

**Entwicklung und Anwendung einer neuartigen Methode zur
Identifizierung von Back- und Brauhefen mittels
MALDI-TOF-MS und der multivariaten Datenanalyse**

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Jana H. Becke (geb. Gierds)
geb. in Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitz: Prof. Dr. Eckhard Flöter
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Lothar Kroh
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hajo Haase
Gutachter: Dr. rer. nat. Diedrich Harms

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 03. Juli 2018

Berlin 2018

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit entstand an der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V. im Rahmen des AIF-ZIM-Kooperationsprojektes *„Entwicklung eines Präparationskits in Kombination eines innovativen Verfahrens zur Hefecharakterisierung mit Hilfe der MALDI-TOF-MS zur Sicherstellung optimaler Produktionsabläufe in Betrieben der Brau- und Backhefeindustrie“* (KF2132320 SK1). Das Projekt wurde durch die Förderung der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AiF) ermöglicht.

Für die Brau- und Backwarenindustrie sind die Hefearten *S. cerevisiae* und *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) essentielle Mikroorganismen für die Herstellung von Bier- und Backwaren.

Zur Erstellung spezifischer Protein-Fingerprints werden häufig die ribosomalen Hefeproteine untersucht. Sie werden konstitutiv exprimiert und eignen sich daher gut für die Analytik [131].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist deshalb eine chemische Probenaufarbeitungsmethode entwickelt worden, mit der innerhalb von 25 Minuten Hefeproteine extrahiert werden und an der MALDI-TOF-MS gemessen werden können. Iterativ sind verschiedene Targets, Matrices sowie unterschiedliche Lösungsmittel- und Analyten-Verhältnisse getestet worden. In Kombination mit der entwickelten Probenaufarbeitung und der verwendeten Matrix α -Cyano-4-hydroxymethylsäure wird das Probenmaterial im reverse thin layer Verfahren auf ein hochpoliertes Stahltarget aufgetragen. In einer notwendigen Adaption und Weiterentwicklung bereits etablierter diagnostischer Methoden wurden die Parameter an dem MALDI-TOF-MS angepasst. Die Messungen am MALDI-TOF-MS sind im positiven linearen Modus mit einem Nd/YAG Laser im Massenbereich von 2000,36-12999,34 Da durchgeführt worden.

Durch die Kombination der mathematischen Verfahren PCA und SIMCA konnten die Protein-Fingerprints, der 11 Kulturhefestämme der Arten *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* sowie der Fremdhefen *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens*, für eine Differenzierung der verschiedenen Wachstumsstadien eines Hefestammes genutzt werden.

In Abhängigkeit von dem eingesetzten Nährmedium ist eine Differenzierung der Hefearten *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* auf Stammebene möglich gewesen. Auf Artebene war eine vollständige Differenzierung sowohl im SD-Medium und den Vollmedien möglich.

Anhand spezifischer Protein-Fingerprints der Art *S. cerevisiae* konnten in weiteren Versuchen die beiden Prozessstufen der Stell- und Versandhefefermentation differenziert werden. Ebenfalls war eine Differenzierung der unterschiedlichen Erntehefen verschiedener Fermentationszyklen der Art *S. pastorianus* (ssp. *carlsbergensis*) möglich. Zur Überprüfung der Forschungsergebnisse wurde die etablierte molekularbiologische PCR-Methode mit spezifischen $\delta 12/\delta 21$ -Primern angewendet.

ABSTRACT

For the brewing and bakery industry, the yeast species *S. cerevisiae* and *S. pastorianus* (*ssp. S. carlsbergensis*) are essential microorganisms in the production process.

For creating specific protein fingerprints, the ribosomal yeast proteins are often investigated. They are constitutively expressed and are therefore well suited for analysis [131].

In the present work, a chemical sample processing method for extracting yeast proteins within 25 minutes has been developed allowing measurement by MALDI-TOF-MS.

Iteratively, various targets, matrices and different solvent and analyte ratios have been tested. In combination with the developed sample preparation and the used matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid the sample material is applied on a highly polished steel target in the reverse thin layer process. In a necessary adaptation and further development of already established diagnostic methods, the parameters of the MALDI-TOF-MS were adapted. The measurements on the MALDI-TOF-MS were carried out in the positive linear mode with a Nd/YAG laser in the mass range of 2000.36-12999.34 Da.

By combining the mathematical methods PCA and SIMCA, the protein fingerprints of the 11 strains of *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* and the foreign yeasts *S. diastaticus* and *Pichia membranifaciens* could be used to differentiate the different growth stages of a yeast strain.

Depending on the nutrient medium used, successful differentiation of the yeast species *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus* and *Pichia membranifaciens* has been possible at the strain level. At the species level, complete differentiation was possible in both synthetic defined media and full media.

On the basis of specific protein fingerprints of the species *S. cerevisiae*, the two process stages of Stellhefefermentation and Versandhefefermentation could be differentiated in further experiments. It was also possible to differentiate the different harvest yeast samples of the various fermentation cycles of the species *S. pastorianus* (*ssp. carlsbergensis*). To verify the research results, the established molecular biology PCR method with specific $\delta 12/\delta 21$ primers was applied.

Danksagung

Ich möchte mich zunächst in aller Form bei Herrn Dr. Diedrich Harms für die Überlassung des sehr interessanten Themas bedanken. Seine engagierte Betreuung, die fachlichen Diskussionen und Anregungen tragen maßgeblich zur Realisierung der Dissertation bei. Ich danke Ihm für das stets entgegengebrachte Vertrauen und die damit verbundene Möglichkeit die Arbeit selbständig durchführen zu können.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Lothar W. Kroh für die gute Betreuung während der Ausarbeitung dieser Dissertation sowie den motivierenden Worten die dazu beitrugen diese Arbeit zum Abschluss zu bringen.

Ebenfalls gilt mein Dank den ehemaligen Kollegen/innen des Fachgebietes Bioprozesstechnik und Angewandte Mikrobiologie (BEAM) der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei (VLB) e.V. für die Bereitstellung der Hefestämme und dem wissenschaftlichen Austausch.

Herrn Dr. Michael Quantz und Herrn Dr. Erik Pollmann von der Versuchsanstalt der Hefeindustrie e.V. danke ich für die fachliche und konstruktive Auseinandersetzung mit dem wissenschaftlichen Thema, den zahlreichen Anzuchten der Backhefen und den gemeinsamen Nachtschichten, um die Hefen zu ernten.

Den Kollegen/innen der Firma NovaBiotec Dr. Fechter GmbH, im Besonderen Christina Quandt, danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung des Testkits und dem wissenschaftlichen Austausch.

Ebenfalls gilt mein persönlicher Dank Herrn Dr. Nils Rettberg, F. Pukownick und S. Zimmermann von der VLB Berlin, die mich auch nach meinem Ortswechsel noch unterstützten.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meinem Mann Markus Becke für seine Geduld und die liebevolle Unterstützung bedanken. Danke an meine Eltern und meinen Bruder die stets an mich glauben, mich in allem unterstützten und mir Kraft spenden.

- Für Mama -

Zeitschriftenbeiträge

Becke, J. H., Harms, D. (2016). Using MALDI-TOF-MS to classify yeasts of interest to brewers. *Brauwelt International*, Vol. 34, 312-315.

Gierds, J. H., Harms, D. (2014). Klassifizierung brauereirelevanter Hefen mittels MALDI-TOF-MS. *Brauwelt*, 41-42/14, 1218-1221.

Gierds, J. H., Harms, D. (2014). Identification of baker's and brewer's yeasts using MALDI-TOF MS. *International VLB Edition*, No 5 (I/2014).

Gierds, J. H., Harms, D. (2013). Back- und Brauhefen - Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 12, 631-635.

Gierds, J. H., Harms, D. (2012). Moderne Ansätze der Hefeidentifizierung in der Brau- und Backindustrie. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 12, 640-643.

Poster

Gierds, J.H., Quandt, C., Cöllü, I., Pollmann, E., Harms, D.:

“Identification of yeast strains by MALDI-TOF-MS”

35th Congress EBC–European Brewery Convention, Porto/PT, 24-28. May 2015.

Gierds, J.H., Quandt, C., Cöllü, I., Pollmann, E., Harms, D.:

“Identification of Brewer's strains by MALDI-TOF-MS”

4th International Young Scientists Symposium on Malting, Brewing and Distilling, Ghent/B, 28-30. Oktober 2014.

Gierds, J., Baki, I., Quandt, C., Pollmann, E., Bader, J., Folz, R., Harms, D.:

“IDENTIFICATION OF YEAST BY MALDI-TOF MS”

World Brewing Congress, Portland/USA, 28.07.-01. August 2012.

Tagungsbeiträge

Gierds, J. H., Cöllü, I.:

„Hefe-Identifizierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie“

101. Oktobertagung VLB, Berlin/D, 29-30. September 2014.

Pollmann, E., Gierds, J.:

“Yeast identification by MALDI-TOF MS”

26th VH Yeast Conference, Istanbul/T, 14-15. April 2014.

Pollmann, E., Quandt, C., Gierds, J., Baki, I.:

“Yeast identification by MALDI-TOF MS”

26th VH Yeast Conference, Berlin/D, 15-16. April 2013.

Pollmann, E., Quandt, C., Gierds, J.:

“Yeast strain identification with MALDI-TOF MS”

25th VH Yeast Conference, Hamburg/D, 23-24. April 2012.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1 MALDI-TOF-MS.....	3
2.1.1 Mechanismus des MALDI-TOF-MS	4
2.2 Hefen.....	9
2.3 Hefen in der Brauerei	10
2.3.1 Taxonomie der Brauhefen	10
2.3.2 Hefepropagation	12
2.4 Backhefen	14
2.4.1 Melasse	15
2.4.2 Fermentation.....	16
2.4.3 Proteinzusammensetzung der <i>Saccharomyces</i> -Hefen	17
2.5 Multivariate Datenanalyse	19
2.5.1 Vorverarbeitung der Massenspektren	20
2.5.2 Hauptkomponentenanalyse	21
2.5.3 Soft Independent Modelling of Class Analogy SIMCA	25
2.6 Stand der Wissenschaft.....	27
2.6.1 Traditionelle und molekularbiologische Verfahren	27
2.6.2 Moderne Analysenansätze zur Identifizierung von Hefen	29
2.7 Forschungsziel	32
3. Material und Methoden	34
3.1 Material.....	34
3.1.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen	34
3.2 Hefestämme	36
3.3 Nährmedien und Anzucht der Hefestämme.....	37
3.3.1 Nährmedien	37
3.3.2 Anzucht der Hefekulturen im Labor.....	39
3.3.3 Stell- und Versandhefefermentation.....	40
3.3.4 Hefepropagation in der Brauerei	40
3.4 Gesamtzellzahlbestimmung mittels NucleoCounter®YC-100™	41
3.5 Aufbereitung der Hefezellen – Proteinextraktion	41

INHALTSVERZEICHNIS

3.5.1	Proteinextraktion der Laborhefekulturen	41
3.5.2	Proteinextraktion aus Praxisproben	42
3.6	Proteinbestimmung nach Bradford	42
3.7	MALDI-TOF-MS Analyse	43
3.7.1	Kalibrierung des MALDI-TOF-MS-Systems	43
3.7.2	Matrix- und Präparationsmethode	43
3.7.3	Aufnahme der Massenspektren	44
3.8	Auswertung der MALDI-TOF-MS-Spektren	45
3.8.1	Datenvorbehandlung	45
3.8.2	SIMCA	46
3.9	Molekularbiologische Referenzanalytik	47
3.9.1	Sequenzierung mittels ITS-Primern	47
3.9.2	genetische Fingerprint δ 12/21-Primer	47
4.	Ergebnisse und Diskussion	49
4.1	Methodenentwicklung	49
4.1.1	Target- und Matrixauswahl	50
4.1.2	Proteinextraktionsmethode	60
4.1.3	Bewertung der Inaktivierung und Destruktion	67
4.1.4	Einfluss des Lösungsmittels auf die Matrix	68
4.1.5	Wachstumsphase der Hefestämme	74
4.2	Hauptkomponentenanalyse der Wachstumsphasen	82
4.2.1	Auswertung der Daten im SD-Medium	83
4.2.2	Auswertung der Daten im YED- und YEPD-Medium	93
4.3	SIMCA - soft independent modelling of class analogy	97
4.4	Etablierung und Validierung	99
4.4.1	Zuordnung von Testdaten zum SIMCA-Modell	99
4.4.2	Validierung	112
4.4.3	Referenzanalytik	118
4.5	Praxisproben	122
4.5.1	Backhefefermentation	122
4.5.2	Erntehefe nach Bierfermentation	134
5.	Zusammenfassung	138
6.	Verzeichnisse	143

