klassifizierung von Hefen wurden die Zellmorphologie, die Art der sexuellen Reproduktion, bestimmte physiologische Aktivitäten, verschiedene biochemische Eigenschaften und Sequenzvergleiche der Genome durch DNA-DNA Reassoziationsuntersuchungen berücksichtigt (Barnett et al. 1990).

Hefen können sich sexuell durch die Ausbildung von Ascosporen (z. B. *Dekkera*), Teliosporen oder Basidien vermehren. Bei der Einordnung von ascosporogenen Hefen ist es von Bedeutung, ob die Asci von vegetativen (diploiden) Zellen (z. B. bei *Dekkera*) gebildet werden oder durch die Konjugation von (haploiden) Zellen bzw. durch die Konjugation einer Mutterzelle mit ihrer Ausknospung entstehen (Barnett et al. 2000). Die Entwicklung der Asci, die Form und die Anzahl der Ascosporen pro Ascus sind weitere Merkmale, die zur Differenzierung von Hefe-Gattungen als auch zur Unterscheidung von Arten innerhalb einer Gattung verwendet wurden. Die beiden teleomorphen Arten *D. bruxellensis* und *D. anomala* (Smith 1998a, b) bilden in ihren Asci (Abb. 38 a) ein bis vier glatte, hutförmige Ascosporen (Abb. 38 b), die schon früh nach der Reifung aus dem sich auflösenden Ascus entlassen werden (van der Walt 1984a). Die sexuelle Reproduktion von Hefen, verbunden mit einer Bildung von Ascosporen, wird in der Natur selten beobachtet, sondern eher unter Laborbedingungen (Fugelsang 1997). Obwohl der sexuelle Zyklus vermutlich auch unter den natürlichen Lebensbedingungen vorkommt, kann er im Labor von der Kultivierung auf speziellen Sporenmedien abhängig sein. In der Literatur werden verschiedene Medien zur Sporeninduzierung in *Dekkera* beschrieben, z. B. SPA(Acetat)-Medium (de Souza Liberal et

al. 2006), Malzagar (Smith & van Grinsven 1984, Kurtzman & Fell 1998) oder mit Vitaminen angereicherte Medien (van der Walt 1984a, Fugelsang 1997).



**Abb. 38.** Mikroskopische Aufnahmen von (a) *Dekkera anomala* (CBS 8138) mit Ascosporen in einem sich auflösenden Ascus (Pfeil), (b) *Dekkera anomala* (CBS 8139) mit hutförmigen Ascosporen (Pfeile). Elektronenmikroskopische Aufnahme. Abbildungen aus Smith & van Grinsven (1984), abgeändert.

Eine Induzierung und Detektion der Sporulation in Hefen der Gattung *Dekkera* ist jedoch problematisch (Smith & van Grinsven 1984, van der Walt 1984a, Kunkee & Bisson 1993) und konnte auch in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet werden. Die Sporulationsrate wurde mehrfach als spärlich bezeichnet (van der Walt 1984a, Smith & van Grinsven 1984) und soll sogar unter idealen Sporulations-Bedingungen unter 1 % liegen (Fugelsang 1997). Fugelsang (1997) diskutiert mehrere Gründe, warum eine sexuelle Reproduktion unter Laborbedingungen nicht beobachtet werden kann. Da die Sporulation wahrscheinlich in einem sehr engen Zeitfenster abläuft, könnte sie im Labor leicht übersehen werden, wenn die Kulturen nicht zum richtigen Zeitpunkt untersucht werden. In diesem Zusammenhang wäre es auch möglich, dass sich die Ascosporen sehr schnell zu neuen, vegetativen Zellen entwickelt haben ohne vorher bemerkt zu werden. Da man bei *Dekkera* keine Paarungs-Typen gefunden hat, wird angenommen, dass die Hefen homothallisch sind (Van der Walt 1984a) und für eine sexuelle Reproduktion das Aufeinandertreffen von kompatiblen Paarungs-Typen nicht notwendig ist. Schließlich können auch verschiedene chemische oder physikalische (z. B. Temperatur) Parameter der Kulturbedingungen das Auftreten eines sexuellen Zyklus in den untersuchten *Dekkera*-Hefen verhindert haben.



#### 4.5.4 Differenzierung durch Stoffwechsellmuster

Konventionelle physiologische Methoden zur Identifizierung von Hefen sind zeit- und materialaufwändig, schwierig durchzuführen und liefern häufig mehrdeutige Ergebnisse (Kreger-van Rij 1984, Barnett et al. 1990, Deak 1995). Verschiedene Systeme wurden bereits für eine schnelle Identifizierung von Hefen, insbesondere von klinisch relevanten Arten, entwickelt. Bekannt sind in diesem Zusammenhang z. B. die Diagnostik-Kits API 20C und ATB 32C (bioMérieux, Frankreich). Viele der heute erhältlichen Kits enthalten nur eine sehr begrenzte Auswahl an Tests und erfassen einige wichtige, Lebensmittel-relevante Schädlingshefen gar nicht (Praphailong et al. 1996). Das YT MicroPlate™ Biolog-System (Biolog Inc., Hayward, USA) ist ein halbautomatisches, Datenbank-gestütztes Test-System zur Identifizierung von Hefen. Es basiert auf einem Mikrotiterplatten-Test mit 96 Ansätzen, der eine Auswahl verschiedener dehydratisierter Kohlenstoff-Quellen für Assimilations- und Oxidations-Tests beinhaltet (<http://www.biolog.com/pdf/YT%20chart.pdf>). Die Ergebnisse der Stoffwechselaktivitäten liefern einen „physiologischen Fingerabdruck“ für jedes Isolat. Dieser kann zur Spezies-Identifizierung mit den Profilen von Hefen verglichen werden, die in einer Datenbank hinterlegt sind. Diese Datenbank ist jedoch nicht frei zugänglich und wurde auch nicht für die vorliegende Arbeit verwendet. Ähnliche Biolog Test-Systeme wurden auch zur Identifizierung von Bakterien entwickelt werden (Stager & Davis 1992). Das YT MicroPlate™ Biolog-System wurde in einer Arbeit von Praphailong et al. (1996) für die Identifizierung von 21 Hefe-Arten (insgesamt 72 Stämme) aus Wein und Nahrungsmitteln evaluiert. Obwohl in ihrer Arbeit einige Schwierigkeiten hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei einigen Hefe-Arten beschrieben wurden, die im Wesentlichen mit den Kulturbedingungen in Zusammenhang standen, konnten alle untersuchten *Dekkera/Brettanomyces*-Hefen korrekt identifiziert werden. Der Biolog-Test erwies sich darüber hinaus in der Arbeit von Praphailong et al. (1996) für *D. bruxellensis* als reproduzierbar (fünf Wiederholungen mit identischen Ergebnissen).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Biolog Test-System für eine erste physiologische Differenzierung von *Brettanomyces/Dekkera*-Arten verwendet und die Stoffwechsel-Profile mit den phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen in Beziehung gesetzt. Aufgrund der hohen Variabilität auf Stammebene (siehe unten) sind Stoffwechseleigenschaften als phylogenetische Marker in der Regel nicht geeignet. In dem vorliegenden Fall korrelierten jedoch die Stoffwechsellmuster der *Brettanomyces/Dekkera*-Typstämme Spezies-spezifisch mit den vergleichenden 26S rDNA-Sequenzanalysen (Abb. 37), dass heißt, die genetisch determinierten Verwandtschaftsverhältnisse repräsentierten hier auch die physiologischen

Gemeinsamkeiten und Unterschiede. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit zeigten die Testansätze mit *D. bruxellensis* durchschnittlich 5 % Abweichung bezüglich positiv bewerteter Test-Reaktionen. Insgesamt belief sich die Fehlerabweichung bei allen mehrfach getesteten *Brettanomyces/Dekkera*-Arten und -Stämmen auf durchschnittlich 5,3 % innerhalb einer Spannweite von 1 % - 13 %. Mögliche Ursachen hierfür könnten Unterschiede in den Vorkulturbedingungen, der Nährstoffzusammensetzung des Mediums, dem Alter der Kultur, der Dichte des Inokulums oder den Inkubationsbedingungen sein. Da diese Parameter möglichst konstant gehalten wurden, ist es jedoch wahrscheinlicher, dass die physiologische Aktivität der Hefen durch andere Faktoren, z. B. die dicht aufeinander folgenden Reproduktionszyklen durch wiederholtes Ausstreichen der Stammkulturen stärker beeinflusst wird.

Eine Differenzierung auf Stammniveau ist durch vergleichende Sequenzanalysen der 26S rDNAs nicht möglich. Auch die hochvariablen ITS-Regionen ermöglichen höchstens eine Unterscheidung von Stamm-Gruppen. Eine Differenzierung der isolierten *D. bruxellensis*-Stämme konnte dennoch über eine molekularbiologische Fingerprint-Methode (nSAPD-PCR, Pfannebecker 2005) (Daten hier nicht gezeigt) und zum Teil auch anhand der Ergebnisse aus dem Mikrotiterplatten-Test (Biolog, USA) erfolgen (Abb. 39). Obwohl das Biolog-System für eine Stamm-Differenzierung nicht explizit vorgesehen ist, lässt es sich, nach den Ergebnissen dieser Arbeit, auch für diese Zwecke verwenden. Problematisch war in diesem Zusammenhang jedoch die äußerst geringe Aktivität in einigen untersuchten Stämmen, z. B. 9A, 9B, 35A, 76A und 128. Diese Hefen konnten zum Teil nur Glucose verwerten und ließen sich daher nicht ausreichend differenzieren (Abb. 39). Da der Test nach 72 h ausgewertet wurde, sind bei sehr langsam wachsenden Stämmen falsch negative Ergebnisse jedoch durchaus möglich. Das physiologische Potential von *D. bruxellensis* spiegelte sich nichtsdestoweniger in einer erstaunlich hohen Diversität der Stoffwechsel-Profile wieder und impliziert eine effiziente Anpassung dieser Hefe an die wechselhaften Nährstoffbedingungen bzw. Substratverfügbarkeiten in Most und Wein. Interessanterweise zeigten einige Stämme, die aus ein und demselben Wein isoliert wurden, wie z. B. 30A, 30B oder 183A, 183B, sehr unterschiedliche Stoffwechsel-Eigenschaften. Möglicherweise haben diese *D. bruxellensis*-Stämme ihre Nährstoffansprüche bzw. ihre Stoffwechsel-Aktivitäten als Voraussetzung für eine unproblematische Koexistenz in einer eng umgrenzten ökologischen Nische aufeinander abgestimmt.

Nichtsdestotrotz sind die physiologischen Variabilitäten zwischen den untersuchten Stämmen zum Teil größer als zwischen den *Brettanomyces/Dekkera*-Arten. Daher ist die

Identifizierung eines *D. bruxellensis*-Isolats auf Basis dieses Tests unter den gegebenen Umständen nicht möglich.

#### **4.6 *Dekkera bruxellensis* in der Weinbauregion Rheinhessen**

In dieser Studie konnte die Nachweisempfindlichkeit und die Möglichkeit für eine routinemäßige Anwendung der oben beschriebenen FISH-Methode durch die Isolierung mehrerer *D. bruxellensis*-Stämme aus Weinproben überprüft werden. Darüber hinaus wurde das Vorkommen und die geographische Verbreitung dieser Hefe in der deutschen Weinbauregion Rheinhessen erstmals untersucht (Röder et al. 2007b). Aus der umfangreichen Analyse von Rotweinen resultierte eine statistische Datenerhebung, die darauf hinweist, dass diese Hefe, zumindest in der regionalen Weinherstellung, weiter verbreitet ist, als allgemein von Winzern und Önologen angenommen wird.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Untersuchung 37 Stämme aus 291 rheinhessischen Weinen isoliert werden. Aus fast 50 % der infizierten Weinproben aus den Bereichen Wonnegau, Nierstein und Bingen wurden jeweils zwei, bereits morphologisch unterscheidbare Stämme isoliert (Tab. 16). Die zwei Kolonieförmigkeiten traten regelmäßig in den verschiedenen Kulturansätzen auf. Diese Beobachtung wurde in der entsprechenden Fachliteratur bisher noch nicht beschrieben. Durch vergleichende Sequenzanalysen (ITS-Regionen, D1/D2-Regionen) konnten alle Isolate als Stämme der Art *D. bruxellensis* identifiziert werden. Diese Ergebnisse ließen sich durch die FISH-Experimente mit Art-spezifischen Sonden bestätigen. *D. bruxellensis* wird auch in der Literatur als die am häufigsten aus Wein isolierte *Brettanomyces/Dekkera*-Spezies beschrieben (Thomas 1993, Chatonnet 1995, Fugelsang 1997). Curtin et al. (2007) isolierten und identifizierten in einer sehr umfangreichen Studie 244 *D. bruxellensis*-Stämme aus 31 Weinbauregionen Australiens.