INHALTSVERZEICHNIS

6.1	Literaturverzeichnis	143
6.2	Abbildungsverzeichnis	156
6.3	Tabellenverzeichnis	162
7.	Anhang	164
7.1	Durchführung der MALDI-TOF-Massenkalibrierung	164
7.2	Reinigung Stahltarget	164
7.3	Geräteeinstellungen am MALDI-TOF MS	165
7.4	FlexControl 3.3.108 AutoXecute-Methodenparameter	165
7.5	Score-Plots SD-Medium	165
7.6	Score Plots YED und YEPD-Medium	147

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
AFLP	amplified fragment length polymorphism
AS	Ameisensäure
AUC	area under curve
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
DHAP	2,6-Dihydroxyacetophenon
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DHW	Deutsches Hefewerk
DNA	desoxyribonucleic acid
E. coli	Escherichia coli
engl.	Englisch
EtOH	Ethanol
FAB-MS	fast atom bombardment mass spectrometry
FTIR	Fourier transformierte Infrarot Spektroskopie
Gew.	Gewicht
Gl.	Gleichung
h	Stunde
HCCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
HCl	Salzsäure
HK	Hauptkultur
H ₂ O	Wasser
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HTS	Hefetrockensubstanz
IGS	intergenic spacer
ITS	internal transcribed spacer
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
lat.	Latein
LD-TOF-MS	laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
MALDI-TOF-MS	matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
<i>MAL</i> -Gen	Mal, T-Zellen Differenzierungs-Protein
max.	Maximal
MCP	micro channel plate

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

min	Minute
Mio.	Million
MIR	Mittleres Infrarot
MLST	multilocus sequence typing
MTP	MALDI target plate
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
N	Probenanzahl
Nd/YAG laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NIPALS	Nonlinear Iterative Partial Least Square
NSF	Nicht- <i>Saccharomyces</i> -Fremdhefe
OS	organic solution
P.	<i>Pichia</i>
p.a.	pro analysis
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-MS	plasma desorption mass spectrometry
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
Rpm	revolutions per minute
RAPD	randomly amplified polymorphic
RFLP	restriction fragment length polymorphism
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
S.	<i>Saccharomyces</i>
S	Sekunde
S/N	signal-to-noise ratio
SA	Sinapinsäure
SD	synthetic defined
SF	<i>Saccharomyces</i> Fremdhefe
SIMCA	soft independent modelling of class analogy
SSR	simple sequence repeats
ssp.	Subspezies
syn.	Synonym
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	time of flight

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TS	Trockensubstanz
ug	Untergärig
var.	Varietät
VH	Versuchsanstalt der Hefeindustrie e.V.
VLB	Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.
YED	yeast extract dextrose
YEPD	yeast extract peptone dextrose

Symbole

X	Datenmatrix
λ	Eigenwert
v	Eigenvektor
T	Gewichts- oder Scorematrix
P^T	transponierte Faktoren- oder Hauptkomponentenmatrix
E	Residualmatrix
m	Masse Ion
z	Anzahl der Ladung
U	Beschleunigungsspannung
s	Wegstrecke
t	Flugzeit

1. Einleitung

Durch Kreuzungen und Züchtungen sind im Laufe der Zeit Hochleistungshefestämme für die Anwendungen spezieller technischer Fragestellungen optimiert worden.

Zur Herstellung von Lebensmitteln können Hefen sowohl nützlich als auch schädlich sein, da sie einen starken Einfluss auf dessen Qualität und Charakteristika haben können. Hefen vermehren sich und setzen die ihnen angebotenen Substrate in kontrollierten biologischen Prozessen zu den gewünschten Produkten um. Von besonderer Bedeutung für eine robuste, industrielle Produktion sind dabei die mikrobiologische Reinheit und physiologische Leistungsfähigkeit der verwendeten Hefestämme. Die Anwesenheit von Fremdhefen kann beispielsweise zu sensorischen Beeinträchtigungen oder Ertragseinbußen führen.

Aus diesen Gründen ist eine schnelle Identifizierung beziehungsweise Differenzierung der Hefen im Spurenbereich wichtig, was aber immer noch eine große Herausforderung darstellt. Durch die unterschiedliche Verteilung der Hefezellen im Produkt und aufgrund der geringen Probenmengen, ist eine gute analytische Identifizierung nur schwer realisierbar [1].

Nicht nur in der Lebensmittelindustrie, sondern auch im klinischen Bereich sind Identifizierungsmethoden notwendig, die eine hohe Empfindlichkeit, Selektivität und kurze Analysezeit aufweisen. Die kontinuierliche Weiterentwicklung der Massenspektrometrie macht es möglich, Proteine und Peptide viel schneller im Vergleich zu den klassischen Analyseverfahren zu untersuchen. Schon seit einigen Jahren wird das MALDI-TOF-MS (*engl.* matrix assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry) aus diesen Gründen in der klinischen Diagnostik angewendet [2, 3].

Für die Brau- und Backhefeindustrie wäre diese Art der schnellen Hefeidentifizierung von großem Interesse. Viele klassische, mikrobiologische Analysemethoden sind aufgrund der zum Teil engen genetischen Verwandtschaft der verschiedenen Hefen oft nicht sensitiv genug, um eine eindeutige Identifizierung zu gewährleisten und somit die Sicherstellung optimaler Produktionsabläufe und Produktqualitäten zu erlauben.

In der Lebensmittelindustrie befassen sich bereits einige Forschungsgruppen mit der Identifizierung von „Bierschädlingen“ [4, 5] sowie der Untersuchung von Weinhefen [6, 7]. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde mit Hilfe der MALDI-TOF-MS die Möglichkeit der schnellen und zuverlässigen Differenzierbarkeit verschiedener Back- und Brauhefen der Gattung *Saccharomyces* untersucht. Dabei wurde berücksichtigt,

1. EINLEITUNG

dass die Probenaufarbeitung mit geringem technischen sowie zeitlichen Aufwand durchgeführt werden soll.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 MALDI-TOF-MS

Die Idee der matrixunterstützten Desorption ist durch eine zufällige Untersuchung eines Gemisches aus Tryptophan und Alanin entstanden.

Zuvor wurde davon ausgegangen, dass bei einer bestimmten Laserleistung nur Tryptophan desorbiert und ionisiert werden könnte, aber beide Aminosäuren wurden bei einer Wellenlänge von 266 nm detektiert [8]. Mit fortschreitender Entwicklung der matrixunterstützten Laserdesorption/ionisation (MALDI)-MS und der Kopplung zur MALDI-TOF-MS durch R. C. Beavis und B. T. Chait [8] erfolgte der Durchbruch dieser Technik.

Ein wichtiger Bestandteil der Forschung war die Entwicklung einer geeigneten Matrix, um kontrolliert die Laserenergie zur Probe zu leiten. Versuche wurden unter anderem mit der FAB-MS (fast atom bombardment mass spectrometry) [9-11], PD-MS (plasma desorption mass spectrometry) [12] und LD-TOF-MS (laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) [13, 14] durchgeführt, jedoch konnten nur mit dem MALDI-MS zufriedenstellende Ergebnisse generiert werden. So zeigten 1988 M. Karas und F. Hillenkamp ihr erstes Proteinspektrum mit einer Masse von über 100 kDa (Abbildung 2-1) [8, 15, 16].

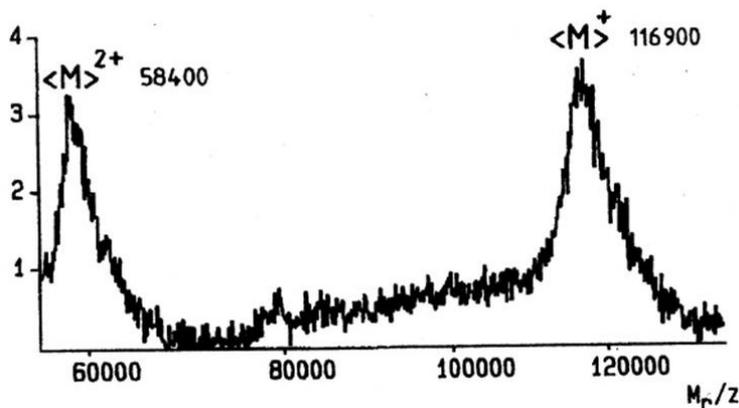


Abbildung 2-1: Spektrum der β -D-Galactosidase; Matrix Nikotinsäure; 100 Laserschüsse [8, 15, 16]

Am 10. Dezember 2002 ging der Nobelpreis für Chemie an J. B. Fenn, K. Tanaka und K. Wüthrich für die Entwicklung schonender Ionisierungsmethoden und ihre Anwendung auf Biomakromoleküle (bovine insulin 5733 Da, cytochrome-C 12384 Da, carboxypeptidase-A 34472 Da) [167] mittels SLD (soft laser desorption). Diese herausragenden Forschungsergebnisse sind Meilensteine in der Entwicklung

der MALDI. Die Kombination aus MALDI und einem Flugzeitmassenspektrometer (*engl.* time of flight TOF) wurde zu einem vielversprechenden Instrument für die Proteomikuntersuchungen [17], da eine einfache Charakterisierung, eine gute Massengenauigkeit und eine hohe Auflösung möglich sind [18].

2.1.1 Mechanismus des MALDI-TOF-MS

Das MALDI-TOF-MS System ist zusammengesetzt aus einer Ionenquelle, dem Massenanalysator und der Detektoreinheit. Die Analyten werden in der Ionenquelle mit einem Laser mobilisiert und ionisiert. Anschließend erfolgen die Beschleunigung der Ionen im elektrischen Feld und die Trennung der geladenen Ionen nach ihrer Flugzeit (Abbildung 2-2).

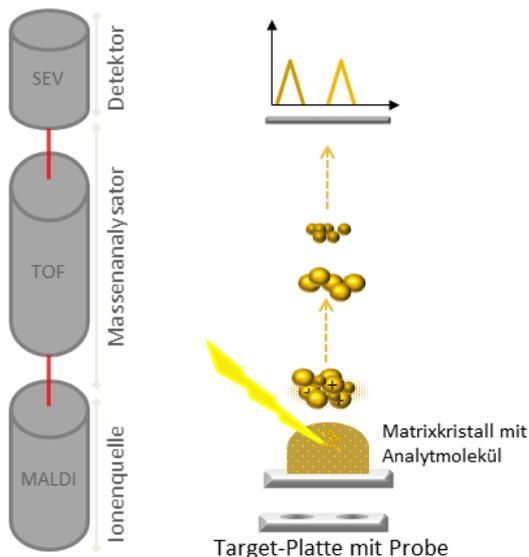


Abbildung 2-2: Schematischer Ablauf der MALDI-TOF-MS

Ionenquelle

Als Ionenquelle dient eine geladene Metallelektrode, die auch als Proben-teller oder Target bezeichnet wird und einer Beschleunigerelektrode. Die zu analysierende Probe wird mit einem 100 bis 10.000-fachen Überschuss einer niedermolekularen, organischen Substanz (Matrix) auf dem Proben-teller (Target) gemischt. Nach der Verdunstung des Lösungsmittels sind die Probenmoleküle in der „Matrix“ eingebettet und bilden einen Co-Kristall. Es sind verschiedene Aufgabetechniken bekannt wie „dried-droplet“ [16, 19] oder „surface“ [20]. Das Target wird in die Ionenquelle eingeschleust und die feste, kristalline Oberfläche im Hochvakuum mit einem

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

gepulsten UV- oder IR-Laser beschossen (Expositionszeiten: 0,5 - 20 ns UV, 5 - 200 ns IR) (Abbildung 2-2) [168-170]. Als UV-Laser finden vor allem der Stickstoff-(337 nm) und der frequenzverdreifachter Neodym: Yttrium-Aluminium-Granat (Nd:YAG, all solid-state, 355 nm)-Laser Verwendung. Nachteilig bei den Stickstoff-Lasern sind die begrenzte maximale Wiederholrate von circa 50 Hz und die damit verbundene kürzere Lebensdauer von 2×10^6 - 6×10^7 Schüssen. Der Nd:YAG Laser hat dagegen im Durchschnitt eine Wiederholrate von 1000 Hz und eine Lebensdauer von 10^9 Schüssen. Im infraroten Wellenlängenbereich sind der CO₂- oder Erbium-YAG (Er:YAG)-Laser bevorzugt. Bei der Verwendung von UV-Lasern werden Matrices mit leicht anregbaren Elektronensystemen eingesetzt. Die Elektronen des aromatischen Systems der Matrix werden resonant angeregt. Dagegen werden bei IR-Lasern Matrixmoleküle eingesetzt, die schwingungsanregbar sind. Es wird davon ausgegangen, dass die Matrixmoleküle durch die Absorption der Laserenergie angeregt, der Festkörperverband zerstört und die Matrixmoleküle desorbiert werden. Die eingebetteten Analytmoleküle werden mitgezogen und ionisiert [21].