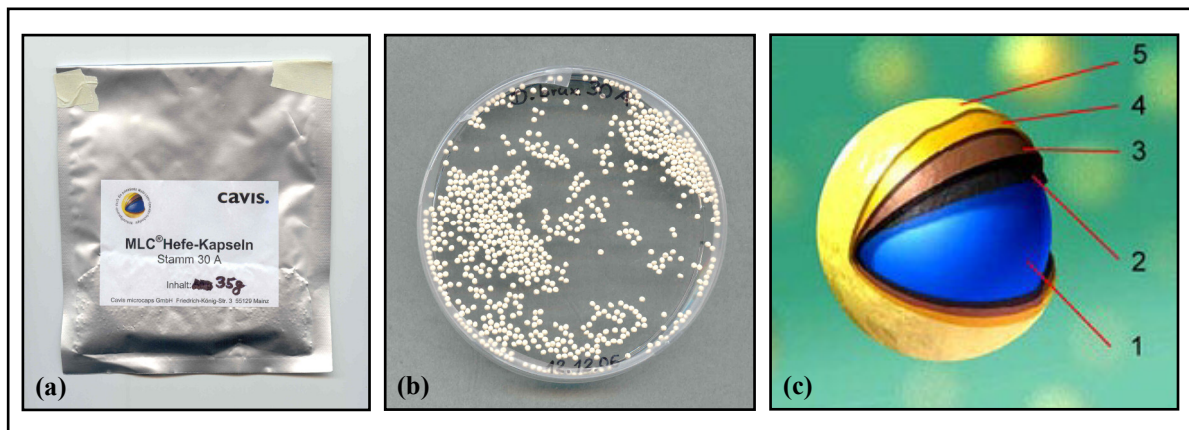
Obwohl *D. bruxellensis* in einzelnen Fällen auch aus Weißwein und Sekt isoliert werden konnte, begünstigt gerade Rotwein in hölzernen Gebinden das Vorkommen dieser Hefen. Dies hat unter anderem folgende Gründe. Bei der Rotweinherstellung gelangen aus der Beerenschale, den Samen und dem Stielgerüst wesentlich mehr Phenolsäure-Verbindungen in die Maische als bei anderen Weinen. Diese Zimtsäurederivate (insbesondere p-Cumarsäure und Ferulasäure) können als Precursor-Verbindungen von *Brettanomyces/*

*Dekkera*-Spezies zu den flüchtigen Ethylphenolen umgewandelt werden, die schließlich das charakteristische „Brett-Aroma“ hervorrufen (Chatonnet et al. 1992, 1995). In der zweiten enzymatischen Reaktion dieses Prozesses (Abb. 3) wird die Vinylgruppe der Phenole zum Ethyl-Rest reduziert. Dabei wird NADH oxidiert. Dieser reduzierende Schritt könnte durch die Regenerierung von NAD<sup>+</sup>, das bei niedrigem Sauerstoffgehalt in der Zelle limitiert ist, den Stoffwechsel der Hefen aufrechterhalten (Fugelsang & Edwards 2007). Darüber hinaus bietet der spezielle Ausbau von Rotwein im Barrique dieser Spezies einen gewissen Vorteil, da sie Cellulose-Fragmenten (siehe oben) verwerten können. Die poröse und schwer zu reinigende Oberfläche des Holzes bietet beste Möglichkeiten zur Überdauerung dieser Mikroorganismen, die mit ihrem Pseudomycel in Ritzen und Spalten der Fässer eindringen und dort geschützt lange Zeit überdauern können. Darüber hinaus führt der bei der Rotweinbereitung erhöhte Sauerstoffkontakt durch das mehrfache Umfüllen und die Mikroaerobisierung im Holz- oder Barrique-Ausbau zu einer erhöhten Fermentationsleistung („Custers-Effekt“, Scheffers 1979) von *D. bruxellensis* (Van Urk 1990, Kunkee & Bisson 1993). Auf *S. cerevisiae* wirkt Sauerstoff dagegen inhibierend (Lagunas et al. 1982). Einen Selektionsvorteil gegenüber vielen anderen Weinhefen erhält *D. bruxellensis* im Rotwein, der in der Regel mehr Alkohol enthält als Weißwein, auch aufgrund der hohen Alkoholtoleranz von bis zu 15 Vol. % (Dittrich & Großmann 2005).

Im Rahmen der Untersuchungen implizierte eine Detektion von *D. bruxellensis* nicht zwangsläufig eine Schädigung der infizierten Weine. Obwohl die meisten positiv getesteten Weinproben bereits sensorisch auffällig waren, wurde nur in Ausnahmefällen die Auswirkung auf das Aroma als deutlich negativ empfunden. Von den hier untersuchten Proben war lediglich ein Wein in Geruch und Geschmack deutlich geschädigt. Die *Brettanomyces*-typischen Aromanoten können in einer amtlichen Qualitätsweinprüfung zur Ablehnung führen. Interessanterweise werden Stämme dieser Hefen für die Nachgärung von bestimmten englischen und belgischen Bier-Sorten, wie Lambic, Stout und Gueuze (säurereiche Ales in Belgien) gezielt eingesetzt (Vanderhaegen et al. 2003). Da die animalischen, leder-artigen Aromanoten in verschiedenen Rotweinen ein internationales Flair implizieren, wird der Einfluss von *Brettanomyces*-typischen Sekundärmetaboliten auf das Weinroma unterschiedlich beurteilt (Kunkee & Bisson 1993, Mitrakul et al 1999, Eder 2000). Der einflussreiche Weinkritiker Robert Parker (<http://www.erobertparker.com/>) betont in seinen Kommentaren immer wieder, dass ein kleiner Brett-Charakter positiv für den Wein sei. Dies ist besonders dann der Fall, wenn die Brett-Töne aufgrund einer geringfügigen Infektion oder durch einen geringen Gehalt an Precursor-Verbindungen im

Most, nicht dominant auftreten und zur Abrundung des Weinaromas beitragen. In Abhängigkeit von den Konzentrationen (siehe Einleitung) ergeben sich durchaus positive Effekte auf die geschmackliche Komplexität, die von der überwiegenden Mehrheit der Konsumenten geschätzt wird (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

Vor diesem Hintergrund entstand auch die Idee, *Brettanomyces*-Hefen in geeigneter Form für eine kontrollierte Aromatisierung von Weinen einzusetzen. In Zusammenarbeit mit der Firma Erbslöh AG in Geisenheim, wurde in einem Vorversuch eine Mikroverkapselung mit Alginat von Hefen des *D. bruxellensis*-Stamms 30A (Abb. 39 a, b) durchgeführt (Cavis GmbH, Mainz-Hechtsheim). Die Verkapselung dient der Immobilisierung von Hefen und findet z. B. mit *S. cerevisiae* bereits in der Flaschenvergärung von Sekt Verwendung. Die spezielle Mikrokapsel (Abb. 39 c) isoliert die Mikroorganismen vom umgebenden Medium (Wein), schützt sie vor schädigenden Einflüssen und erhöht die mechanische Stabilität (Cavis GmbH).



**Abb. 39.** Immobilisierte *D. bruxellensis* (Stamm 30A)-Hefen [Produktpackung (a) und Mikrokapseln in Petrischale (b)]. Die Hefen wurden mit einer von Cavis GmbH (Mainz-Hechtsheim) patentierten Multi-Layer-Capsule (MLC<sup>®</sup>)-Technologie (c) verkapselt [Abb. (c): <http://www.cavis.de>]. Mehrere Polymerschichten (c, 2-5) aus natürlichen Polykationen bzw. Polyanionen (z. B. Poly-L-Lysin, Chitosan, Alginat, Polyethylenamine) umhüllen einen Alginat-Kern (1), der die Hefen enthält. Die Schichten regulieren die Permeabilität und sind für die Stabilität der Kapsel verantwortlich. Außerdem bestimmt die äußere Hülle die Oberflächeneigenschaften der Kapsel.

Durch das Verkapseln von lebenden Zellen in entsprechend durchlässigen Hüllen entstehen miniaturisierte Bioreaktoren. Die Precursor-Verbindungen diffundieren in die Kapsel ein, werden dort umgesetzt und anschließend wieder in den Wein abgegeben. Durch Entfernung

der Kapseln kann die Aromatisierung jederzeit unterbrochen werden, wenn der gewünschte Geschmack erreicht wurde. Aufgrund ihrer Größe lassen sich die Kapseln nach Beendigung des Vorgangs leicht wieder aus dem Wein entfernen.

Wie sich im Rahmen der Probennahme herausgestellt hat, verschneiden die Winzer in der Regel die infizierten Weine um die entsprechenden Geschmacksstoffe auf ein akzeptables Maß zu reduzieren. In diesem Zusammenhang ist die Einhaltung önologischer Maßnahmen zur Kellerhygiene, wie das sorgfältiges Filtrieren und die Zugabe von Schwefeldioxid vor dem Umfüllen des betreffenden Weins zu beachten (Steidl & Renner 2001), um einer unkontrollierten Verbreitung von *Brettanomyces*-Hefen vorzubeugen.

## 5. Ausblick

Sonden-Methoden wie die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ermöglichen es, verschiedene Mikroorganismen spezifisch in einer komplexen Lebensgemeinschaft zu lokalisieren, zu identifizieren und zu quantifizieren. Vor dem Hintergrund, dass sich nach wie vor die meisten Mikroorganismen mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht im Labor kultivieren lassen, gewinnt diese kultivierungsunabhängige Methode weiterhin an Bedeutung.

Für ein effizientes Design von rRNA-bindenden Sonden sind die tatsächlichen Strukturverhältnisse in den Zielregionen von wesentlicher Bedeutung. Um die komplexe Generierung von spezifischen rRNA-Sekundärstrukturen in Zukunft zu vereinfachen, wurde die Programmierung einer entsprechenden Software (Structure Star 1.0) in Auftrag gegeben (P. Ricke, freier Bioinformatiker, Arnsberg). Structure Star ermöglicht das Visualisieren von Primär- und Sekundärstrukturdaten („Referenzsequenzen“) der Gutell-Lab-CRW-Datenbank (<http://www.rna.ccbb.utexas.edu/>) und das Übertragen dieser Informationen auf homologe Sequenzen („Arbeitssequenzen“), für die zunächst lediglich die Primärstruktur (Sequenz) bekannt sein muss. Von der Referenzsequenz abweichende Bereiche der Arbeitssequenz können anschließend mittels eines Mfold (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>)-Interface (Schnittstelle zu einer Software, die Sekundärstrukturen vorhersagt) thermodynamisch neu berechnet oder auch manuell angepasst werden (P. Ricke, persönliche Mitteilung). Anhand dieser neu generierten SSU bzw. LSU rRNA-Sekundärstrukturen lassen sich zukünftig für verschiedene Organismen-Arten geeignete Zielbereiche für die Entwicklung von DNA-Gemeinschafts-Sonden detektieren. Dies ermöglicht eine umfassende Anwendung der neu etablierten FISH-Methode (Fröhlich et al. 2002, Röder et al. 2007). Vor dem Hintergrund einer Vielzahl verschiedener molekularer Nachweismethoden (Kurtzman, 2006) gilt es, die Vorteile der Fluoreszenz in situ Hybridisierung weiter auszubauen und die Methode an den Organismus bzw. die Hefe-Spezies anzupassen. Die hier vorgestellte FISH-Methode ist eine schnelle, spezifische und relativ kostengünstige Nachweismethode für Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* und könnte, unter anderem in der Weinherstellung, individuell eine prozessbegleitende Qualitätssicherung und eine präventive Kellerhygiene fördern.

In zukünftigen Untersuchungen sollte geklärt werden, inwieweit sich regionsbezogene Verbreitungswege aus den Verwandtschaftsverhältnissen ableiten lassen, die möglicherweise durch Tiere (z. B. Vogelschwärme) verursacht werden oder auch anthropogenen Einflüssen unterliegen. Hierbei müssen die Ergebnisse von Cluster-Analysen mit der geographischen Herkunft der Isolate verglichen werden. Eine Differenzierung auf Stamm-Niveau bildet in jedem Fall die Basis für eine Rückverfolgbarkeit („Traceability“) von Wein-relevanten Mikroorganismen und unterstützt die Untersuchung von möglichen Infektionswegen, über die bisher nur wenig bekannt ist. Neue Erkenntnisse unter diesem Aspekt sind sowohl für die Etablierung neuer, präventiver Hygienemaßnahmen als auch zur wirtschaftlichen Schadensbegrenzung in der Weinproduktion von großer Bedeutung.

Weitere Untersuchungen sollten darüber hinaus zur Stoffwechselfysiologie von *D. bruxellensis* in Most und Wein unternommen werden. Hierbei gilt es insbesondere zu klären, inwieweit die Stamm-abhängige physiologische Aktivität mit der Produktion der Spezies-typischen Sekundärmetabolite korrespondiert. Im Hinblick auf eine mögliche Verwendung von *Brettanomyces*-Hefen zur gezielten Aromatisierung von Rotwein könnten darauf hin mit geeigneten Stämmen erste Kultivierungsversuche in Kooperation mit Winzerbetrieben angestellt werden. Der Einfluss einer Immobilisierung durch Mikroverkapselung auf die physiologische Aktivität dieser Hefen steht darüber hinaus auch im Blickpunkt zukünftiger Untersuchungen.



## 6. Zusammenfassung

Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera* sind vor allem in der Produktion von fermentierten Getränken, insbesondere in der Bier-, Sekt- und Weinherstellung bekannt. In der Weinbereitung sind sie weit verbreitet und werden hier zu den Schädlingshefen gezählt. Sie können insbesondere durch die Bildung der charakteristischen Sekundärmetaboliten 4-Ethylphenol und 4-Ethylguajakol zu einer geschmacklichen Veränderung des Weins führen.