Diese kontrollierte Energiezufuhr verläuft pyrolysefrei [22], sodass eine mögliche Fragmentierung der Analytmoleküle verhindert wird. Im Jahr 2008 gelang es Jaskolla et al. [25, 26] den zuvor noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus der Ionisation weiter zu beobachten. Demnach ist die Anzahl an geladenen Ionen von der Protonenaffinität der Matrix und der Überlebensrate der Analytionen in der Gasphase, den sogenannten *lucky survivors* [23-26], abhängig. In der Desorptionwolke (*engl.* plume) kann es zu zahlreichen Kollisionen zwischen den Analyt- und Matrixmolekülen kommen. Somit ist ein Protonentransfer von Matrix auf Analyt, aber auch eine Deprotonierung denkbar. Es findet eine gleichzeitige Desorption und Ionisation statt. Im positiven Ionenmodus wird durch die Übertragung von Protonen $[M+H]^+$ oder Alkalimetallionen $[M+Alkali]^+$ eine simultane Kationisierung erreicht. Bei Peptiden und Proteinen sind mehrheitlich einfach geladene Ionen $[M+H]^+$ vorhanden [23]. Eine Deprotonierung $[M-H]^-$ findet im negativen Ionenmodus statt. Darüber hinaus werden auch Cluster- und Adduktbildungen beobachtet.

Die verschiedenen Matrices haben ein unterschiedliches Kristallisationsverhalten und müssen je nach Ausmaß der Fragmentierung der Analyten ausgewählt werden. Es wird zwischen „weichen“ Matrices, geringere Fragmentierung der Analyt-Moleküle, und „harten“ Matrices unterschieden. Für die Proteinidentifizierung wird vorwiegend

die „harte“ HCCA (α -Cyano-4-hydroxycimtsäure)–Matrix verwendet, zur Untersuchung von intakten Proteinen und großen Molekülen Sinapinsäure [27]. Die gebildeten Ionen werden anschließend durch eine entsprechend polarisierte Beschleunigungselektrode, die ein elektrostatisches Feld erzeugt, in Richtung des Analysators (TOF) beschleunigt. Danach durchlaufen diese Ionen eine feldfreie Driftstrecke, in der sie nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) aufgetrennt werden [28]. Ionen mit kleiner Masse gelangen schneller durch die feldfreie Driftstrecke als Ionen mit höherer Masse.

Massenanalysator

TOF-MS-Systeme messen im Gegensatz zu Quadrupol- oder Sektorfeld-Massenspektrometern die Flugzeit der Ionen in einer feldfreien Driftröhre. Quadrupol- oder Sektorfeld-Massenspektrometer verwenden ein elektrisches und/ oder magnetisches Feld zur Trennung der Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis. Vorteile der TOF-Technik sind, dass der gesamte Massenbereich einer Probe gleichzeitig analysiert werden kann und der Laserpuls als Startsignal für die MS-Messung geeignet ist. Dadurch kann die Flugzeiten der Ionen durch die Messung der Differenz zwischen dem Startsignal des Lasers und dem Auftreffen der Ionen auf dem Detektor ermittelt werden. Bei einer festgelegten Beschleunigungsspannung sind diese proportional zu der Quadratwurzel des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (Gleichung 2-1).

$$m/z = \frac{2 \cdot U}{s^2} \cdot t^2 \quad \text{(Gleichung 2-1)}$$

m = Masse Ion

z = Anzahl der Ladung

U = Beschleunigungsspannung

s = Wegstrecke

t = Flugzeit

Mit dem MALDI-TOF-MS-System kann sowohl im Linear- oder Reflektormodus gearbeitet werden. Beim linearen Modus durchqueren die Ionen auf einer geraden Linie den Weg zum Detektor (Abbildung 2-3). Nachteilig ist, dass die Auflösung begrenzt ist, da die anfängliche Energieverteilung der Ionen eine starke Ausdehnung in der Flugzeit der Ionen verursacht [166].

Ein Reflektor besteht aus einem elektrischen Gegenfeld, das sich an die Driftstrecke anschließt und somit eine Richtungsumkehr der Ionen verursacht. Bei diesem

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

System dringen Ionen gleicher Massen, aber höherer Startenergie tiefer in das Gegenfeld ein. Diese Ionen legen einen weiteren Weg im Reflektor zurück und holen die langsameren Ionen nach der Richtungsumkehr an einem Punkt in der Driftstrecke wieder ein (Abbildung 2-4). Somit kann eine bessere Auflösung erreicht werden. [171]

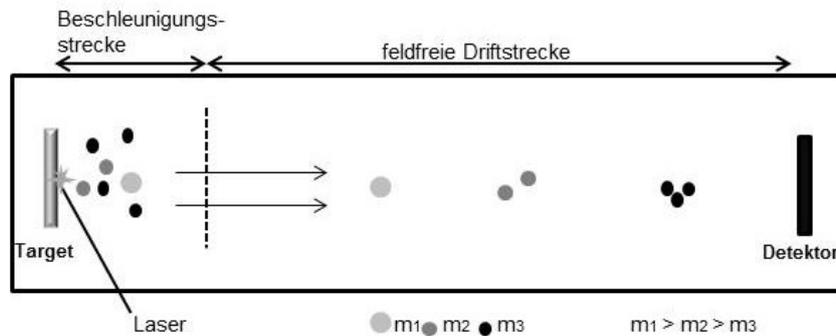


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung eines linearen TOF-Analysator; Ionen mit größerer molekularer Masse (m_1) benötigen eine längere Zeit zum Durchqueren der feldfreien Driftstrecke als Kleinere (m_3)

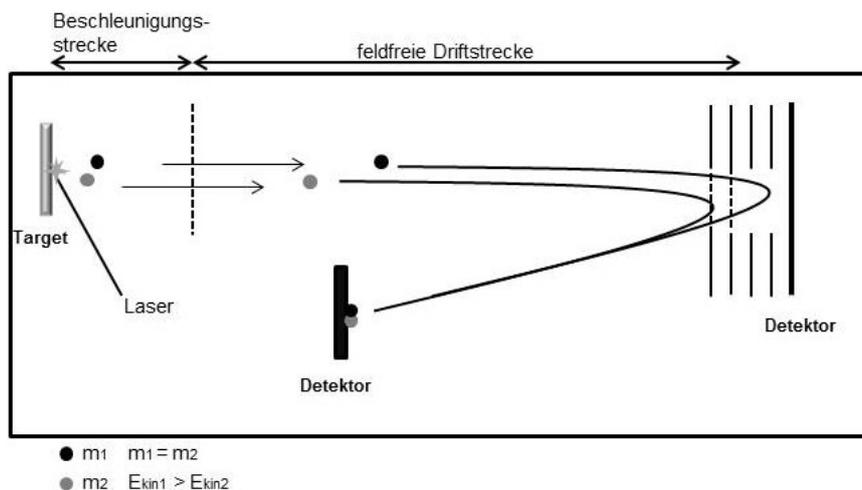


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-MS mit Reflektor; zwei Ionen (m_1 , m_2) mit gleicher Masse, aber unterschiedlicher kinetischer Energie (E_{kin}) werden durch den Reflektor auf den Detektor fokussiert

Das MALDI-TOF-MS-System hat sich in den letzten Jahren in der Analytik und Charakterisierung intakter Proteine etabliert. Die generierten Massenspektren bieten als molekularen Fingerprint die Möglichkeit, Mikroorganismen anhand ihrer charakteristischen Peptid- oder Proteinpeaks zu identifizieren und differenzieren. Der größte Teil der im Messbereich befindlichen Analyten sind positiv geladene ribosomale Proteine. Diese Proteine befinden sich überwiegend im Cytosol und besitzen stark basische und hydrophile Eigenschaften [172]. Die Sequenzen sind

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

hochkonserviert und die Massenunterschiede können die phylogenetischen (Entwicklung bestimmter Verwandtschaftsgruppen) Unterschiede zwischen Arten und Gattungen darstellen [173]. Dieses Wissen wurde sich auch in dieser Forschungsarbeit zu Nutze gemacht. Die MALDI-TOF-MS Methode ist bezogen auf die Proteinanalytik vorteilhaft, da sie eine hohe Auflösung und Massengenauigkeit [29] aufweist, stabil gegenüber Puffersalzen, Verunreinigungen und Enzymspuren [30] ist, sowie eine schnelle und sensitive Analytik bietet. Grundsätzlich bezieht sich die Reproduzierbarkeit eher auf qualitative Aussagen, da die Wahrscheinlichkeit einer Ionisation oder Desorption sich nach dem Matrix-Analytgemisch richtet und Suppressionseffekte auftreten können.

Die matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion ist ein Verfahren, bei der im Gegensatz zu anderen massenspektrometrischen Methoden auch die Analyse von biologischen Makromolekülen möglich ist. Durch die stetige Optimierung der Technik, konnte eine präzise und einfache Methode geschaffen werden, um Mikroorganismen [31-33] wie Gram-positive Bakterien [34-36], *Enterobacteriaceae* [37], Nicht-fermentierende Bakterien [38, 39], Mykobakterien [40], Anaerobier [41] und Hefen [42, 43] identifizieren zu können. Im Bereich der Lebensmittelanalytik beschäftigen sich zwei Arbeitsgruppen mit der Identifikation von verderbassozierten Hefespezies. Usbeck et al. (2013) mit der Optimierung der Präparationsmethoden und dem Einfluss der Anzuchtbedingungen auf die Reproduzierbarkeit der Massenspektren der verderbsassozierten Hefen *S. cerevisiae*, *D. hansenii* und *Wickerhamomyces (W.) anomalus* [174]. Pavlovic et al. (2014) beschäftigten sich dagegen mit der Fragestellung, inwieweit verderbsassozierte Hefen aus Lebensmitteln mit Hilfe der MALDI-TOF-MS identifizierbar sind und verglichen die massenspektrometrische Methode mit klassischen Verfahren. Pavlovic et al. konnten 96 Hefeisolaten aus verschiedenen Lebensmitteln und 63 Isolate auf Speziesebene richtig identifizieren. Jedoch wurden 17 Isolate nur auf der Genusebene und 16 Isolate gar nicht identifiziert. Drei Hefeisolaten wurden nicht identifiziert, obwohl Isolate derselben Spezies mittel MALDI-TOF-MS identifiziert werden konnten [175]. Der Goldstandard zur Identifizierung von aus Lebensmitteln isolierten Hefen liegt immer noch in der Sequenzierung des 26S rDNA-Genabschnitts der großen Untereinheit beziehungsweise der Internal Transcribed Spacer Region (ITS) in Kombination mit der Untersuchung der physiologischen und morphologischen Eigenschaften [175].

2.2 Hefen

Grundsätzlich können Mikroorganismen in die Gruppen der Prokaryoten und Eukaryoten eingeteilt werden [44]. Zu der letztgenannten Gruppe gehören neben den Algen und Protozoen auch Pilze, einschließlich der Hefen [45].

Zur Klassifizierung von Mikroorganismen ist es wichtig eine einheitliche und systematische Taxonomie zu beschreiben. In Abbildung 2-5 ist die Hierarchie mit den lateinischen Begriffen und die internationale Nomenklaturregel für das Reich der Pilze dargestellt.

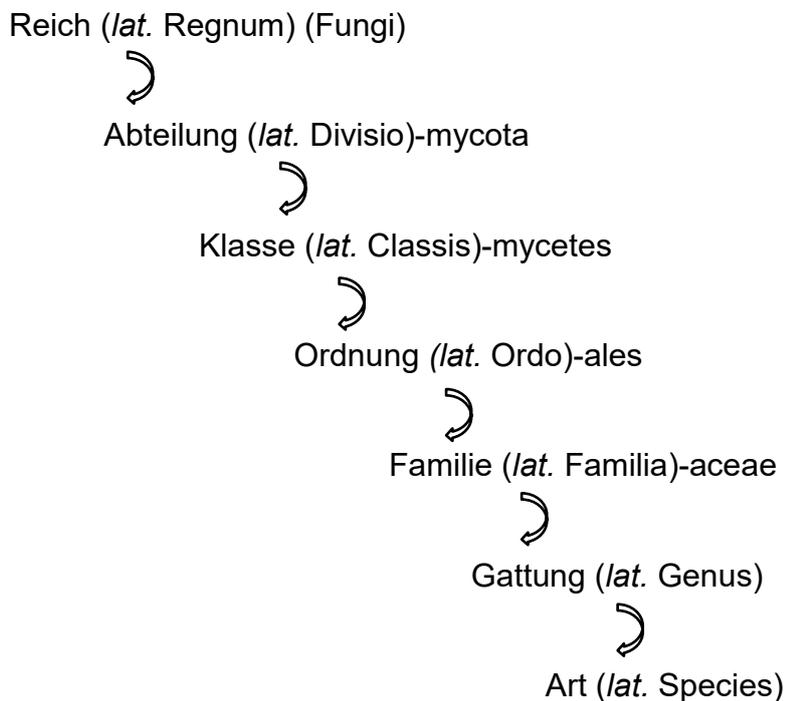


Abbildung 2-5: Taxonomische Einteilung der Mikroorganismen und Nomenklatur der Pilze (nach [46])

Gegenwärtig sind circa 750 Hefearten bekannt, aber nur wenige konnten bislang isoliert werden [47]. Erschwerend kommt hinzu, dass viele dieser Arten nicht zu einer einheitlichen Gruppe gehören, sondern zu den Klassen: *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* und *Deuteromycetes*.

Die richtige Einteilung der Hefen auf Gattungs- und Artebene wird seit Jahren diskutiert. Durch die Einführung und Verbesserung der Transmissionselektronenmikroskope in den 60er Jahren konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Gruppen der *Ascomyceten* und *Basidiomyceten* auf der Basis ihrer Zellwände und Knospenbildung differenzieren lassen [48]. Anhand von DNA-Vergleichsstudien konnten die physiologischen Distanzen zwischen verschiedenen

Taxa berechnet werden. Die festgelegte Klassifizierung musste jedoch neu betrachtet und Hefen umbenannt werden [47]. Im Jahr 1996 ist die Genomsequenz der *Saccharomyces cerevisiae* durch Goffeau et al. [49] vollständig entschlüsselt worden. Die Brauhefen wurden jedoch nicht spezifisch genug betrachtet. Einer der größten Differenzen ist der Ploidiegrad. Brauhefen sind polyploid und die untersuchten Hefen im Genomprojekt [50] haploid. Ein Beispiel ist das *MAL*-Gen, welches bei den Brauereistämmen in 10er oder mehr Gensätzen auftritt, währenddessen bei den Projektstämmen von Goffeau et al. nur eine Kopie vorhanden ist [51].

2.3 Hefen in der Brauerei

Hefen sind ein wichtiger Bestandteil bei der Bierherstellung. Sie beeinflussen die Qualität eines Bieres sowie die Ausbildung charakteristischer Geschmacks- und Aromaprofile. Daher spielen sie neben dem Einsatz von Hopfen, Malz und Wasser eine entscheidende Rolle bei der Bierherstellung.

Grundsätzlich gehören Brauhefen zur Gattung *Saccharomyces* und zur Art *cerevisiae* [50]. J. Lodder beschreibt die Zellen der *Saccharomyces cerevisiae* als kugelig, ovoid, ellipsoid oder zylindrisch gestreckt, einzeln oder als Paar vorliegend, als Ketten oder Cluster [52]. Die Größe der Zellen kann in drei Gruppen eingeteilt werden: große Zellen 4,5–10,5 x 7,0-21,0 µm, kleine Zellen 2,5-7,0 x 4,5-11,0 µm und Zwischengrößen mit 3,5-8,0 x 5,0-11,0 µm [50].

2.3.1 Taxonomie der Brauhefen

Die taxonomische Bezeichnung der Bierhefen hat sich im Laufe der Zeit immer wieder verändert. 1970 wurden noch 41 Arten der Gattung *Saccharomyces* zugeordnet, 1998 nur noch 14 Arten (Tabelle 2-1) [52, 53].

Tabelle 2-1: Arten der Gattung *Saccharomyces* (nach [53, 54])

Art	Autor	Jahr
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Meyen ex Hansen, E. C.	1883
<i>Saccharomyces exiguus</i>	Reess ex Hansen, E. C.	1888
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Saccardo	1895
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Hansen, E. C.	1904
<i>Saccharomyces unisporus</i>	Jørgensen	1909

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Art	Autor	Jahr
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	Bachinskaya	1914
<i>Saccharomyces dairenensis</i>	Naganishi	1917
<i>Saccharomyces transvaalensis</i>	van der Walt	1956
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	Phaff, Miller, Shifrine	1956
<i>Saccharomyces castellii</i>	Capriotti	1966
<i>Saccharomyces servazzii</i>	Capriotti	1967
<i>Saccharomyces barnettii</i>	Vaughan-Martini	1995
<i>Saccharomyces spencerorum</i>	Vaughan-Martini	1995
<i>Saccharomyces rosinii</i>	Vaughan-Martini, Barcaccia, Pollacci	1996

Zusätzlich werden die *Saccharomyces* Hefen noch in die Gruppen *Saccharomyces sensu stricto* und *Saccharomyces sensu lato* eingeteilt [50]. Zu der erst genannten Gruppe *Saccharomyces sensu stricto* gehören die folgenden vier Arten: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus* und *Saccharomyces bayanus*, die sich aufgrund ihrer rDNA-Spacer-Sequenzen (rDNA engl. ribosomal Deoxyribonucleic acid) in zwei Cluster unterteilen lassen [50, 55] (Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: Gegenüberstellung der vier verschiedenen *Saccharomyces* Arten [50]

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>Saccharomyces Bayanus</i>
Verwendung	Kulturhefe - obergärige Brauhefe, Backhefe, Weinhefe;	nicht domestiziert	Kulturhefe – untergärige Brauhefe	Kulturhefe – Weinhefe
Wachstumstemperatur	≥ 37 °C	≥ 37 °C	≤ 34 °C	≤ 34 °C
Fructose-Transport	erleichterte Diffusion	erleichterte Diffusion	aktiver Transport	aktiver Transport
Melibiose-Verwertung	Nein	Nein	Ja	Ja
rDNA-Spacer-Sequenz	<i>cerevisiae</i> -Cluster	<i>cerevisiae</i> -Cluster	<i>bayanus</i> -Cluster	<i>bayanus</i> -Cluster

Brauhefen werden in die sogenannten obergärigen und untergärigen Hefen eingeteilt. Taxonomisch bezeichnet werden sie als *Saccharomyces cerevisiae* (obergärig) und *Saccharomyces carlsbergensis* (untergärig). [1]

Jedoch ist diese Klassifizierung der *Saccharomyces carlsbergensis* so nicht richtig, da sie keine eigenständige Art bildet [47]. Aufgrund zahlreicher DNA-

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Untersuchungen innerhalb der *Saccharomyces sensu stricto* Gruppe wird aktuell davon ausgegangen, dass *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) eine hohe genetische Verwandtschaft mit *S. cerevisiae* (53 %) und *S. bayanus* (72 %) haben [47].

Die Bezeichnung obergärig beziehungsweise untergärig wird auf das Gärverhalten der Hefen während der Hauptgärung im Brauprozess zurückgeführt. Obergärige Hefen steigen aufgrund der Bildung von Sprossverbänden in offenen Gärbottichen nach oben und die untergärigen Hefen sinken zu Boden, da sie als Einzel- oder Doppelzellen vorliegen [1]. Die heutigen Gärtanks sind geschlossene zylindrokonische Tanks, bei der diese pauschale Aussage ihre Grenzen hat. Unterschiede in der Temperaturführung oder im Kohlenhydratstoffwechsel der Hefen sind wichtige Marker in der Differenzierung (Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3: Unterscheidung von unter- und obergärigen Hefen (nach [56])

	Untergärige Hefe	Obergärige Hefe
Temperaturempfindlichkeit	Fermentation 7-15 °C Wachstum < 30 °C Wachstum max. 31,6-34 °C	> 15 °C > 30 °C [57] 37,5-39,8 °C [58]
Raffinoseverwertung	100 %	33 %
Sporulation	nach 72 h	nach 48 h
Atmungsaktivität	-	40 - 75 % (und höher)
Stoffwechsel	-	40 % (und höher)
Cytochromspektrum	zwei Banden	vier Banden
Katalaseoptimum	pH 6,5-6,8 Temperatur 15°C	6,2-6,4 20-24°C
Flockungsverhalten	Bruch- und Staubhefe	Staubhefen

2.3.2 Hefepropagation

Für Brauereien unerlässlich sind die fachgemäße Haltung von Hefereinzuchten und die Propagation eines Hefesatzes im Labor- beziehungsweise Industriemaßstab. Diese Prozesse sind im Hefemanagement geregelt.

Eine Kontamination mit sogenannten „Bierschädlingen“ kann zu hohen Qualitätseinbußen im Produkt führen und somit hohe Kosten verursachen. Einige Hefestämme können sowohl Kulturhefe als auch Kontaminante für verschiedene Industriezweige darstellen. Zum Beispiel gehören die *Pichia*-Arten zu den

Fremdhefen in der Brauerei, aber *Pichia anomala* wird eingesetzt für die Herstellung von fermentierten Getränken wie Komboucha [59].

Die für die Brauereien wichtige Einteilung der Hefen ist die Gliederung in Kultur- und Fremdhefen. Fremdhefen können unter anderem zu Trübungen oder Fehlparomen führen und stellen somit die Brauereien vor die Herausforderung, diese unerwünschten Hefen zu erkennen und zu vermeiden. Daher wird der Einsatz der Hefen streng kontrolliert und nach einer bestimmten Anzahl an Fermentationszyklen ausgetauscht [47].

Nach Herführung der Reinzuchthefer im Brauereilabor erfolgt eine geschlossene Propagation in zylindrokonischen Reinzuchtanks. Die daraus gewonnene Hefe wird verwendet um Bierwürze zu vergären. Am Ende der Gärung setzt sich die Hefe im Konus des Gärtanks ab und kann geerntet werden, um erneut für eine Fermentation eingesetzt zu werden. Die Wiederverwendung der Erntehefe wird als Führung bezeichnet. Jede Führung beschreibt ein Fermentationszyklus. Diese Vorgehensweise bildet eine Grundlage zum Ansatz dieser Forschungsarbeit. Die analytische Betrachtung der eingesetzten Hefen aus verschiedenen Fermentationszyklen mittels MALDI-TOF-MS wird im Kapitel 4.5.2 betrachtet.

Für die Hefeanzucht im Labormaßstab werden von einer Reinzuchtkultur Hefezellen entnommen und in circa 5-10 mL steriler Ausschlagwürze suspendiert [56]. Ausschlagwürze ist im Sudhaus fertig gekochte Würze, die auf einen definierten Extraktgehalt eingekocht ist. Die Würze enthält Hopfenbitterstoffe wie Humulone die eine keimhemmende Wirkung ausüben [166]. In weiteren Schritten folgt die Vermehrung der Hefen bis auf ein Gefäßbruttovolumen von 5-50 L [60]. Die Propagation im Labormaßstab hat den Zweck, Hefereinkulturen heranzuziehen, die eine ausreichende Zellzahl, Vitalität (Aktivität bzw. Gärleistung) sowie Viabilität (Lebensfähigkeit) besitzen, um im Brauereibetrieb Verwendung zu finden [50].

Hefen können im Batch-Verfahren (Satzverfahren), Fed-Batch-Verfahren (Zulaufverfahren) oder im kontinuierlichen Betrieb kultiviert werden.

Das Batch-Verfahren verläuft satzweise und diskontinuierlich. Es findet kein Zulauf an Substrat oder Ablauf an Substanzen während der Fermentation statt. In Brauereien findet die Propagation der Hefen unter aeroben und die anschließende Gärung unter anaeroben Bedingungen im Satzbetrieb statt. Beim reinen Batch-Verfahren wird der gesamte Propagationseinheit zum Anstellen der Gärung verwendet [56]. So kann es zu keiner Verschleppung von Kontaminanten kommen,

aber zu Adaptionsphasen der Hefen, die sich negativ auf den Prozess auswirken können. In einem halbkontinuierlichen Verfahren, wird nach dem Anstellen in mehreren Schritten ein Teil des Propagatorinhaltes zugeführt. Hier sind die Gefahren von Hefemutationen sowie mögliche Verdünnungen von essentiellen Nährstoffen hoch. Dies kann sich aufgrund der Reduzierung von wichtigen Spurenelementen negativ auf den physiologischen Zustand der Hefen auswirken. Außerdem kann es zu einem nicht gewünschten Anstieg des Ethanolgehaltes und der Gärungsnebenprodukte führen.

Hefen sind fakultativ anaerob, das heißt, dass unter aeroben Voraussetzungen Glukose verstoffwechselt wird und unter anaeroben Bedingungen die alkoholische Gärung einsetzt. Vor der Hefegabe wird die Würze mehrfach belüftet. Es herrschen zunächst aerobe Bedingungen vor. Es tritt der sogenannte Pasteur-Effekt auf: Die Hemmung der Glykolyse durch Atmung. Durch den Verbrauch an Sauerstoff und die Bildung von Kohlenstoffdioxid entstehen anaerobe Bedingungen und die alkoholische Gärung setzt ein. Unter anaeroben Bedingungen verbrauchen Hefen mehr Zucker als unter aeroben.