Trotz der ökonomischen Signifikanz, vor allem in der Weinproduktion, haben sich bisher nur sehr wenige Studien mit der Detektion oder Differenzierung von *Brettanomyces/Dekkera*-Spezies beschäftigt. Aufgrund ihres langsamen Wachstums werden diese Hefen bei Routineanalysen mit konventionellen Kultivierungsmethoden leicht übersehen, bis der Wein ernsthaft durch einen unangenehmen Geruch und Geschmack geschädigt ist. Ein schneller und eindeutiger Nachweis von *Brettanomyces/Dekkera* ist jedoch bis heute problematisch.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit als Themenschwerpunkt eine Methode zur sicheren Detektion und Identifizierung aller bekannten Spezies dieser Gattungen entwickelt. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) stellte sich als eine hierfür besonders geeignete Methode heraus, da sie einen direkten mikroskopischen Nachweis dieser Organismen in der Untersuchungsprobe ermöglichte. Im Hinblick auf die Generierung Art-spezifischer DNA-Sonden wurden die ribosomalen Gen-Cluster der verschiedenen Spezies hinsichtlich potentieller Zielregionen analysiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die 26S rDNA des ribosomalen Genclusters von *Brettanomyces/Dekkera*-Arten, neben den D1/D2-Domänen, mehrere hoch variable Sequenzbereiche besitzt. Diese Regionen sind bei *Brettanomyces/Dekkera* und wahrscheinlich auch bei anderen eukaryotischen Organismen unterschiedlicher Taxa sowohl für phylogenetische Analysen als auch für Detektions- und Identifizierungs-Methoden wie die FISH besonders geeignet. Eine signifikante Steigerung des Sonden-vermittelten Fluoreszenz-Signals konnte durch die Anwendung eines neuen Sonden-Konzepts realisiert werden. Der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Gemeinschafts-Sonden (‘side’ probes), die sowohl die in situ Zugänglichkeit der Zielregionen erleichtern als auch das Fluoreszenz-

Signal verstärken, trägt wesentlich zur Verbesserung von ehemals beschriebenen FISH-Methoden bei.

Mit der hier vorgestellten Sonden-Methode ließen sich zum ersten Mal alle fünf *Brettanomyces/Dekkera*-Arten sicher und eindeutig identifizieren. Anhand der Untersuchung von infizierten Weinproben unterschiedlicher Herkunft konnten die Eignung und die Sensitivität dieser Methode für die angewandte Routine-Analyse überprüft werden.

Da eine Detektion dieser Hefen allein noch keinen Hinweis über das tatsächliche Ausmaß einer Infektion gibt, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Vitalitätsfärbungen hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf *Brettanomyces/Dekkera* evaluiert. Dabei stellte sich heraus, dass nicht alle untersuchten Methoden zur Differenzierung von lebenden und toten Zellen für diese Hefen geeignet sind. Bei der Untersuchung von Weinproben sollte eine Überprüfung der physiologischen Aktivität der detektierten Hefen durch Anfärbungen mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen sinnvollerweise immer parallel zu den Hybridisierungsversuchen durchgeführt werden.

Eine Differenzierung von *Brettanomyces/Dekkera*-Hefen auf Art- und Stamm-Niveau konnte in dieser Arbeit durch einen physiologischen Mikrotiterplatten-Test (Biolog, USA) vorgenommen werden. Diese Methode lieferte für die Hefen spezifische Stoffwechsellmuster die als „physiologische Fingerabdrücke“ miteinander verglichen werden konnten. Interessanterweise stimmten hierbei die aus diesen Daten resultierten Beziehungen der Hefe-Spezies mit den phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen auf Basis der vergleichenden 26S rDNA-Sequenzanalysen überein. Die untersuchten *D. bruxellensis*-Isolate zeigten ein sehr vielfältiges Stoffwechselspektrum und unterschieden sich alle wesentlich von dem entsprechendem Typstamm. Ihre Fähigkeit zur Verwertung verschiedenster Substrate ließ auf eine komplexe Anpassung der Stämme an die unterschiedlichen Nährstoffbedingungen in Most und Wein schließen.

In einem weiteren, ökologisch orientierten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde die Verbreitung von *Brettanomyces/Dekkera* in der Weinbauregion Rheinhessen untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass in 15 % der untersuchten Winzerbetriebe diese Hefe in Rotweinproben gefunden werden konnte. *D. bruxellensis* ist daher in der regionalen Weinherstellung weiter verbreitet als allgemein angenommen wurde. Insgesamt konnten im Rahmen der Probenuntersuchungen aus 299 Weinen 44 *D. bruxellensis*-Stämme isoliert werden, die für zukünftige Forschungsarbeiten in die institutseigenen Stammsammlung aufgenommen wurden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Amann, R.W., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Ambrosi, H. (2001): Wein Enzyklopädie. Gräfe und Unzer Verlag, München.
- Ambrosi, H., Paul, A., Perscheid, M., Runck, K.H., Seckler, H. & Piroué, S. (2002): Wein von A-Z. Gondrom Verlag, Bindlach.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. & Yarrow, D. (1990): Yeasts: Characteristics and identification (2nd ed.). Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. & Yarrow, D. (2000): Yeasts: Characteristics and identification (3rd ed.). Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Bast, E. (2001): Mikrobiologische Methoden: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Behrens, S., Fuchs, B.M., Mueller, F. & Amann, R. (2003a): Is the in situ accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia coli* for CY3-labeled oligonucleotide probes predicted by a three-dimensional structure model of the 30S ribosomal subunit? *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4935-4941.
- Behrens, S., Rühland, C., Inacio, J., Huber, H., Fonseca, A., Spencer-Martins, I., Fuchs, B.M. & Amann, R. (2003b): In situ accessibility of small subunit ribosomal RNA of members of the domains Bacteria, Archaea and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1748-1758.

- Ben Ali, A., Wuyts, J., De Wachter, R., Meyer, A. & Van de Peer, Y. (1999): Construction of a variability map for eukaryotic large subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2825-2831.
- Boekhout, T., Kurtzman, C.P., O'Donnell, K. & Smith, M.T. (1994): Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 781-786.
- Brown, L.J., May, J.P. & Brown, T. (2001): Synthesis of a modified thymidine monomer for site-specific incorporation of reporter groups into oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **42**: 2587-2591.
- Cai, J., Roberts, I.N. & Collins, M.D. (1996): Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **56**: 542-549.
- Cannone J.J., Subramanian S., Schnare M.N., *et al.* (2002): The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* **3**: 2.
- Carrasco, M.S., Moragues, L.G., Vignatti, C.I., Scarinci, H.E. & Simonetta, A.C. (2006): Characterisation and technological aspects of yeasts isolated from raw milk and different types of cheese produced in Argentina. *Aust. J. Dairy Technol.* **61**: 21-25.
- Carrascosa, J.M., Viguera, M.D., Nuez de Castro, I. & Scheffers, W.A. (1981): Metabolism of acetaldehyde and Custers effect in the yeast *Brettanomyces abstinens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **47**: 209-215.
- Castro-Martinez, C., Escudero-Abarca, B.I., Gomez Rodriguez, J., Hayward-Jones, P.M. & Aguilar-Uscanga, M.G. (2005): Effect of physical factors on acetic acid production in *Brettanomyces* strains. *J. Food Process Eng.* **28**: 133-143.

- Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M. Alexandre, H. & Voilley A. (2005): Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chem.* **91**: 39-44.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N & Pons, M. (1992): The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* **60**: 165-178.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D. & Boidron, J.N. (1995): The influence of *Brettanomyces / Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**: 463-468.
- Chatonnet, P., Viala, C. & Dubourdieu, D. (1997): Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**: 443-448.
- Ciani, M. & Ferraro, L. (1997): Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *J. Sci. Food. Agric.* **75**: 489-495.
- Claussen, N.H. (1903): Improvements in and connected with the manufacture of English beers or malt liquors and in the production of pure yeast cultures for use therein. Eng. Pat. 28, 184, p. 204.
- Cosentino, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Mulargia, A.F. & Palmas F. (2001): Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **69**: 53-58.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S. & Sohier, D. (2006): Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **108**: 130-135.
- Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P.W. & de Barros Lopes, M.A. (2007): Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Res.* **7**: 471-481.
- Custers, M.T.J. (1940): Onderzoekingen over het Gistseglacht *Brettanomyces*. Dissertation, Universität Delft.

- Deak, T. (1995): Methods for the detection and identification of yeasts in foods. *Trend Food Sci. Tech.* **6**: 287-292.
- De Rijk, P., Robbrecht, E., de Hoog, S., Caers, A., Van de Peer, Y. & de Wachter, R. (1999): Database on the structure of large subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **27**: 174-178.
- De Souza Liberal, A.T., Basilio, A.C.M., do Monte Resende, A., Brasileiro, B.T.V., da Silva-Filho, E.A., de Moraes, J.O.F., Simoes, D.A. & de Moraes M.A. (2007): Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous ethanol fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 538-547.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. (2003): Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* **20**: 377-384.
- Dittrich, H.D. (1984): Essigstich – Noch immer Weinfehler Nr. 1. Ursachen und Zusammenhänge. *Deutsch. Weinb.* **39**: 1154-1163.
- Dittrich H.D., Großmann, M. (2005): Mikrobiologie des Weines. Ulmer, Stuttgart
- Duarte, F.L., Pais, C., Spencer-Martins, I. & Leao, C. (1999): Distinctive electrophoretic isoenzyme profiles in *Saccharomyces cerevisiae* sensu stricto. *Int J. System. Bacteriol.* **49**: 1907-1913.
- Eder, R. (2000): Pferdeschweiß. In Eder et al. (Hrsg.), Weinfehler - Erkennen, Vermeiden, Beheben. Ulmer, Stuttgart, S. 110-115.
- Egli, C.M. & Henick-Kling, T. (2001): Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**: 241-247.
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D. & Querol, A. (1998): The role of non-*Saccharomyces* in industrial winemaking. *Int. Microbiol.* **1**: 143-149.

- Felsenstein J (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.
- Fia, G., Giovani, G. & Rosi I. (2005): Study of  $\beta$ -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 509-517.
- Freer, S.N. (1991): Fermentation and aerobic metabolism of cellodextrins by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 655-659.
- Fröhlich, J. (1999): Entwicklung und Einsatz von Isolierungstechniken zur phylogenetischen Charakterisierung symbiontischer Mikroorganismen im Darm von Termiten. Dissertation, Universität Ulm.
- Fröhlich, J. & König, H. (2002): Gensonden zum Nachweis von Spezies der Gattung *Oenococcus*. Patent application DE10204858.4.
- Fröhlich, J. & Pfannebecker, J. (2006): Spezies-unabhängiges Nachweisverfahren für biologisches Material. Patentanmeldung DE 102 06 022 569.
- Fröhlich, J., König, H., Bandenburg, B. & Hirschhäuser, S. (2003): Gene probes for the detection of the *Oenococcus* species. Patent application WO 03/066894 A2.
- Fuchs, B.M., Glöckner, F.O., Wulf, J. & Amann, R. (2000): Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3603-3607.
- Fuchs, B.M., Syutsubo, K., Ludwig, W. & Amann, R. (2001): In situ accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 961-968.
- Fugelsang, K.C. (1993): *Brettanomyces* and *Dekkera*: Implications in winemaking. In Gump, B.H. (Ed.), Beer and Wine Production: Analysis, Characterization, and Technological Advances. *ACS Symposium Series* **536**: 110-131.

- Fugelsang, K.C. (1997): Yeasts and molds. *In* Fugelsang, K.C. (Ed.), *Wine Microbiology*. Chapman and Hall, New York, pp. 68-116.
- Fugelsang, K. C. & Edwards, C. G. (2007): *Wine microbiology, practical applications and procedures*. Springer, New York.
- Gancedo, C. & Serrano, R. (1989): Energy-yielding metabolism. *In* Rose, A.H. & Harrison, J.S. (Eds.), *The Yeasts*, 2nd ed., vol. 3. Academic Press, London, pp. 205-251.
- Gilliland, R.B. (1961): *Brettanomyces*. I. Occurrence, characteristics, and effects on beer flavour. *J. Inst. Brew.* **67**: 257-261.
- Grbin, P.R. & Henschke, P.A. (2000): Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces*. *Aust. J. Grape Wine R.* **6**: 255-262.
- Gutell, R.R., Gray, M.W. & Schnare, M.N. (1993): A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures: 1993. *Nucleic Acids Res.* **21**: 3055-3074.
- Hassouna, N., Michot, B. & Bachellerie, J. (1984): The complete nucleotide sequence of a mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **12**: 3563-3583.
- Henry-Stanley, M.J., Garni, R.M. & Wells, C.L. (2004): Adaption of FUN-1 and Calcofluor white stains to assess the ability and viable and nonviable yeast to adhere to and be internalized by cultured mammalian cells. *J. Microbiol Methods* **59**: 289-292.
- Heresztyn, T. (1986): Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeasts. *Arch. Microbiol.* **146**: 96-98.
- Hesford, F. & Schneider, K. (2004): Die Entdeckung eines dritten Ethylphenols als Mitverursacher des *Brettanomyces*-Fehltons. *Schweiz. Z. Obst-Weinbau* **13**: 11-13.