Die Konzentration an fermentierbaren Zucker (50-100 g/L) ist in der Bierwürze hoch [61], daher kann während einer kontinuierlichen Vermehrung der Crabtree-Effekt auftreten. Das heißt, dass bei einer höheren Glukose-Konzentration auch unter Anwesenheit von Sauerstoff (aerob) Ethanol gebildet wird [62] und somit die Hefevermehrung beziehungsweise Steigerung der Biomasse gehemmt wird. Im Jahr 1915 wurde das Fed-Batch-Verfahren in der Backhefeindustrie entwickelt (siehe 2.4.2 Fermentation), um dem Crabtree-Effekt zu vermeiden [63].

2.4 Backhefen

Das erste Teiglockerungsmittel zur Brotherstellung war der Sauerteig. Mit der Verwendung von Bier- und Brennereihefen, die als Abfallprodukte anfielen, konnte im 18. Jahrhundert eine deutliche Verbesserung des Backgutes erzielt werden. Jedoch zeigte sich, dass die untergärigen Brauhefen *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) nur im unzureichenden Maße für die Teiglockerung geeignet sind und die Brennereihefen nicht in genügender Menge abfallen. [64]

Bereits 1879 wurde durch ein Patent von F. W. Marquardt die Idee der Backhefezüchtung, die Zufuhr von Luft in die Hefewürze, entwickelt [65]. Durch die Belüftung beziehungsweise unter aeroben Bedingungen kann die Hefeaussbeute

gesteigert werden [64]. Bis zum 19. Jahrhundert setzten sich die Rohstoffe zur Hefeherzeugung aus 50-55 % Mais, 25-30 % Gerstengrünmalz und 10-15 % Malzkeimen zusammen [64]. Durch den Ersten Weltkrieg war die Industrie veranlasst, auf die billigere Melasse umzusteigen [64]. Dies musste zum Umdenken bei der Stickstoffgabe führen, der organische Stickstoff wurde vollständig durch anorganischen Stickstoff ersetzt [66]. Weitere Erfindungen wie das Zulaufverfahren [67] und die Einführung von Hefeseparatoren zur Abtrennung der Hefen von der Nährlösung, waren wichtige Meilensteine für die Backhefeindustrie.

Mit einer Jahresproduktion von 2 Mio.t gehörten Backhefen im Jahr 2004 mengenmäßig zu den bedeutendsten Fermentationsprodukten in der Lebensmittelindustrie [68]. Sie wird in Form von Press- (29-34 %TS), Beutel- und Flüssighefe (14-29 %TS), sowie aktiver Trockenbackhefe (92-94 %TS) und Instanthefe (95-97 %TS) eingesetzt [68, 69, 70].

2.4.1 Melasse

Ein Hauptabbauprodukt der Zuckerindustrie ist die Rüben- und Zuckerrohrmelasse (Zuckergehalt $\geq 47\%$) [47]. Neben wichtigen Inhaltsstoffen wie Salzen, Spurenelementen und Vitaminen (z.B. D-Pantothensäure) dient als Kohlenstoffquelle hauptsächlich die Saccharose. Für eine möglichst gute Ausbeute müssen der Zuckerrohrmelasse noch zusätzlich N, P, S, Mg und Spurenelemente zugegeben werden [68], bei der Rübenmelasse darüber hinaus noch D-Biotin [71].

Auch wenn die Melasse vorteilhaft und preisgünstig ist, so können Schwankungen in der Melassequalität, der hohe Anteil an Nichtzuckerstoffen, Hefeinhibitoren (z.B. Pflanzenschutzmittel) und mesophile Keime den Prozess der Hefeherstellung hemmen [68, 64]. Daher sind Klärverfahren für die Vorbehandlung von Melasse unerlässlich. Es werden verschiedene Klärverfahren in der Literatur [64, 68, 175] beschrieben. Die Klärung von Rohmelasse ist ein schwieriger Teil der Hefeherstellung. Bei der Vorbereitung und Klärung wird die Melasse in den Kochbottichen oder in Durchlauferhitzern vor den Klärschleudern auf hohe Temperaturen erhitzt. Hier sollen die Mikroorganismen der Melasse und des Verdünnungswassers abgetötet und das Ausflocken der Kolloide gefördert werden. Rohmelassen können während der Hefegärung zu Nachausscheidungen von Pigmentstoffen neigen. Diese Stoffe legen sich auf die Zellwände der Hefen und sind nicht abwaschbar [175]. Durch gezielte chemische Klärung können die in der

Melasse eingelagerten kolloiden Farbstoffe zur Ausfällung gebracht werden. Im ersten Schritt wird die Rohrmelasse mit Wasser (1:3 bis 1:4) auf circa 30-40 % Extrakt verdünnt und mit Schwefelsäure auf pH 4,7-5,2 angesäuert [64, 175]. Die Pigmentstoffe der Melasse lassen sich mechanisch durch Klärzentrifugen abscheiden. Anschließend folgt die Sterilisation durch Einleiten von Direktampf. Bei den Rübenmelassen ist das saure Klärverfahren oft nicht wirksam genug. Es muss alkalisch geklärt werden. Feinste Nachausscheidungen können temperaturbedingt sein, beispielsweise bei der Abkühlung der heiß geklärten Melasse. Hier kann die abdekantierte geklärte Würze im Gegenstromkühler tiefgekühlt werden und anschließend über eine Klärzentrifuge laufen [175].

2.4.2 Fermentation

In der Backhefeindustrie wird das Fed-Batch-Verfahren (Zulaufverfahren) durchgeführt, bei der im Gegensatz zum Batch-Verfahren durch Zugabe von Substrat während der Fermentation eine höhere Ausbeute an Biomasse erzielt werden soll [47]. Vorteil dieses Verfahrens ist, dass zu Beginn der Fermentation hohe Substratkonzentrationen vermieden werden können, welche die Produktion von Ethanol begünstigen jedoch das Hefewachstum hemmen.

Die Fermentation läuft über mehrere Prozessstufen ab. Zunächst werden Reinzuchtverfahren durchgeführt, bei der eine definierte Hefemenge unter optimalen Bedingungen angezogen wird. Diese Reinzucht wird zum Ansetzen der sogenannten Stellhefe verwendet. Die Stellhefe soll eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit erreichen, bei der die geklärte Melasse als Kohlenstoffquelle dient. Die Saccharose wird vollständig verbraucht. Während dieses Prozesses kommt es auch zur Bildung von Ethanol, welcher aufgrund des Branntweinmonopolgesetzes nur bis zu einer bestimmten Menge erzeugt werden darf [64]. Anschließend folgt die Versandhefefermentation, bei der unter kontrolliertem Melassezulauf und unter voller Belüftung die Bildung von Ethanol verhindert werden soll und eine maximale Hefeausbeute erreicht wird [64]. Des Weiteren wird die Hefe gewaschen und die Hefecreme (10-24 Gew. %TS) in Tanks gelagert [47].

Die Hefecreme ist für den direkten Einsatz in der Backwarenindustrie geeignet und wird aufgrund der einfachen Handhabung bevorzugt.

2.4.3 Proteinzusammensetzung der *Saccharomyces*-Hefen

In Abhängigkeit von den Züchtungsbedingungen, der Intensität der Vermehrung, vom Alter der Hefezellen und dem Ernährungszustand kann die chemische Zusammensetzung einer Hefe variieren. Je proteinreicher eine Hefezelle ist, desto enzymstärker und stoffwechselaktiver ist sie. Daher werden bei einer länger haltbaren Presshefe Rohproteingehalte von circa 47 % HTS (Hefetrockensubstanz) und bei Schnelltriebhefen Rohproteingehalte von > 50 % HTS eingestellt. Der Reinproteingehalt (vorwiegend Enzymproteine) der Hefen ist abhängig vom Stamm und beträgt durchschnittliche 64-76 % des Rohproteins. In der Tabelle 2-4 ist die prozentuale Zusammensetzung der Hefetrockensubstanz (% HTS) von *Saccharomyces*-Hefen dargestellt. Die zwei Vermehrungsstufen der Backhefe (Reinzuchtbackhefe und Verkaufshefe) sind entsprechend auf die Brauereireinzuchthefen und Erntehefen übertragbar [56].

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Tabelle 2-4: Zusammensetzung der Hefetrockensubstanz (% HTS) von *Saccharomyces*-Hefen (nach [56])

Bestandteile		Reinzuchtbackhefe [% HTS]	Verkaufshefe [% HTS]
Rohprotein 45-60 %	Gesamtrohprotein	50–58	40-54
	<u>Proteine und Aminosäuren</u>	ca. 50	38-48
	Nucleinsäuren	ca. 8	ca. 4
	Nucleotide	ca. 6	ca. 4
	Albumine		
	Globuline		
	Phosphorproteine		
	<u>Peptone</u> Polypeptide		
Kohlenhydrate 15-39 %	Gesamtgehalt	ca. 29	ca. 39
	Glycogen	ca. 6	ca. 12
	Hefemannan	ca. 10	ca. 10
	Hefeglucan	ca. 6	ca. 5
	Trehalose	ca. 7	ca. 12
Rohfett 2-12 %	Gesamtfette	ca. 4	ca. 7
	Neutralfette	ca. 3	ca. 4
	Phosphatide	ca. 0,3	ca. 2
	<u>Lipidsymplexe</u>		
	Sterine	ca. 0,2	ca. 0,5
	Cerebrine (Carotinoide) (Squalen)		
Asche 6-12 %	Gesamtgehalt:	6-10	
	P ₂ O ₅	2,3-5,8	
	K ₂ O	1,5 - 4,4	
	MgO	Mg 0,06-0,4	
	CaO		
	Na ₂ O		
	SiO ₂		
	Fe ₂ O ₃		
	SO ₄		
	Cl ⁻		

Die Hefezellen enthalten verschiedene Stoffgruppen. Der Rohproteingehalt liegt durchschnittlich bei 45-60 %. Eiweiße wie Zymocasein und Cerevisin sind typische Vertreter. Diese werden durch die Extraktion der Hefezellen und einer anschließenden Ausfällung gewonnen. Der Rohproteingehalt von Brauereihefen liegt durchschnittlich bei 51-58 % HTS. Circa 10-20 % der Aminosäuren sind freie Aminosäuren oder niedere Peptide. Ein wichtiges Tripeptid ist das Glutathion, welches aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin aufgebaut ist. Es bildet ein Redoxsystem, welches in Abhängigkeit vom pH-Wert reduzierenden Wasserstoff freisetzt durch Bildung reversibler Disulfidbrücken (Abbildung 2-6).

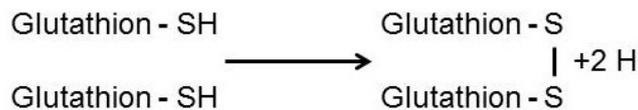


Abbildung 2-6: Redoxsystem Glutathion

Dies spielt im Besonderen bei der Steuerung von Enzymaktivitäten wie dem Atmungsstoffwechsel eine wichtige Rolle. Der Glutathiongehalt bei Brauereihefen liegt durchschnittlich bei 0,6-1 % HTS [56].

Der Gesamtkohlenhydratgehalt der Reinzuchtbackhefen liegt bei rund 29 % HTS. Höhermolekulare Kohlenhydrate wie die Glucane und Mannane liegen in der äußeren Zellwand. Sie sind Strukturkohlenhydrate und beeinflussen das Flockungsvermögen von Hefen. Im Zellplasma ist das Hauptreservekohlenhydrat Glycogen vorhanden. Der Glycogengehalt steigt, wenn der Rohproteingehalt sinkt und umgekehrt. Brauereihefen enthalten durchschnittlich mehr Glycogen als Backhefen [56]. Wird die Hefe gestresst bildet sich das Disaccharid Trehalose aus. Der Lipidgehalt schwank zwischen 2-12 % HTS. Lipide sind wichtige Strukturbausteine und Reservestoffe für die Hefe und von Bedeutung für die Vitalität der Zellen. Eine ebenfalls wichtige Stoffgruppe sind die Vitamine. Sie sind entscheidend für den Hefestoffwechsel. Saccharomyces-Hefen benötigen zum Wachstum und zur Vermehrung Vitamine und deren Vorstufen im Nährsubstrat (siehe 3.3.1 Nährmedien) [56].

2.5 Multivariate Datenanalyse

In der Analytik werden zunehmend größere Datenmengen aufgrund komplexer werdender Analysenmethoden generiert. Zur Erkennung bestimmter Homogenitäten, Variabilitäten oder Strukturen in den Datensätzen sind Methoden der mathematischen Datenanalyse erforderlich. Dazu stehen eine Vielzahl von Methoden vor allem aus der angewandten uni- und multivariaten Statistik zur Verfügung [72, 73]. Die Datensätze von generierten Massenspektren beziehungsweise Protein-Fingerprints verschiedener Hefestämme enthalten tausende Datenpunkte. Diese Massenspektren bestehen aus x-Werten, dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z , und den y-Werten, der absoluten Intensität. Für die Auswertung dieser großen und komplexen Datenmengen wird eine multivariate Datenanalyse benötigt.