- Hirschhäuser, S. (2002): Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und Einzelzell-Mikromanipulation als neue Anwendungen bei der Identifizierung von *Oenococcus oeni*- Stämmen. Diplomarbeit, Universität Mainz.
- Hirschhäuser, S., Fröhlich, J., Gneipel, A., Schönig, I. & König, H. (2005): Fast protocols for the 5S rDNA and ITS-2 based identification of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol. Lett.* **244**: 165-171.
- Hoeben, P., Weiller, G. & Clark-Walker, G.D. (1993): Larger rearranged mitochondrial genomes in *Dekkera/Brettanomyces* yeasts are more closely related than smaller genomes with a conserved gene order. *J. Mol. Evol.* **36**: 263-269.
- Hopple, J.S. & Vilgalys, R. (1999): Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups, and monophyly. *Mol. Phylogenet. Evol.* **13**: 1-10.
- Hyldig-Nielsen, J.J., O'Keefe, H.P. & Stender, H. (2000): Probes, probe sets, methods and kits pertaining to the detection, identification and/or enumeration of yeast; particularly in wine. Patent application: WO 0077259.
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F. & Jimenez, J. (1996): Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 998-1003.
- Inacio, J., Behrens, S., Fuchs, B.M., Fonseca, A., Spencer-Martins, I. & Amann, R. (2003): In situ accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-labelled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2899-2905.
- Johnston, M., Hillier, L., Piles, *et al.* (1997): The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. *Nature* **387**: 87-90.
- Koch, H.-J. (1995): Rheinhesisches Weinlexikon. Verlagsgruppe Rhein Main, Mainz.

Knippers, R. (2006): Molekulare Genetik. Thieme, Stuttgart.

Kreger-van Rij (1984): The Yeasts, a Taxonomic Study. Elsevier, Amsterdam.

Kreger-van Rij (1987): Classification of yeasts. *In* Rose, A.H. & Harrison, J.S. (Eds.), The Yeasts, Biology of Yeasts (2nd ed.). Academic Press, London, pp. 5-61.

Kunkee, R. & Bisson, L. (1993): Winemaking yeasts. *In* Rose, A.H. & Harrison, J.S. (Eds.), The Yeasts, Yeast Technology (2nd ed.). Academic Press, London, pp. 69-127.

Kurtzman, C.P. (2006): Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. *Mycoscience* **47**: 65-71.

Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (1998): The Yeasts, a Taxonomic Study. Elsevier, Amsterdam.

Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. (1998): Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 331-371.

Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A. & Saéz, M. J. (1982): Mechanisms of appearance of the Pasteur Effect in *Saccharomyces cerevisiae*: Inactivation of sugar transport systems. *J. Bacteriol.* **152**: 19-25.

Lebaron, P., Catala, Ph., Parthuisop, N. (1998): Effectiveness of SYTOX Green stain for bacterial viability assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2697-2700.

Leitch, A.R., Schwarzacher, T., Jackson, D. & Leitch I.J. (1994): *In situ*-Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Lenaerts, J., Lappin-Scott, H.M. & Porter, J. (2007): Improved fluorescent in situ hybridization method for detection of bacteria from activated sludge and river water by using DNA molecular beacons and flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2020-2023.

- Licker, J.L., Acree, T.E. & Henick-Kling, T. (1998): What is „Brett“ (*Brettanomyces*) Flavor? *ACS Symposium Series* **714**: 96-115.
- Loureiro, V. & Malfeito-Ferreira, M. (2003): Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* **86**: 23-50.
- Loureiro, V. & Querol, A. (1999): The prevalence and control of spoilage yeasts in food and beverages. *Trends Food Sci. Technol.* **10**: 356-365.
- Lloyd, D. & Hayes, A.J. (1995): Vigour, vitality and viability of microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**: 1-7.
- Malfeito-Ferreira, M., Tareco, M. & Loureiro, V. (1997): Fatty-acid profiling: A feasible typing system to trace yeast contamination in bottling plants. *Int. J. Food Microbiol.* **38**: 143-155.
- Mathews, D.H., Disney, M.D., Childs, J.L., Schroeder, S.J., Zuker, M. & Turner, D.H. (2004): Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 7287-7292.
- Mazzoni, C., Zarzov, P., Rambourg, A. & Mann, C. (1993): The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **123**: 1821-1833.
- McMahon, H., Zoecklein, B.W., Fugelsang, K. & Jasinski, Y. (1999): Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 198-203.
- Millard, P.J., Roth, B.L., Thi, H.-P., T., Yue, S.T. & Haugland R.P. (1997): Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ. Microbiol.* **63**: 2897-2905.

- Mitrakul C.M., Henick-Kling T. & Egli C.M. (1999): Discrimination of *Brettanomyces/ Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprint methods. *Food Microbiol* **16**: 3-14.
- Musters, W., Planta, R.J., van Heerikhuizen, H. & Raué, H.A. (1990): Functional analysis of the transcribed spacers of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA: it takes a precursor to form a ribosome. In Hill et al. (Eds.), *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 435-442.
- Navascués, E. & Rasines, G. (2003): Método de detección directa de *Brettanomyces* spp. en vinos de crianza en bodega. *Enologos*, **23**: 24-26.
- Nisiotou, A.A. & Gibson, G.R. (2005): Isolation of culturable yeasts from market wines and evaluation of the 5.8S-ITS rDNA sequence analysis for identification purposes. *Lett. Appl. Microbiol.* **41**: 454-463.
- Obrig, T.G., Culp, W.J., McKeehan, W.L. & Hardesty, B. (1971): The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J- Biol. Chem.* **246**: 174-181.
- O'Meara, D., Nilsson, N., Nygren, P., Uhlén, M. & Lundeberg, J. (1998): Capture of single-stranded DNA assisted by oligonucleotide modules. *Anal. Biochem.* **255**: 195-203.
- Page, R.D.M. (1996): TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Bioscience* **12**: 357-358.
- Pernthaler, A. Pernthaler, J. & Amann, R. (2002): Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3094-3101.
- Pfannebecker, J. (2005): Entwicklung einer PCR-Methode zur Stammanalyse von pro- und eukaryotischen Mikroorganismen aus Wein. Diplom-Arbeit, Universität Mainz.

- Phister, T.G. & Miller, D.A. (2003): Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7430-7434.
- Praphailong, W., Van Gestel, M., Fleet, G.H. & Heard, G.M. (1996): Evaluation of the Biolog system for the identification of food and beverage yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**: 455-459.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., Revel, G.D. & Lonvaud-Funel, A. (2006): Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeasts species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 1208-1219.
- Röder, C., König, H. & Fröhlich, J. (2007a): Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Res.* **7**: 1013-1026.
- Röder, C., von Walbrunn, C & Fröhlich, J. (2007b): Detektion und Untersuchung der Verbreitung der Wein-relevanten Schädlingshefe *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* in Rheinhessen. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **103**: 353-359.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. (2001): Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 588-599.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G. & Zironi, R. (1992): Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 126-130.
- Rotman, B. & Papermaster, B.W. (1966): Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **55**: 134-141.
- Sanger, F., Niclen, S. & Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **74**: 5463-5467.

- Scheffers, W. A. (1979): Anaerobic inhibition in yeasts (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek* **45**: 150.
- Scheffers, W.A. & Wilkén, T.O. (1969): The Custer effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek. Supplement: Yeast Symposium*, **35**: 31-32.
- Scott, J.H. & Schekman, R. (1980): Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *J.Bacteriol.* **2**: 414-423.
- Shantha Kumara, H.M.C. De Cort, S. & Verachtert, H. (1993): Localization and characterization of  $\alpha$ -Glucosidase activity in *Brettanomyces lambicus*. *Appl Environ. Microbiol.* **59**: 2352-2358.
- Smith, M.T.H. (1998a): *Dekkera* van der Walt. In Kurtzman C.P. & Fell J.W. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study* (4th ed.). Elsevier, Amsterdam, pp. 174-177.
- Smith, M.T.H. (1998b): *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. In *The Yeasts, a Taxonomic Study* (4th ed.). Elsevier, Amsterdam, pp. 450-453.
- Smith, M.T. & van Grinsven, A.M. (1984): *Dekkera anomala* sp. nov., the teleomorph of *Brettanomyces anomalus*, recovered from spoiled soft drinks. *Antonie van Leeuwenhoek* **50**: 143-148.
- Snowdon, E.M., Bowyer, M.C., Grbin, P.R. & Bowyer, P.K. (2006): Mousy off-flavor: A review. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 6465-6474.
- Sponholz, W.R. (1992): Wine spoilage by microorganisms. In Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Reading, pp. 395-419.

- Sponholz, W.R., Dittrich, H.H. (1974): Die Bildung von SO<sub>2</sub>-bindenden Gärungsnebenprodukten, höheren Alkoholen und Estern bei einigen Reinzuchthefestämmen und bei einigen für für die Weinbereitung wichtigen „wilden“ Hefen. *Wein-Wiss.* **29**: 301-314.
- Sponholz, W.R., Dittrich, H.H. & Han, K. (1990): Die Beeinflussung der Gärung und der Essigsäureethylesterbildung durch *Hanseniaspora uvarum*. *Wein-Wiss.* **45**: 65-72.
- Stager, C.E. & Davis, J.R. (1992): Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 302-327.
- Stahl, D.A. & Amann, R. (1991): Development and application of nucleic acid probes. In Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York, pp. 205-248.
- Steidl, R. & Renner, W. (2001): *Moderne Rotweinbereitung*. Ulmer, Stuttgart.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J., Sørensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Peery-O'Keefe, H., Sage, A., Young, B. & Coull, J. (2001): Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 938-941.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A. Morata, A. & Calderón, F. (2007): The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chem.* **102**: 10-21.
- Tanious, F.A., Veal, J.M., Buczak, H., Ratmeyer, L.S. & Wilson, W.D. (1992): DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* **31**: 3103-3112.
- Thomas, S. (1993): Yeasts as spoilage organisms in beverages. In Rose, A.H. & Harrison, J.S. (Eds.), *The Yeasts*, 2nd ed., vol. 5. Academic Press, London, pp. 517-561.

- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997): The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882.
- Ugarte, P., Agosin, E., Bordeu, E. & Villalobos J.I. (2005): Reduction of 4-ethylphenol and 4-ethylguajakol concentration in red wines using reverse osmosis and adsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* **56**: 30-36.
- Uscanga, M.G.A., Abarca, B.I.E., Rodriguez, J.G. & Garcia, R.C. (2007): Carbon sources and their effect on growth, acetic acid and ethanol production by *Brettanomyces bruxellensis* in batch culture. *J. Food Process Eng.* **30**: 13-23.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G. & Verachtert, H. (2003): Bioflavoring and beer refermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 140-150.
- Van der Walt, J.P. (1964): *Dekkera*, a new genus of the *Saccharomycetaceae*. *Antonie van Leeuwenhoek* **30**: 273-280.
- Van der Walt, J.P. (1984a): *Dekkera* van der Walt. In Kreger-van Rij, N.J.W. (Ed.), *The Yeasts, a Taxonomic Study* (3rd ed.). Elsevier, Amsterdam, pp. 146-150.
- Van der Walt, J.P. (1984b): *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. In Kreger-van Rij, N.J.W. (Ed.), *The Yeasts, a Taxonomic Study* (3rd ed.). Elsevier, Amsterdam, pp. 146-150.
- Van Urk, H., Voll, W. S. L., Scheffers, W. A. & Van Dijken, J. P. (1990): Transient-state analysis of metabolic fluxes in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 281-287.
- Veldhuis, M.J.W., Cucci, T.L. & Sieracki, M.E. (1997): Cellular DNA content of marine phytoplankton using two new fluorochromes: Taxonomic and ecological implications. *J. Phycol.* **33**: 527-541.



- Wheeler, D.L., Chappey, C., Lash, A.E., Leipe D.D., Madden, T.L., Schuler, G.D., Tatusova, T.A. & Rapp, B.A. (2000): Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **28**: 10-14.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., pp. 315-322.
- Wijsman, M.R., van Dijken, J.P., van Kleeff, B.H.A. & Scheffers, W.A. (1984): Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custer effect). *Antonie van Leeuwenhoek* **50**: 183-192.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I. & Girio, F. (2006): Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **108**: 376-384.
- Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K. & Mikata, K. (1994): The phylogenetic relationships of species of the genus *Dekkera* van der Walt based on the partial sequences of the 18S and 26S ribosomal RNAs (*Saccharomycetaceae*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**: 1803- 1808.
- Yamane, A. (2000): Smart probe: A novel fluorescence quenching-based oligonucleotide probe carrying a fluorophore and an intercalator. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **44**: 297-298.
- Yilmaz, L.S. & Noguera, D.R. (2004): Mechanistic approach to the problem of hybridization efficiency in fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7126-7139.
- Zuker, M. (2000): Calculating nucleic acid secondary structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**: 303-310.

## 8. Anhang

### 8.1 Vergleichende Sequenzanalysen für die Konstruktion phylogenetischer Stammbäume

#### 8.1.1 ITS-Regionen

Die mit einer „1“ versehenen Sequenzpositionen wurden für die phylogenetische Stammbaum-Analyse (Abb. 18) verwendet. Eine hinterlegte Sequenz von *S. cerevisiae* (Acc. Z95939) wurde als Außengruppe einbezogen. Typstämme (<sup>T</sup>) und Isolate (St.) siehe Tabelle 7.

<i>B. custersianus</i> <sup>T</sup>	CGAGTGCAAGCATTATACACATGTTTTCA---TTAGC-ATACA----AACACAAC----A
<i>B. nanus</i> <sup>T</sup>	CAAGTAAAACTTGCAAGCAACCTTGCCAGC-TCCGCCATACACGTGAGTAATTA----C
<i>B. naardenensis</i> <sup>T</sup>	GAAGATAATTGGACGTTTTTCATTTTTGTGACG-TCCCAAAAAACAC-TTTAAATC----T
<i>D. brux.</i> St. 374	CCCGTGCAGA--CACGTGGATAAGCAA-----GGATAAAAAATACATTAAATTT-----
<i>D. brux.</i> St. 566	CCCGTGCAGA--CACGTGGATAAGCAA-----GGATAAAAAATACATTAAATTT-----
<i>D. brux.</i> St. 568	CCCGTGCAGA--CACGTGGATAAGCAA-----GGATAAAAAATACATTAAATTT-----
<i>D. brux.</i> St. 567	CCCGGGCAGA--CACGTGGATAAGCAA-----GGATAAAAAATACATTAAATTT-----
<i>D. brux.</i> St. 573	CCCGTGCAGA--CACGTGGATAAGCAA-----GGATAAAAAATACATTAAATTT-----
<i>D. brux.</i> St. 579	CCCGTGCAGA--CACGTGGATAAGCAA-----GGATAAAAAATACATTAAATTT-----
<i>D. bruxellensis</i> <sup>T</sup>	CCCGTGCAGA--CACGTGGATAAGCAA-----GGATAAAAAATACATTAAATTT-----
<i>D. anomala</i> <sup>T</sup>	CCCGTGCAGAAACACATGTATGAGGAAATTTATAGGGAGAAATCCATATAAAACACGCAAA
<i>S. cerevisiae</i>	CCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAAATTTTTGTCAAACAAGAA
	* * * *
	11111111110011111111111111111111110000001110111111000011111111100000
<i>B. custersianus</i> <sup>T</sup>	AACCAAAATTTATCAACA---CTTTA---TTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC
<i>B. nanus</i> <sup>T</sup>	AAACAGTACCTGTCAACAT-ACGAAA---TCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC
<i>B. naardenensis</i> <sup>T</sup>	ATATTTTAT-TGTCGAAATTCAAAAAGTTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC
<i>D. brux.</i> St. 374	ATTTAGTTT-AGTCAAGAAAG---AAT-TTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC
<i>D. brux.</i> St. 566	ATTTAGTTT-AGTCAAGAAAG---AAT-TTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC
<i>D. brux.</i> St. 568	ATTTAGTTT-AGTCAAGAAAG---AAT-TTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC
<i>D. brux.</i> St. 567	ATTTAGTTT-AGTCAAGAAAG---AAT-TTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC
<i>D. brux.</i> St. 573	ATTTAGTTT-AGTCAAGAAAG---AAT-TTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC
<i>D. brux.</i> St. 579	ATTTAGTTT-AGTCAAGAAAG---AAT-TTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC
<i>D. bruxellensis</i> <sup>T</sup>	ATTTAGTTT-AGTCAAGAAAG---AAT-TTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC
<i>D. anomala</i> <sup>T</sup>	ATATATTTT-AGTCAAAATAATGAAAA-TTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC
<i>S. cerevisiae</i>	TTTTTCGTAACGGAAATTTTA--AAATATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC
	* * * * *
	111111111011111111110000001100011111111111111111111111111111111111
<i>B. custersianus</i> <sup>T</sup>	TGCGTTCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATAACTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA
<i>B. nanus</i> <sup>T</sup>	TGCGATCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATAACTAATGTGAATTGCAGATTTT-GTGA
<i>B. naardenensis</i> <sup>T</sup>	TGCGATCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATAACTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA
<i>D. brux.</i> St. 374	TGCGTTCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATACTTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA
<i>D. brux.</i> St. 566	TGCGTTCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATACTTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA
<i>D. brux.</i> St. 568	TGCGTTCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATACTTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA
<i>D. brux.</i> St. 567	TGCGTTCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATACTTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA
<i>D. brux.</i> St. 573	TGCGTTCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATACTTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA
<i>D. brux.</i> St. 579	TGCGTTCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATACTTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA
<i>D. bruxellensis</i> <sup>T</sup>	TGCGTTCGATGAAGAGCGCAGCGAATTGCGATACTTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA

















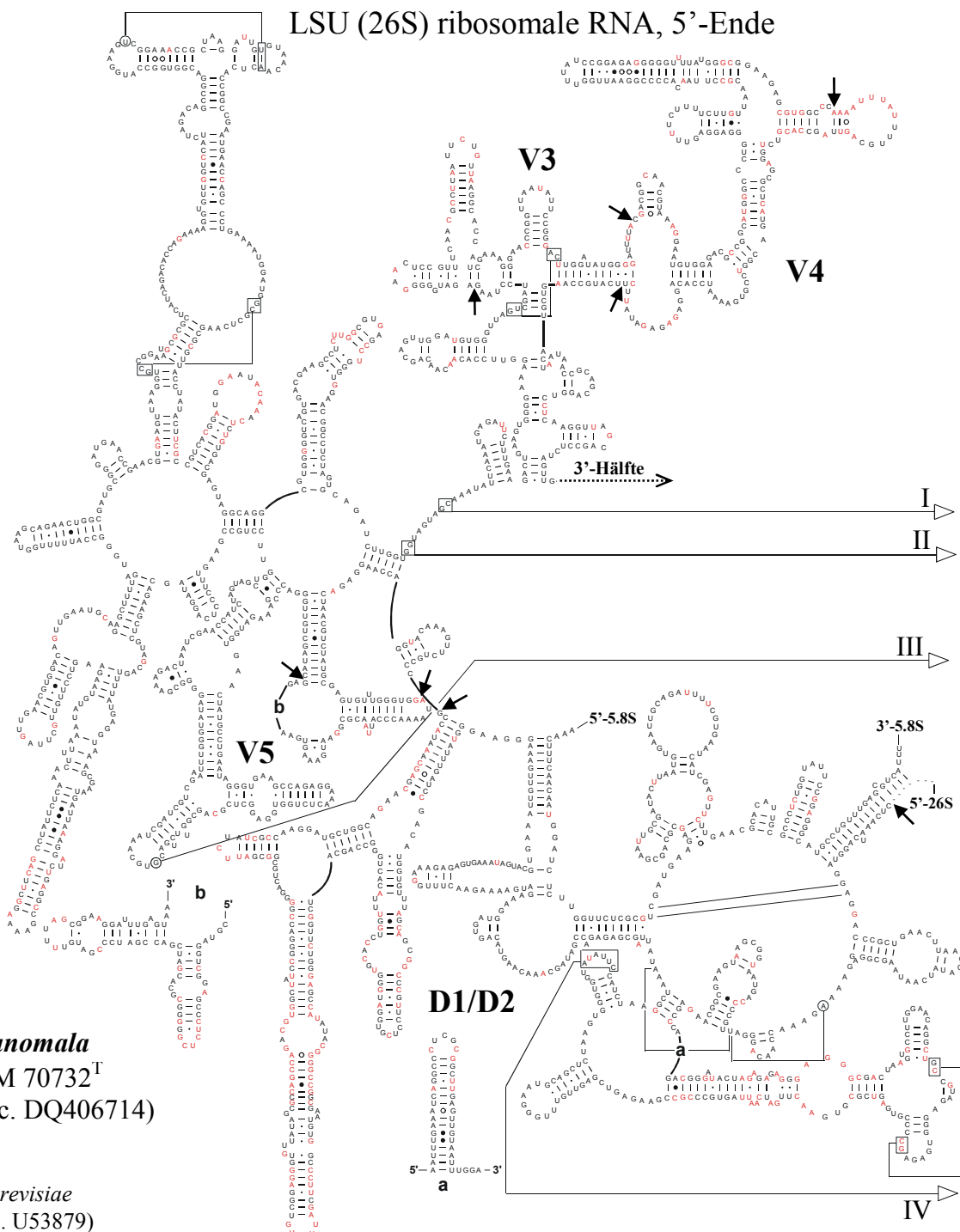




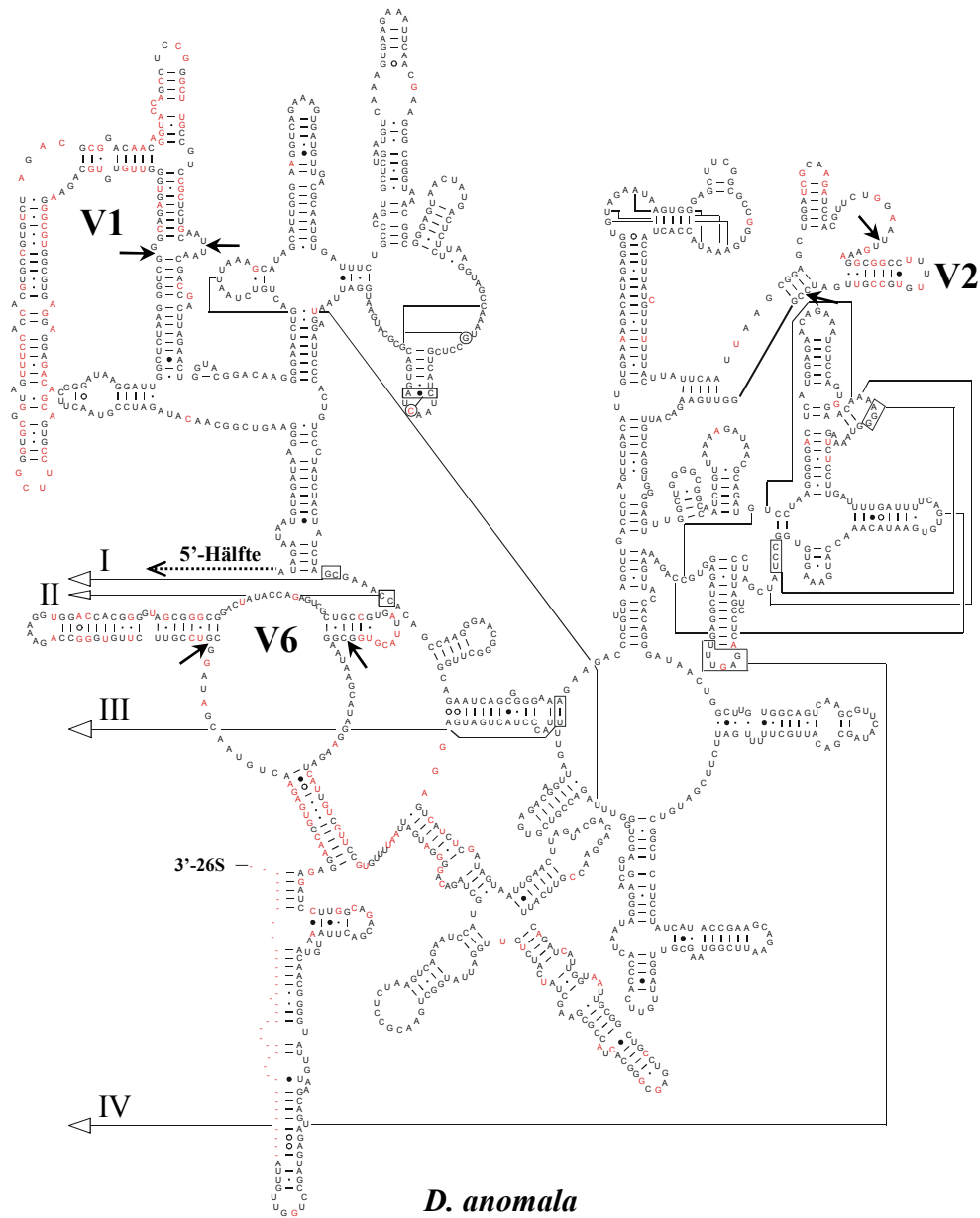


## 8.2 Sekundärstrukturen der 26S rRNAs

Neu generierte 26S rRNA-Sekundärstrukturen von *Brettanomyces/Dekkera* spec. auf Basis von *S. cerevisiae* (Acc. U53879, Gutell 1993, <http://www.rna.cccb.utexas.edu/>). Die 5'-Enden der Strukturen sind mit den 5.8S rRNAs assoziiert. Intramolekulare Wechselwirkungen (Tertiärstruktur) sind durch schwarze Linien dargestellt. Rot-markierten Basen unterscheiden sich von den Sequenzen der jeweiligen Vorgänger-Strukturen (vs). Die D1/D2-Region und die variablen Bereiche (V1-V6) sind eingezeichnet (kurze Pfeile).