Die Chemometrik wurde Mitte der siebziger Jahre etabliert, um die komplexen chemischen Informationen mittels mathematischer und statistischer Methoden sichtbar zu machen, die vorher nicht eindeutig erkennbar waren [72]. Ziel ist die Datenreduktion: Aus einer großen Anzahl an Messwerten relevante Informationen zusammenzufassen. Zur Ermittlung von Zusammenhängen in den Daten bezüglich der Objekte und Variablen wird für die Datenevaluation unter anderem die Hauptkomponentenanalyse verwendet.

2.5.1 Vorverarbeitung der Massenspektren

Die Vorverarbeitung der Massenspektren ist essentiell, um wichtige Informationen in den Datenmengen herauszuarbeiten oder falls notwendig Daten zu reduzieren [74]. Dadurch werden nachfolgende Modelle im Rahmen der Datenanalyse robuster. Die spektralen Informationen der MALDI-TOF-MS Analyse unterliegen Effekten, die mathematisch korrigiert werden müssen. Dies bedeutet, dass eine mathematische Vorverarbeitung durchgeführt werden muss, welche die nicht-chemischen Informationen, zum Beispiel Matrixeffekte, nivelliert und die chemischen Informationen herausarbeitet. In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Beschreibungen zur Bearbeitung von Massenspektren [74, 75]. Deshalb wird nur auf wesentliche Aspekte eingegangen, die für das Verständnis dieser Arbeit wichtig sind.

Basislinienkorrektur

Aufgrund veränderter Bedingungen während der Messung (z.B. Temperatureinflüsse), systematischer Fehler bei der Kalibration, durch Drift des Analysengerätes beziehungsweise durch Probeninhomogenität kann sich der Basiswert verändern. Die Korrektur dieser Basislinie kann direkt durchgeführt werden, in dem für jedes Spektrum eine Basislinie linear oder mittels Polynom angepasst und subtrahiert wird. Typische Methoden wie der Top Hat Filter [76], Loess Ableitungsfiler [77], Linear Splines oder polynomial fitting (Polynomanpassung) sind angewandte Verfahren zur Basislinienkorrektur.

Spektrenglättung

Massenspektren können Störsignale enthalten, die in Form eines Spektrenrauschen auftreten. Für das Glätten dieser Massenspektren wird häufig das Savitzky-Golay-Verfahren [78] angewendet. Es wird genutzt, wenn das Glättungsintervall möglichst

klein gehalten werden soll, um die Strukturen der Massenspektren zu erhalten. Hierfür wird der Datensatz mit einer Polynomglättung angepasst, indem durch die Berechnung der spektralen Steigung eine wählbare Anzahl an Datenpunkten ein mathematisches Ausgleichspolynom gelegt wird. Von der Ausgleichsfunktion wird für den Mittelpunkt des gewählten Segmentes die Steigung bestimmt und der Steigungswert als neuer Datenpunkt verwendet. Der Segmentbereich wird danach um einen Datenpunkt nach rechts auf der X-Achse verschoben und der Vorgang wiederholt sich. Am Ende ist von jedem Spektrenpunkt die Steigung berechnet.

Normierung

Um Variationen der Intensitäten zwischen den gemessenen Massenspektren einer Gruppe (Proteinspektrum eines Hefestammes) entgegenzuwirken und eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Hefestämme beziehungsweise ihrer Proteinspektren zu erreichen, werden die Datensätze normiert.

Bei der Flächennormierung (AUC *engl.* area under the curve) wird jedes Spektrum durch den Wert der integrierten Intensitäten dividiert und die Fläche unter dem Graphen erhält den Wert Eins. Es wird davon ausgegangen, dass die Proteinkonzentration der unterschiedlichen Proben annähernd konstant ist. Durch diese Art der Normierung werden die Intensitätsunterschiede, die durch zum Beispiel unterschiedliche Schichtdicken der Matrices oder eventueller Unterschiede in den „hot spots“ (Probenverteilung auf dem Target) entstehen, ausgeglichen.

2.5.2 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA *engl.* Principal Component Analysis) ist eine qualitative Methode, um multivariate (mehrdimensionale) Datensätze zu vereinfachen. Das bedeutet, dass mehrdimensionale Daten auf wenige aussagekräftige Dimensionen, das heißt Hauptkomponenten (PC) reduziert werden [79]. Der Mathematiker K. Pearson beschrieb im Jahr 1901 erstmals diesen Algorithmus [80], der 1933 vom Statistiker und Ökonom H. Hotelling weiter verbessert wurde [81]. Erst 1970 wurde die PCA in der Chemie etabliert [74] und S. Wold betrachtete dies speziell aus chemometrischer Sicht [82].

Aus mathematischer Sicht wird dieses Verfahren als Eigenwertproblem dargestellt. Das heißt, zu einer Datenmatrix X werden die zugehörigen Eigenwerte λ und Eigenvektoren v berechnet (Gleichung 2-2).

$$Xv = \lambda v$$

Gleichung 2-2

Es sind verschiedene Herangehensweisen bekannt, um diese Eigenwertprobleme zu lösen. Eine Möglichkeit besteht darin, die Richtung der maximalen Varianz in den Ausgangsdaten (Massenspektren der Hefeproteine) zu suchen, um die Faktoren beziehungsweise Hauptkomponenten zu bestimmen. Durch diese Hauptkomponenten bildet sich ein neues Koordinatensystem, in dem durch den Verzicht auf die höheren Koordinatenachsen eine Datenreduktion möglich ist. Die Ausgangsdaten werden in den neuen Faktorenraum transformiert und können somit durch das neue Koordinatensystem beschrieben werden.

Veranschaulicht wird dies in der Abbildung 2-7. In einem zweidimensionalen x_1x_2 -Raum sind N Objekte in einem Streudiagramm dargestellt. Wird eine Gerade durch die Punkte gelegt, sodass die Projektion der Punkte auf diese Gerade möglichst einen kleinen Abstand hat, zeigt die Gerade in Richtung der maximalen Varianz der Daten.

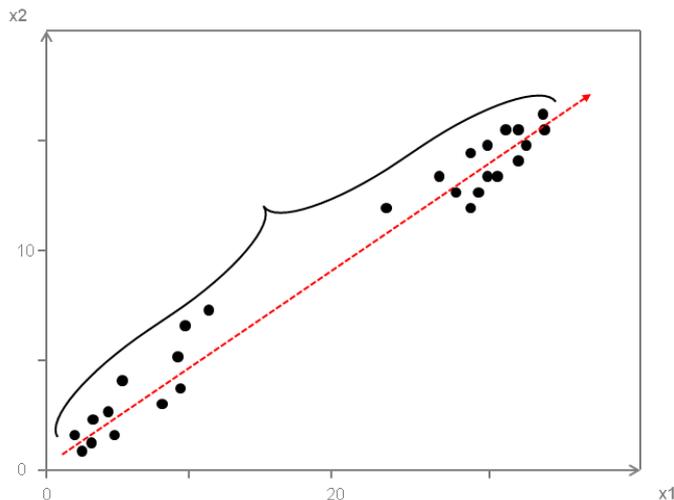


Abbildung 2-7: N Objekte im zweidimensionalen x_1x_2 -Raum, Gerade (rot) zeigt in Richtung maximaler Varianz und weist eine gute Trennung der beiden Gruppen auf (nach [74])

Diese Gerade (rote Linie) stellt die erste Hauptkomponente (PC1) dar. Die PC1 erklärt die größtmögliche Variation der Daten. Die neu gebildeten Hauptachsen sind orthogonal zueinander. Der Schwerpunkt aller Daten bestimmt den Nullpunkt des neuen Koordinatensystems. Der Schwerpunkt beziehungsweise neue Nullpunkt, der im Koordinatenursprung liegt, wird über den Mittelwert jeder Variablen berechnet. Die Richtung von PC2 wird wieder durch die Richtung der maximalen Varianz bestimmt. Die Datenpunkte (Messungen) werden auf die neu gebildete Koordinatenachse PC2

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

projiziert (sog. Scores) (Abbildung 2-8 rechts), sodass jedes Objekt (Hefestamm) auf jeden dieser Hauptkomponenten abgebildet wird.

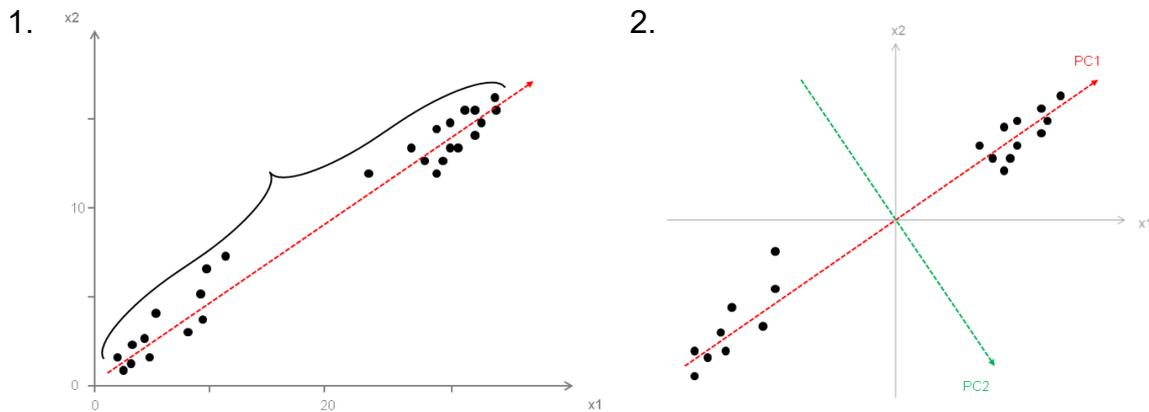


Abbildung 2-8: Bildung des neuen Koordinatensystems

1. N Objekte im Streudiagramm, Gerade PC1 (rot) in Richtung der maximalen Varianz
2. Gerade PC2 (grün) orthogonal zu PC1 und in Richtung maximaler Varianz der Daten

Die neuen Achsen erhalten neue Einheiten, die sogenannten *Loadings* die mittels Einheitskreis berechnet werden (*Loadingmatrix P*).

Mit Hilfe der Formel (Gleichung 2-3) kann geprüft werden, ob die *PC1-Loading* tatsächlich Eins ergibt:

$$|e_{PC1}| = \sqrt{x1^2 + x2^2} = 1 \quad \text{Gleichung 2-3}$$

Die Scores bilden die Matrix T, welche die gleiche Anzahl an Zeilen hat wie die Originalmatrix X Objekte. Die Dimension des neuen Koordinatensystems entspricht der Anzahl der Spalten in der Matrix. Wird ein Teil der Hauptkomponenten nicht verwendet entsteht eine Matrix E, die Residuen. Der Teil der Ausgangsdaten, der durch die Hauptkomponenten nicht erklärt wird.

Allgemeine Formel:

$$X = TP^T + E \quad \text{Gleichung 2-4}$$

- X = Datenmatrix
T = Gewichts- oder Scorematrix
P^T = transponierte Faktoren- oder Hauptkomponentenmatrix
E = Residualmatrix

Die mittels MALDI-TOF-MS gemessenen Massenspektren bilden die Datenmatrix X . Als Objekte sind die einzelnen Massenspektren zu betrachten, die in den Zeilen der Matrix stehen. In den Spalten befinden sich die zugehörigen Massen, die Variablen. Die Scorematrix T und Loadingmatrix P bestehen aus den Vektorprodukten t_p (t_{1-a} und p_{1-a}). Deren Terme $t_i p_i$ bilden die einzelnen Hauptkomponenten PC_i . Mit der Restmatrix E ergibt dies wieder die Datenmatrix X (Gl. 2-4). Zur Beschreibung der Abhängigkeiten der Ausgangsvariablen untereinander werden die Loadingvektoren benötigt, die die Hauptkomponenten definieren. Mit Hilfe der Scorevektoren kann die Abhängigkeit der einzelnen Spektren zum Loadingvektor betrachtet werden. Daher haben Massenspektren beziehungsweise Proben der verschiedenen Hefestämme die einen ähnlichen Scorewert besitzen, mathematisch gesehen, gemeinsame Eigenschaften.

NIPALS-Algorithmus

Zur Berechnung der Hauptkomponenten wurde im Jahr 1966 der NIPALS (*engl.* Nonlinear Iterative Partial Least Square)–Algorithmus von H. Wold entwickelt [77, 83, 84]. In einem iterativen Prozess werden die Hauptkomponenten nacheinander berechnet. Das heißt, dass die Eigenvektoren der Kovarianzmatrix des Datensatzes berechnet werden und die Scorematrix anschließend durch die Matrixmultiplikation der Datenmatrix X mit der Loadingmatrix berechnet wird. So bleiben die Eigenwerte der Kovarianzmatrix erhalten, durch die erklärt wird, welche Varianz durch eine PC beschrieben ist.