## Sekundärstruktur: LSU (26S) ribosomale RNA, 3'-Ende

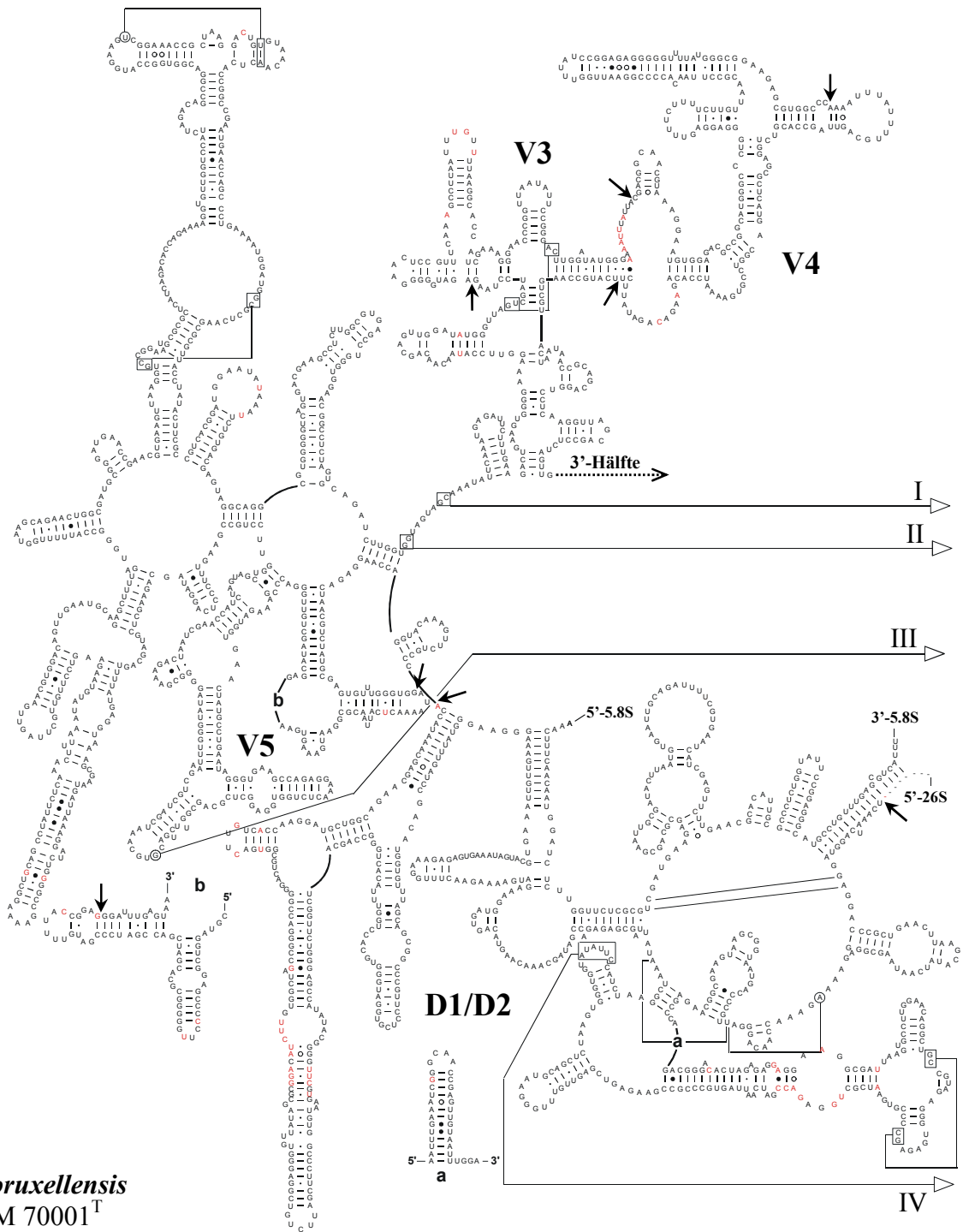


*D. anomala*  
DSM 70732<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406714)

vs

*S. cerevisiae*  
(Acc. U53879)

## Sekundärstruktur: LSU (26S) ribosomale RNA, 5'-Ende

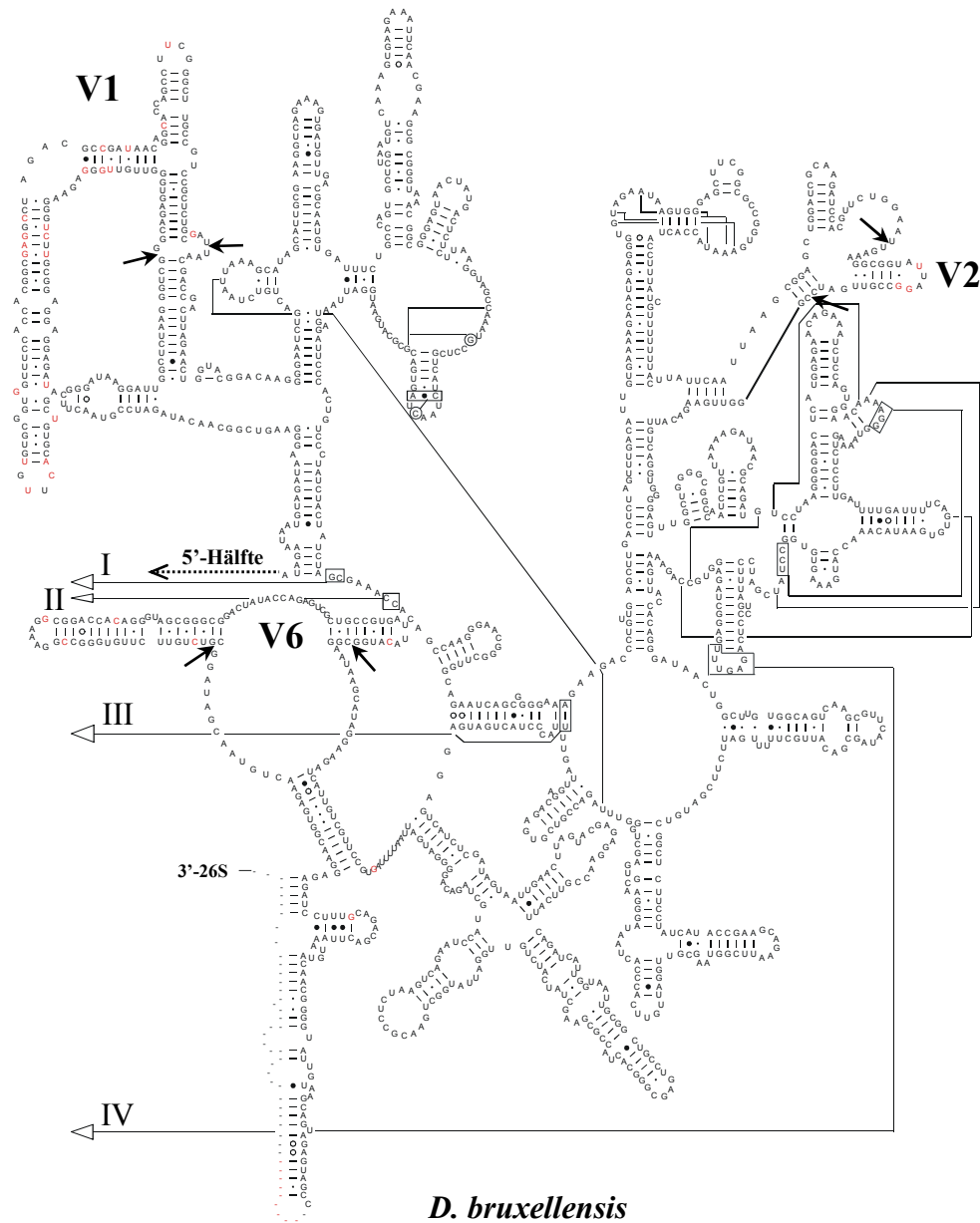


*D. bruxellensis*  
DSM 70001<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406715)

VS

*D. anomala*  
DSM 70732<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406714)

## Sekundärstruktur: LSU (26S) ribosomale RNA, 3'-Ende



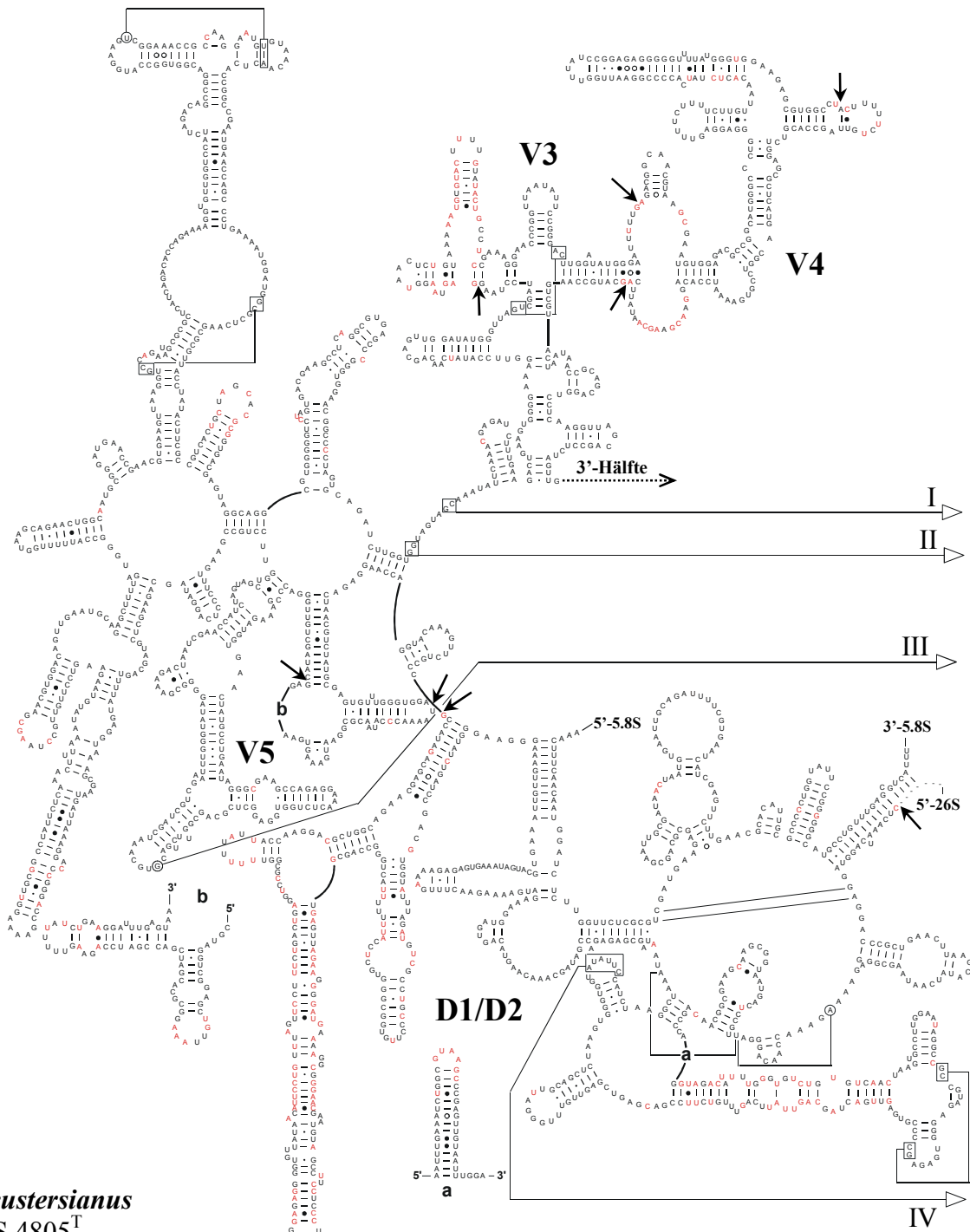
*D. bruxellensis*  
DSM 70001<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406715)

vs

*D. anomala*  
DSM 70732<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406714)



## Sekundärstruktur: LSU (26S) ribosomale RNA, 5'-Ende

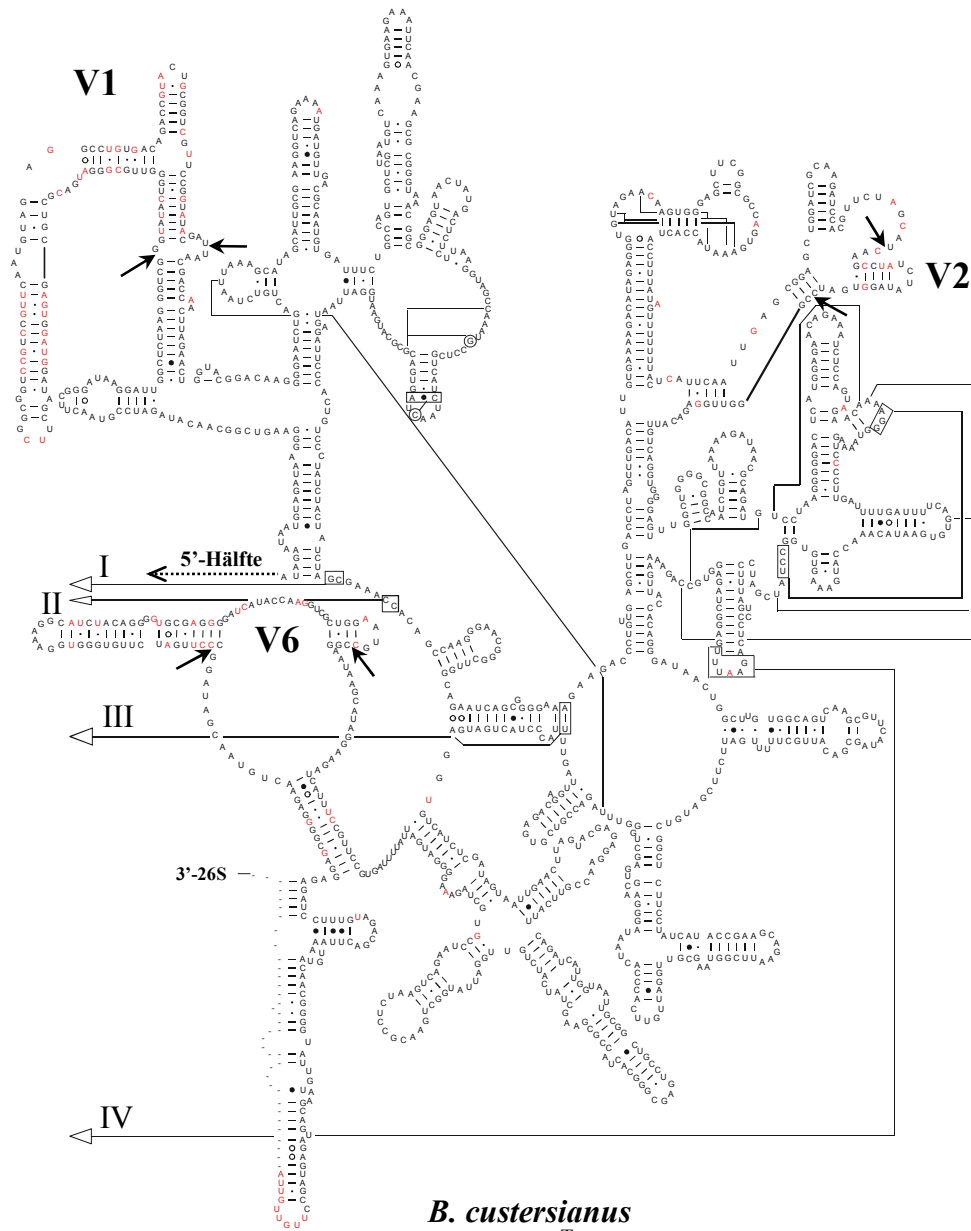


*B. custersianus*  
CBS 4805<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406717)

vs

*D. bruxellensis*  
DSM 70001<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406715)

## Sekundärstruktur: LSU (26S) ribosomale RNA, 3'-Ende

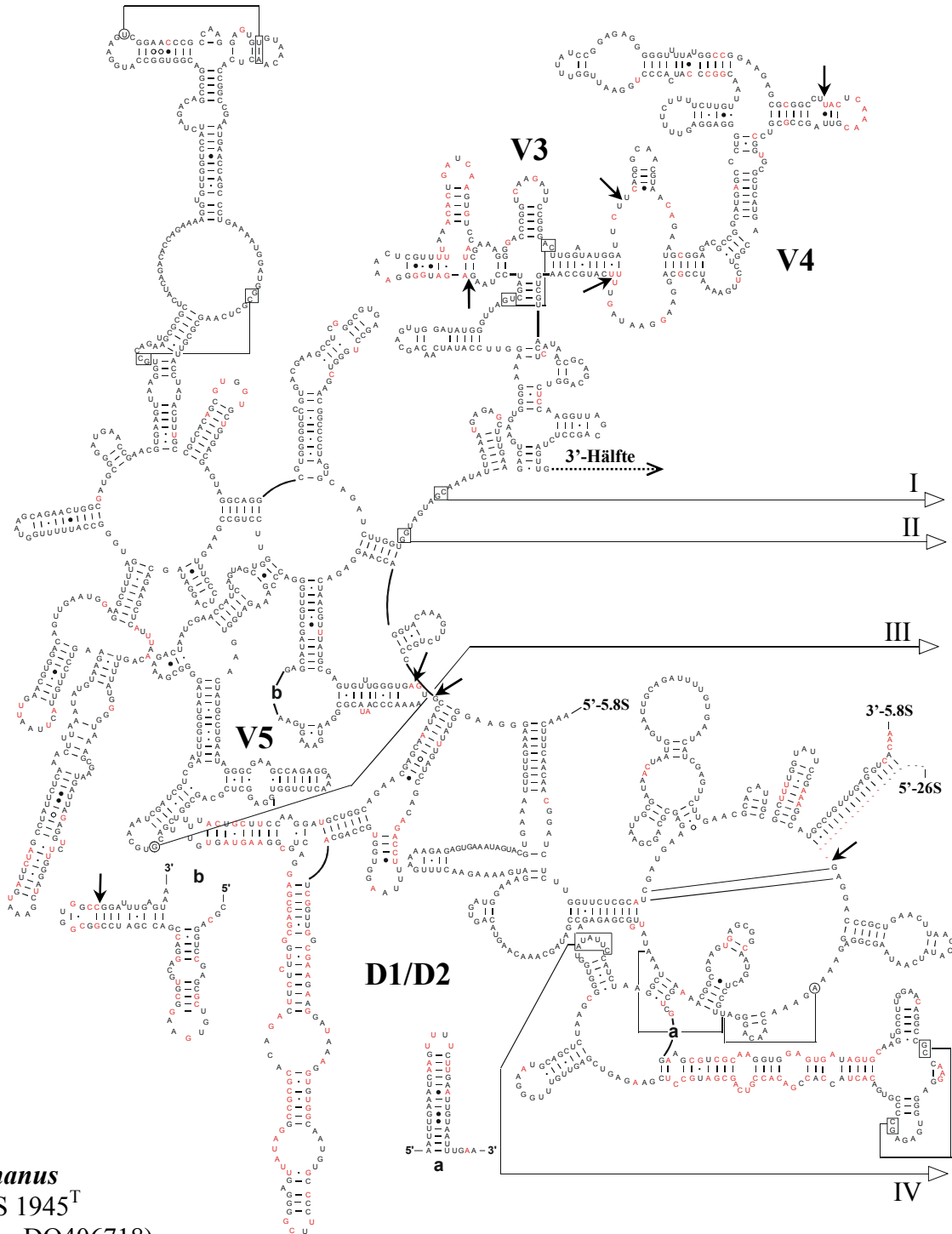


*B. custersianus*  
CBS 4805<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406717)

vs

*D. bruxellensis*  
DSM 70001<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406715)

Sekundärstruktur: LSU (26S) ribosomale RNA, 5'-Ende

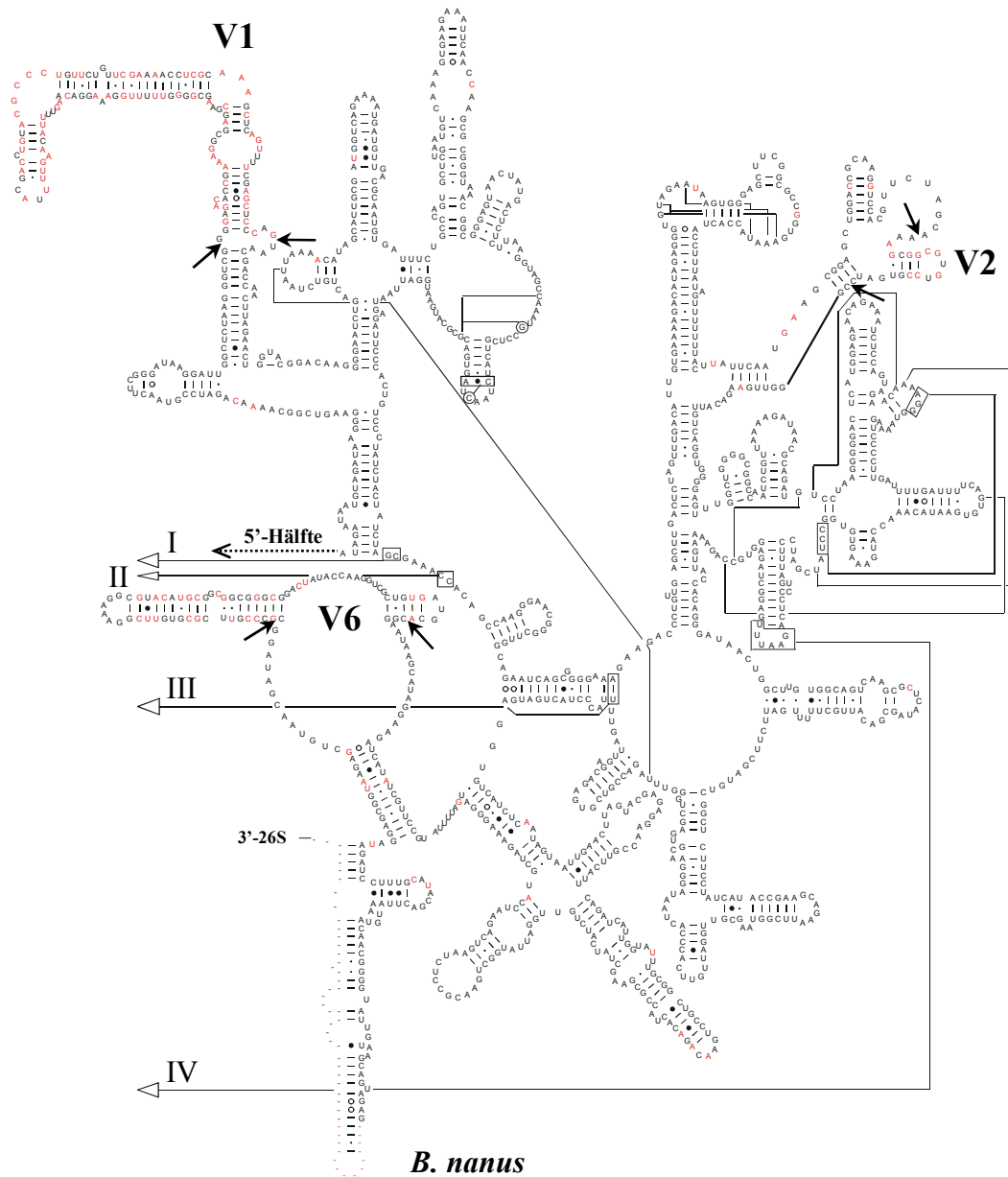


*B. nanus*  
CBS 1945<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406718)

vs

*B. custersianus*  
CBS 4805<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406717)

## Sekundärstruktur: LSU (26S) ribosomale RNA, 3'-Ende

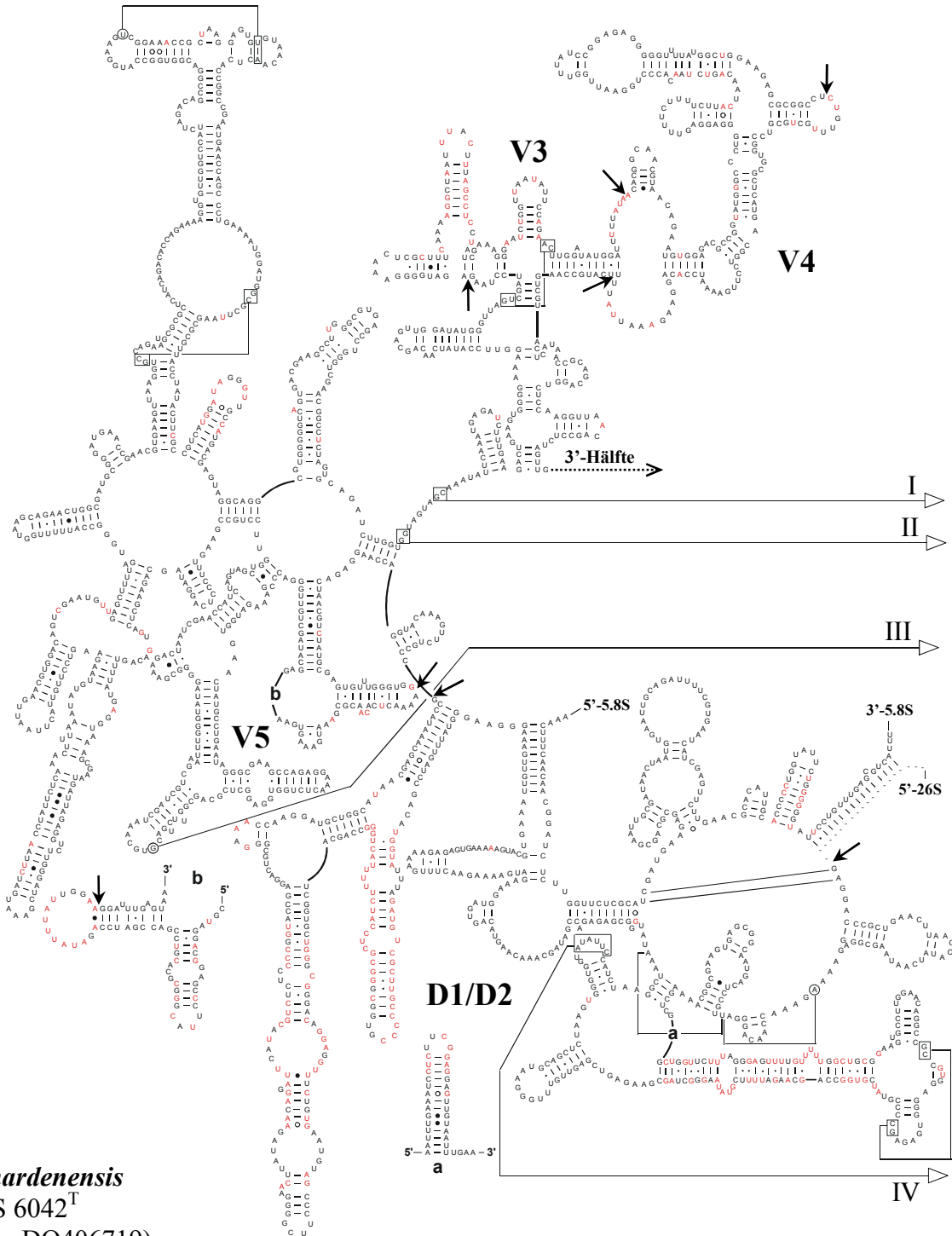


*B. nanus*  
CBS 1945<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406718)

vs

*B. custersianus*  
CBS 4805<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406717)