Datenbearbeitung

Die Identifizierung und Entfernung von Ausreißern sind wesentliche Bestandteile der Datenaufbereitung. In Abhängigkeit der verwendeten statistischen Modelle und der damit verbundenen Datenverteilung werden Ausreißer unterschiedlich definiert. Sie können wichtige Informationen enthalten, müssen jedoch bei den meisten Datenanalysen wie zum Beispiel der Klassifikation entfernt werden. Die Betrachtung der Ausreißer muss immer mit einer hohen Sorgfalt durchgeführt werden. Die Daten müssen nicht zwangsläufig fehlerhaft sein, sondern können je nach Fragestellung spezifische Veränderungen in einem Prozess aufdecken und müssen daher anders interpretiert und verrechnet werden.

2.5.3 Soft Independent Modelling of Class Analogy SIMCA

Das SIMCA (*engl.* soft independent modelling of class analogy)-Verfahren [85, 86] wird genutzt, um multivariate Daten mithilfe der zuvor erstellten PCA-Modelle zu klassifizieren. Klassifikationsverfahren ordnen die Objekte in vorgegebene Klassen ein [87].

In der vorliegenden Arbeit wird zur Klassifizierung von Hefestämmen das SIMCA-Verfahren verwendet. Es konnte sich in den letzten Jahren in der Lebensmittelchemie etablieren, wie beispielsweise mit der richtigen Zuordnung bestimmter Lebensmittel zu bestimmten Produktklassen [88-90] oder die Untersuchung von Olivenöl auf Zusatz von Sonnenblumenöl [91].

Zunächst muss mit jedem Datensatz X eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt werden. Somit liegen die Ausgangsdaten als neuer, kompakter Variablensatz vor und bilden ein PCA-Modell. Dieses PCA-Modell soll die natürliche Varianz der Daten in dieser gebildeten Klasse (Hefestamm) repräsentieren. Sie bilden die Grundlage der SIMCA-Klassifikation (Abbildung 2-9).

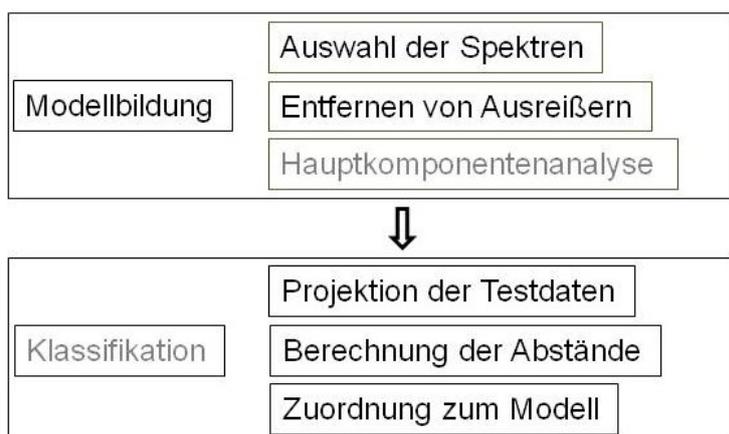


Abbildung 2-9: Schematischer Ablauf einer SIMCA-Klassifizierung

Unter dem Begriff Hauptkomponentenmodell einer Lerngruppe wird die Approximation ihrer Objektverteilung durch ihren Mittelpunkt mit einem geeigneten linearen Unterraum verstanden. Die Unterräume besitzen die Dimensionen eins beziehungsweise null, so wird von einem 1-Komponenten- beziehungsweise 0-Komponentenmodell gesprochen. Sind mehr als zwei Variablen vorhanden können höher dimensionale Unterräume (z.B. Ebenen) zur Anpassung an die Objekte einer Gruppe erforderlich sein. Im nächsten Schritt können unbekannte beziehungsweise neue Objekte (Hefestämme) mit Hilfe der berechneten Distanzen zum

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Klassenschwerpunkt (Zentroid) oder mittels umschließender geometrischer Strukturen dem Modell zugeordnet werden (Abbildung 2-10).

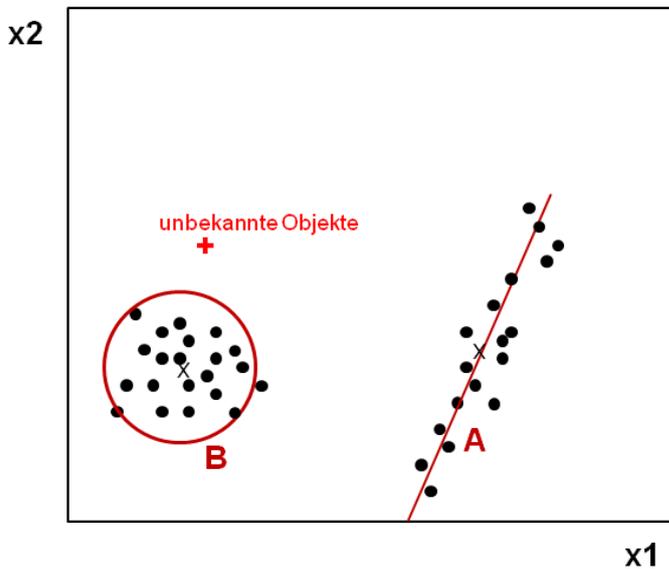


Abbildung 2-10: SIMCA-Klassifizierung: Trainingsdatensätze A und B mit ihren Datenmittelpunkten x ; Modelle werden durch eine Kreislinie (B) bzw. eine Gerade (A) begrenzt

In der Abbildung 2-10 sind zwei Objektgruppen, zum Beispiel Hefestämme A und B, mit zwei Variablen dargestellt. Bei der Objektgruppe A verläuft die Verteilung entlang einer Geraden und bei Objektgruppe B liegt eine Zufallsstreuung um den Gruppenmittelpunkt (schwarzes Kreuz) vor (Kreislinie). Die Beschreibung der Klassen kann je nach Struktur eine unterschiedliche Anzahl von Hauptkomponenten haben.

Durch das Erstellen von PCA-Modellen (Trainingsdatensatz) bekannter Objekte (Hefestämme) wird eine Hyperfläche im n -dimensionalen Raum definiert (n =Anzahl der PCs). Anschließend kann mit einem Testdatensatz geprüft werden, ob ein unbekanntes Objekt in einer der bestehenden Klassen (PCA-Modelle Hefestämme), mit einer zuvor definierten Genauigkeit, sich in dieser Fläche befindet. Wenn dies der Fall ist, wird der Testdatensatz als zugehörig zum Modell angesehen.

Für die Modellbildung ist es zuvor wichtig einen Ausreißertest mit den Daten eines Hefestammes durchzuführen, da Ausreißer die Hyperfläche unnötig erweitern würden. Die Ausreißerbetrachtung für das SIMCA-Verfahren wird in den Kapiteln 3.8 und 4.3 näher erläutert.

Das SIMCA-Verfahren gehört somit zu den Methoden des überwachten Lernens, bei dem die Einordnung der Objekte in Abhängigkeit von den vorgegebenen Klassen definiert wird. Die Regeln für eine Klassifizierung können zum Beispiel auf

statistischen Grundlagen, Entscheidungsbäumen oder neuronalen Netzen basieren [92].

Ein Vorteil der SIMCA-Methode ist, dass es praktisch keine Restriktion bezüglich der Dimensionierung der Datensätze gibt. Außerdem findet kein numerischer Abbruch statt, wenn die Variablenzahl größer ist als die Zahl der Objekte. Außerdem ist die unabhängige Behandlung verschiedener Objektgruppen möglich, wodurch zusätzliche Gruppen in das vorhandene SIMCA-Modell einbezogen werden können.

2.6 Stand der Wissenschaft

Es steht eine große Anzahl an unterschiedlichen Methoden zur Verfügung, um Hefen aufgrund von phänotypischen oder genotypischen Merkmalen zu identifizieren beziehungsweise zu differenzieren.

2.6.1 Traditionelle und molekularbiologische Verfahren

Bei den traditionellen Differenzierungsmethoden werden morphologische, physiologische und biochemische Vorgänge betrachtet, wie das Gärverhalten der Hefen (z.B. Gärleistung, Gärungsnebenprodukte), Flokkulationstests [93], Assimilierung von Kohlenstoff und Stickstoff nach J. A. Barnett [44], sowie das Wachstum auf unterschiedlichen Nährböden (Plattentest) [50, 94-96].

Diese klassischen, mikrobiologischen Analysenmethoden sind zeitintensiv und personalaufwendig. Daher gibt es die Bestrebung schnelle und zuverlässige Systeme zu entwickeln, die eine umfangreiche Diagnostik bieten.

Kommerziell erhältliche Hefeidentifizierungssysteme wie API 20C, API ID 32C (BioMérieux SA, Frankreich) oder MicroLog YT Station (Biolog, Inc., Hayward, CA), können den analytischen und personellen Aufwand minimieren, sind für den Bereich der Getränke- beziehungsweise Backhefeindustrie aber nur begrenzt einsetzbar. Eine Stammunterscheidung der gleichen Hefeart ist mit diesen Systemen nicht möglich und aufgrund der Instabilität von physiologischen Merkmalen kann dies zu unklaren Ergebnissen führen.

Aufgrund zahlreicher Forschungsarbeiten und der Entschlüsselung des Hefegenoms im Jahr 1996 [49] ist die Akzeptanz moderner molekularbiologischer Methoden in der Routineanalytik stärker gewachsen. Möglichkeiten zur Stammdifferenzierung bieten PCR (*engl.* polymerase chain reaction) basierende Techniken wie die RAPD (*engl.* randomly amplified polymorphic DNA) [97] oder die Verwendung von

amplifiziert werden. Der variable Bereich von IGS2 eignet sich aufgrund der Sequenz-Polymorphismen gut für eine Stammtypisierung. [106]

Die ITS-Sequenzierung wird in der vorliegenden Forschungsarbeit als Referenzanalytik eingesetzt.

2.6.2 Moderne Analysenansätze zur Identifizierung von Hefen

FTIR-Spektroskopie

Die Fourier transformierte Infrarot Spektroskopie (FTIR) ist eine schnelle physikochemische Methode, die zur Identifikation von Mikroorganismen genutzt werden kann [111]. Im mittleren Infrarotbereich (MIR) bei einer Wellenzahl von $\nu = 4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ können Hefen anhand ihrer funktionellen Gruppen wie Proteine, Fettsäuren und Polysacchariden identifiziert beziehungsweise differenziert werden [112, 113].

Dieses Verfahren ist gestützt auf chemometrischen Modellen und ist angewiesen auf eine zuvor entwickelte Referenzdatenbank [114]. 1988 konnten Hopkinson et al. Zusammenhänge zwischen acht Hefearten, Hybrid-Kreuzungen mit sieben von diesen und der *S. diastaticus*, aufzeigen [115]. Kümmerle et al. generierten 1998 eine Hefedatenbank spezifisch für die Anwendung im Lebensmittelbereich. Sie enthielt bereits 74 verschiedene Arten von 18 Gattungen [50]. Timmins et al. waren 1998 in der Lage, mit Hilfe der Diskriminanzanalyse 22 Brauhefen zu differenzieren und eine erfolgreiche Stammunterscheidung durchzuführen [50, 112].

Neue Arbeiten auf diesem Gebiet zeigen Differenzierungsansätze im Bereich der getränkerelevanten Hefen [116]. Im Fokus dabei stehen Nicht-*Saccharomyces* und *Saccharomyces* Hefearten. M. Hutzler konnte in seinen Arbeiten durch die Kombination FTIR und Real-Time PCR Hefestämme identifizieren und diese verschiedenen Arten zuordnen [116].

Peptide Mapping

Eine weitere Methode nutzt zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen die Kombination aus Massenspektrometrie und einer statistischen Datenbank-Auswertung. Ein bekanntes Verfahren ist das peptide mapping (Peptid-Kartierung). Die Proteine werden mit Hilfe einer 2D-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend enzymatisch verdaut. Die erhaltenen Peptide können mit der Massenspektrometrie

analysiert werden. Das gemessene Massenspektrum wird mit einer Proteinsequenz-Datenbank (z. B. Mascot) abgeglichen und die Ergebnisse entsprechend der Übereinstimmungen aufgelistet. Bei solch einer extern genutzten Datenbanksuche muss beachtet werden, dass die Ergebnisse auf statischen Faktoren beruhen. Eine kritische Betrachtung der Ergebnisse ist daher wichtig und ein Abgleich mit bekannten Daten notwendig.