Sekundärstruktur: LSU (26S) ribosomale RNA, 5'-Ende

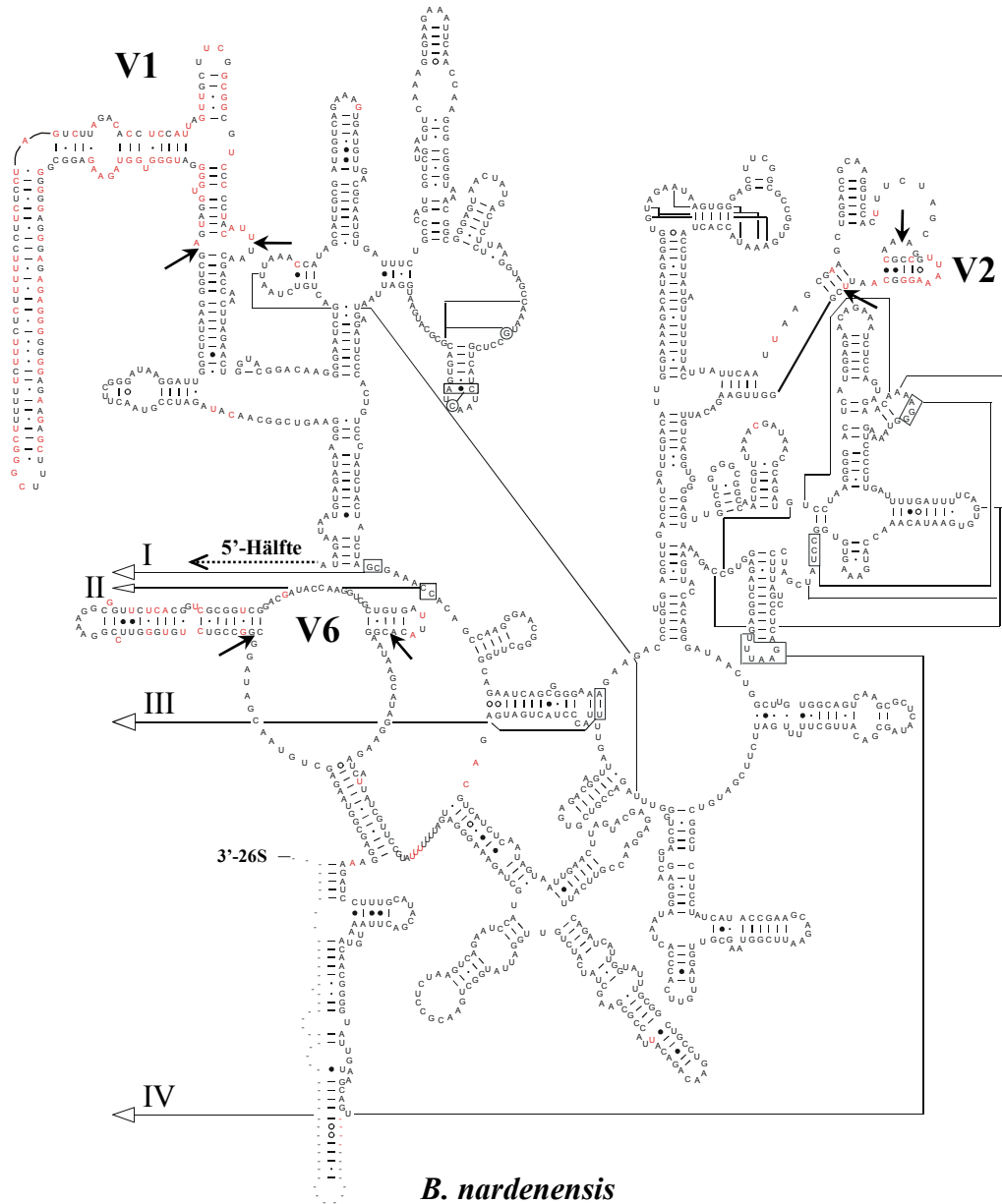


*B. nardenensis*  
CBS 6042<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406719)

vs

*B. nanus*  
CBS 1945<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406718)

## Sekundärstruktur: LSU (26S) ribosomale RNA, 3'-Ende



*B. nardenensis*  
CBS 6042<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406719)

vs

*B. nanus*  
CBS 1945<sup>T</sup>  
(Acc. DQ406718)

### 8.3 Biolog YT MicroPlate™ Mikrotiterplatten-Test

Die Mikrotiterplatten (Biolog, Hayward, USA) wurden bei 30 °C inkubiert und nach 72 h die Extinktionen photometrisch bei 620 nm gemessen. In der Tabelle 17 sind die im Test verwendeten Substrate bzw. Substratkombinationen und die Ergebnisse, auf denen die graphischen Darstellungen (Abb. 36, 38) basieren, dargestellt. Die hier aufgeführten Ergebnisse stellen die Differenzen zwischen den Messwerten nach 72 h und den Anfangsmesswerten (T = 0 h), jeweils bereinigt um die Messwerte der Kontrollansätze (Wasser), dar. Negative Ergebnisse wurden als 0 definiert.

**Tab. 17.** Ergebnisse des Biolog YT MicroPlate™ Mikrotiterplatten-Tests für die Typstämme (T)

Test <sup>a</sup>	Substrat	<i>D. anomala</i> <sup>T</sup>	<i>D. bruxellensis</i> <sup>T</sup>	<i>B. custersianus</i> <sup>T</sup>	<i>B. nanus</i> <sup>T</sup>	<i>B. naardenensis</i> <sup>T</sup>
1.	Wasser	0	0	0	0	0,199
2.	Cellobiose	0,175	0	0	0	0,304
3.	N-Acetyl-D-Glucosamin	0	0	0	0	0,418
4.	Acetat	0	0	0	0	0
5.	Gentiobiose	0,137	0	0	0	0,337
6.	α-D-Glucose	0,58	0,183	0,989	0,11	0,813
7.	Formiat	0	0	0	0	0
8.	Maltose	0,171	0,12	0	0	0
9.	D-Galactose	0,086	0	0	0,105	0,199
10.	Propionat	0	0	0	0	0
11.	Maltotriose	0,079	0,11	0	0	0
12.	D-Psicose	0	0	0,101	0	0
13.	Succinat	0	0	0	0	0
14.	D-Melezitose	0	0,087	0	0	0
15.	L-Sorbose	0	0	0	0	0
16.	Methyl-Succinat	0	0	0,109	0	0
17.	D-Melibiose	0	0	0	0	0
18.	Salicin	0,179	0	0	0	0
19.	L-Aspartat	0	0	0	0	0
20.	Palatinose	0,274	0,096	0	0	0
21.	D-Mannitol	0	0	0	0	0
22.	L-Glutamat	0	0	0	0	0
23.	D-Raffinose	0	0	0	0	0
24.	D-Sorbitol	0	0	0	0	0
25.	L-Prolin	0	0	0	0	0
26.	Stachyose	0	0	0	0	0
27.	D-Arabitol	0	0	0	0	0,104
28.	D-Gluconat	0	0	0	0	0
29.	Sucrose	0,387	0,185	0	0	0
30.	Xylitol	0	0	0	0	0,16
31.	Dextrin	0	0	0	0	0
32.	D-Trehalose	0	0,122	0,399	0	0,179
33.	Glycerin	0	0	0,16	0	0
34.	Inulin	0	0	0	0	0
35.	Turanose	0,197	0,148	0	0	0

Tab. 17. Fortsetzung

Test <sup>a</sup>	Substrat	<i>D. anomala</i> <sup>T</sup>	<i>D. bruxellensis</i> <sup>T</sup>	<i>B. custersianus</i> <sup>T</sup>	<i>B. nanus</i> <sup>T</sup>	<i>B. naardenensis</i> <sup>T</sup>
36.	Tween 80	0	0	0	0	0
37.	Wasser	0,12	0,175	0,226	0,076	0,202
38.	Cellobiose	0,522	0	0	0,27	0,199
39.	N-Acetyl- D-Glucosamin	0,222	0	0	0	0,244
40.	Malitol	0,261	0,419	0	0	0
41.	D-Xylose	0	0	0	0	0,156
42.	Fumarat	0	0	0	0	0
43.	Gentiobiose	0,51	0	0	0,241	0,19
44.	D-Glucosamin	0	0	0	0	0
45.	D-Mannitol	0	0	0	0,178	0,121
46.	Methyl-Succinat + D-Xylose	0	0	0	0	0
47.	L-Malat	0	0	0	0	0
48.	Maltose	0,463	0,494	0	0,197	0
49.	$\alpha$ -D-Glucose	0,526	0,554	0,507	0	0,527
50.	D-Sorbitol	0	0	0	0,151	0,094
51.	N-Acetyl- L-Glutamat + D-Xylose	0	0	0	0	0,126
52.	Methyl-Succinat	0	0	0	0	0
53.	Maltotriose	0,464	0,501	0	0	0
54.	D-Galactose	0,256	0	0	0,253	0
55.	Adonitol	0	0	0	0,149	0
56.	Chinasäure + D-Xylose	0	0	0	0	0,155
57.	Brom-Succinat	0	0	0	0	0
58.	D-Melezitose	0,555	0,527	0	0	0
59.	D-Psicose	0	0	0	0,276	0
60.	D-Arabitol	0	0,111	0	0,147	0
61.	D-Glucuronat + D-Xylose	0	0	0	0	0,161
62.	L-Glutamat	0	0	0	0	0
63.	D-Melibiose	0	0	0	0	0
64.	L-Rhamnose	0	0	0	0,257	0
65.	Xylitol	0	0	0	0,09	0,098
66.	Dextrin + D-Xylose	0	0	0	0,075	0
67.	$\gamma$ -Amino-Butyrat	0	0	0	0	0
68.	Palatinose	0,457	0,481	0	0	0
69.	L-Sorbose	0	0	0	0	0
70.	Erythritol	0	0	0	0,163	0
71.	$\alpha$ -D-Lactose + D-Xylose	0,524	0	0	0	0,174
72.	$\alpha$ -Ketoglutarat	0	0	0	0	0
73.	D-Raffinose	0	0	0	0	0
74.	$\alpha$ -Methyl- D-Glucosid	0,313	0,425	0	0,188	0
75.	Glycerin	0	0	0	0	0
76.	D-Melibiose + D-Xylose	0	0	0	0	0,164
77.	2-Keto- D-Gluconat	0	0	0	0	0
78.	Stachyose	0	0	0	0	0



Tab. 17. Fortsetzung

Test <sup>a</sup>	Substrat	<i>D. anomala</i> <sup>T</sup>	<i>D. bruxellensis</i> <sup>T</sup>	<i>B. custersianus</i> <sup>T</sup>	<i>B. nanus</i> <sup>T</sup>	<i>B. naardenensis</i> <sup>T</sup>
79.	β-Methyl-D-Glucosid	0,354	0	0	0	0
80.	Tween 80	0	0	0	0	0
81.	D-Galactose + D-Xylose	0,249	0	0	0,086	0,201
82.	D-Gluconat	0	0	0	0	0
83.	Sucrose	0,555	0,531	0	0	0
84.	Amygdalin	0,123	0	0,095	0	0,184
85.	L-Arabinose	0	0	0	0	0
86.	m-Inositol + D-Xylose	0	0	0	0	0,216
87.	Dextrin	0	0	0	0	0
88.	D-Trehalose	0,519	0,542	0,281	0	0,206
89.	Arbutin	0,255	0	0	0,177	0
90.	D-Arabinose	0	0	0	0	0
91.	1,2 Propandiol + D-Xylose	0	0	0	0,232	0,187
92.	Inulin	0	0	0	0	0
93.	Turanose	0,509	0,501	0	0	0
94.	Salicin	0,27	0	0	0	0
95.	D-Ribose	0	0	0	0	0
96.	Acetoin + D-Xylose	0	0	0	0	0,21

<sup>a</sup> Die Tests 1-36 enthalten Tetrazolium-Violett als kolorimetrischen Indikator für die Oxidation.

## 8.4 Mikroskopische Bestimmung der Zelltiter

$$\text{Formel zur Zellzahl-Abschätzung: } c \text{ [Zellen/ml]} = \frac{\pi \times F \times Z \times r^2 \times V^2}{0,1 \times L \times K^2}$$

- F      Verdünnungs- bzw. Konzentrierungsfaktor  
 Z      gezählte Zellen des gesamten Zählrasters  
 r      Radius der Objektträger-Felder (2,5 mm)  
 V      Gesamtvergrößerung (400x)  
 L      auf Objektträger-Feld aufgetragenes Aliquot (5 µl)  
 K      Kantenlänge des Zählrasters im Okular (12,5 mm)