Die Hefeidentifizierung ist eine der großen Herausforderungen in der Mikrobiologie. Viele der traditionellen und molekularbiologischen Methoden wie die PCR - RFLP [117-119] (Kapitel 2.6.1) sind etablierte Systeme in der Analytik. Jedoch sind sie meist sehr zeit- und kostenintensiv [120]. Kommerziell erhältliche Hefeidentifizierungssysteme (Kapitel 2.6.1), für den Bereich der Getränke-beziehungsweise Backhefeindustrie, sind für eine Stammunterscheidung gleicher Hefearten, aufgrund der Instabilität von physiologischen Merkmalen [121], nur begrenzt einsetzbar. Daher ist eine schnelle und exakte Identifikation mittels neuer Analysetechniken in der Forschung von großem Interesse.

Die Entwicklung des MALDI-TOF-MS ist in den letzten Jahren rasant vorangeschritten. Durch die Möglichkeit der exakten Massenbestimmung von Peptiden und Proteinen hat diese Technik einen hohen Stellenwert im klinischen [42, 43, 122-128] sowie pharmazeutischen Bereich [42, 43, 126, 129, 130, 128] eingenommen. Marklein et al. (2009) haben mittels MALDI-TOF-MS verschiedene klinisch relevante Hefen der Gattungen *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Magnusiomyces* und *Galactomyces* sowie unterschiedliche Bakterien identifizieren können [42]. Zur Erstellung spezifischer Fingerprints werden oft die ribosomalen Proteine untersucht. Sie werden konstitutiv exprimiert und eignen sich daher gut für die Analytik [131]. Die Differenzierung von industriell genutzten Hefeisolaten ist limitiert.

R. E. Sherburn und R. O. Jenkins (2003) untersuchten Unterschiede zwischen *Candida spp.* und verschiedenen *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen [131]. Durch die gezielte enzymatische Behandlung der Zellwände konnten sie erste Differenzierungsansätze erreichen [131].

Kern et al. (2013) konnten erste erfolgreiche Forschungsansätze mit *Lactobacillus brevis* Spezien [4] und anderen Bierschädlingen wie *Pediococcus clausenii* und *Leuconostoc mesenteroides* [5] durchführen.

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Usbeck et al. (2014) sowie A. Kántor und M. Kačániová (2015) untersuchten Weinhefen [6, 7].

Viele Forschungsansätze beziehen sich überwiegend auf Laboransätze. Die Propagation von Hefen in Industriefermentern oder Propagationstanks kann beziehungsweise muss nicht identisch mit denen im Labor sein. Moothoo-Padayachie et al. (2013) zeigten, dass schon die Kultivierung von Hefen in unterschiedlichen Labornährmedien zu einer Veränderung der Massenspektren führen kann [133].

2.7 Forschungsziel

In der vorliegenden Arbeit soll ein innovatives Analyseverfahren zur Identifizierung und Klassifizierung von verschiedenen *Saccharomyces*- und Nicht-*Saccharomyces* Hefestämmen der Brau- und Backhefeindustrie etabliert werden. Dafür sollen auf Proteomebene spezifische Protein-Fingerprints der verschiedenen Hefestämme detektiert und statistisch dargestellt werden.

Im ersten Teil der Arbeit soll zur Detektion der ribosomalen Proteine der ausgewählten untergärigen und obergärigen Kulturhefen *S. cerevisiae* und *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) sowie von den Fremdhefen *Pichia membranifaciens* und *S. diastaticus* eine notwendige Adaption und Weiterentwicklung bereits etablierter diagnostischer Methoden [134] mittels MALDI-TOF-MS durchgeführt werden.

Dazu muss überprüft werden, ob die extrahierten Proteine der verschiedenen Hefestämme detektierbar sind. Zu diesem Zweck werden verschiedene Target-Materialien sowie die Verwendung verschiedener Matrices getestet, um Einflüsse auf die Analyse der Hefeproteine zu charakterisieren.

Bei der MALDI-TOF-MS-Analytik ist die Probenvorbereitung besonders wichtig, da die Probenhomogenität auf dem Target die Reproduzierbarkeit der Massenspektren beeinflusst. Im Fokus steht die Entwicklung einer schnellen und einfachen Probenaufbereitung, die eine mögliche Etablierung als Schnellanalytik erlaubt.

Aufgrund der nahen Verwandtschaft der untersuchten Hefestämme muss ein mathematisches Klassifizierungsmodell verwendet werden, welches Zusammenhänge der verschiedenen Hefespezies darstellen kann sowie eine Differenzierung auf Stamm- und Artebene erlaubt.

In einem weiteren Teil der Arbeit wird der Einfluss verschiedener Wachstumsstadien der Hefestämme auf die generierten Massenspektren betrachtet. Hierzu soll ein standardisiertes Hefeanzuchtverfahren verwendet werden. Geprüft werden soll ob eine Klassifizierung der Stämme abhängig von den eingesetzten Nährmedien erreichbar ist. Die Möglichkeit eine Variabilität der charakteristischen Protein-Fingerprints herauszuarbeiten, wäre für die Industrie von großem Interesse.

Insbesondere für die Prozessüberwachung während der Propagation ist der Status der eingesetzten Hefen von Bedeutung. Die Ergebnisse der entwickelten

FORSCHUNGSZIEL

Klassifizierungsmodelle sollen statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt werden.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Laborversuche sollen Differenzierungsansätze von industriellen Hefepropagationen aus der Brauerei- und Backhefeindustrie getestet werden.

Zur Überprüfung der Forschungsergebnisse muss begleitend eine geeignete Referenzanalytik ausgewählt und verwendet werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen

Es wurden handelsübliche Chemikalien des Reinheitsgrades pro analysis (*lat. p.a.*) verwendet.

Tabelle 3-1: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen

Chemikalie	Bezugsquelle
Acetonitril	Fluka Analytical, München
alpha-D-Glucose	Serva, Heidelberg
Ameisensäure	Sigma-Aldrich®, München
Ammoniumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Biotin	Roth, Karlsruhe
Calcium-D-pantothenat	Merck, Darmstadt
Coomassie-Brilliant-Blau G250	Sigma-Aldrich®, München
Eisen-(II)-sulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich®, München
Glukose	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Isoton	©2014 VWR International, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
Lysepuffer Propidiumiodid	ChemoMetec A/S®, Dänemark
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Mangan-(II)-chlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Ameisensäure	Fluka Analytical, München
myo-Inositol	Merck, Darmstadt
Natriumglutamat	AppliChem, Darmstadt
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
ortho-Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Pepton	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	ChemoMetec A/S®, Dänemark
Pyridoxine, Hydrochloride	Alfa Aesar, Thermo Fisher (Kandel) GmbH, Karlsruhe
Stickstoff gasförmig N ₂ (99,8 %)	PRAXAIR, Erfurt
Thiamine, Hydrochloride	Calbiochem, Merck

3. MATERIAL UND METHODEN

Chemikalie	Bezugsquelle
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich®, München
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
α -Cyano-4-hydroxymizsäure	Bruker Care und Fluka Analytical

Tabelle 3-2: Rohstoffe für Hefepropagation

Rohstoffe	Bezugsquellen
Industriewürze	deutsche Brauerei
Malzextrakt	Weyermann®
Melasse (Mischung Rüben- und Rohrzucker)	Versuchsanstalt der Hefeindustrie e.V.

Tabelle 3-3: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterial	Bezugsquellen
96 Well ELISA Microplates, PS, U-bottom, MICROLON® 200, med. Binding	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich
Allgemeine Laborglaswaren	DURAN® bzw. Schott, Mainz
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav Certomat®U	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Dampfsterilisatoren <i>Varioklav</i> ®	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim
Falcon Tube, Typ E005, 50 mL	VWR International GmbH, Darmstadt
Feinwaage Basic BA1105	Sartorius AG, Göttingen
Filter 0,2 μ m Millipore Millex®	Merck Millipore, Darmstadt
fusselfreie Taschentücher	VWR International GmbH, Darmstadt
Bunsenbrenner Labogaz® 206	VWR International GmbH, Darmstadt
Grobwaage	Sartorius AG, Göttingen
Impföse	VWR International GmbH, Darmstadt
Horizontalschüttler Certomat SII	Sartorius AG, Göttingen
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena
Mikrowelle	Privileg, USA
<i>NucleoCassette</i> ™	ChemoMetec A/S®, Dänemark
NucleoCounter®YC-100™	ChemoMetec A/S®, Dänemark
Pipetten Eppendorf Research plus 0,1-2,5 μ L	Eppendorf AG, Hamburg
Mehrkanal-/Pipetten <i>Transferpette</i> ® S 100-1000 μ L / 20-200 μ L / 10-100 μ L	Brand GmbH + CO KG, Wertheim
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg

3. MATERIAL UND METHODEN

Geräte und Verbrauchsmaterial	Bezugsquellen
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard 2-200 µL; 50-1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße DNA/RNA LoBind 0,5 mL; 1,5 mL; 2,0 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Schikanekolben GL 45, 4 Bodenschikanen, mit Membranverschluss und Ausgießring aus PP	SCHOTT-DURAN®, Mainz
Spektralphotometer SpectraMax M2	©2016 Molecular Devices, LLC, USA
Target MTP 384 polierter Stahl	Bruker Corporation, Bremen
Vortexer Janke & Kunkel VF2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Vortexer, peQWIST	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Wasseraufbereitungssystem MilliPore Direct-Q® 3 UV mit Pumpe	Merck Millipore, Darmstadt
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge Heraeus Sepatech Biofuge 13	Thermo Scientific, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen: Nalgene, Oak Ridge Tube mit Schraubverschluss aus Polypropylene Copolymer, 10 mL	Thermo Scientific, Karlsruhe

Tabelle 3-4: Kalibrierstandards

Standard	Bezugsquellen
Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin BSA)	Sigma-Aldrich®, München
Escherichia coli „Bruker Bacterial Test Standard“	Bruker Daltonik GmbH

3.2 Hefestämme

Die während dieser Arbeit verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 3-5 dargestellt. Diese wurden von der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V., der Versuchsanstalt der Hefeindustrie e.V. sowie einer deutschen Großbrauerei zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3-5: Verwendete Hefestämme

Spezies	Stamm- Nr.		Quelle
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.200	obergärige Kulturhefe	VH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.152	obergärige Kulturhefe	VH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.129	obergärige Kulturhefe	VH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.119	obergärige Kulturhefe	VH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.068	obergärige Kulturhefe	VH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.045	obergärige Kulturhefe	VH

3. MATERIAL UND METHODEN

Spezies	Stamm-Nr.		Quelle
<i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>)	ug1	untergärige Brauhefe übliche Produktionshefe	VLB
<i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>)	ug2	untergärige Brauhefe übliche Produktionshefe	VLB
<i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>)	ug3	untergärige Brauhefe übliche Produktionshefe	VLB
<i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>)	ug6	untergärige Brauhefe übliche Produktionshefe	VLB
<i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>)	ug7	untergärige Brauhefe übliche Produktionshefe	VLB
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>Diastaticus</i>	SF-d1	<i>Saccharomyces</i> -Fremdhefe obligater Bierschädling	VLB
<i>Pichia membranifaciens</i>	NSF-P1	Nicht- <i>Saccharomyces</i> -Fremdhefe indirekte Bierschädling	VLB
<i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>)	A	untergärige Brauhefe übliche Produktionshefe	deutsche Brauerei
<i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>)	B	untergärige Brauhefe übliche Produktionshefe	deutsche Brauerei

3.3 Nährmedien und Anzucht der Hefestämme

3.3.1 Nährmedien

Die Nährmedien werden vor der Verwendung im Autoklaven sterilisiert und maximal für drei Tage im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

SD-Medium (synthetic defined) modifiziert nach B. H. Olson und M. J. Johnson [135]

Tabelle 3-6: Zusammensetzung des SD-Mediums

Substanz	Konzentration [g/L]	Stammlösung	Zugabe zu 1 L Grundmedium
Grundmedium			
Magnesiumsulfat-heptahydrat	0,25		0,25 g
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	1,00		1,00 g
myo-Inositol	0,075		0,075 g
ddH ₂ O			833,00 mL
C-Quelle		10x	
alpha-D-Glucose	50,00	500 g/L	100 mL

3. MATERIAL UND METHODEN

Substanz	Konzentration [g/L]	Stammlösung	Zugabe zu 1 L Grundmedium
Puffer-/C und NH₄-Quelle		40x	
Natriumglutamat	10,00	400 g/L	25 mL
Puffer		25x	
Ammonium-dihydrogenphosphat	6,00	150 g/L	40 mL
Kalium-dihydrogenphosphat	2,00	5 g/L	
Spurenelementlösung		1000x	
Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat	1,00E-04	0,01 g/ 100 mL	1 mL
Eisen-(II)-sulfat-Heptahydrat	5,00E-04	0,05 g/ 100 mL	
Mangan-(II)-chlorid-Dihydrat	1,00E-04	0,01 g/ 100 mL	
Natrium-molybdat-Dihydrat	1,00E-04	0,01 g/ 100 mL	
Zinksulfat-Heptahydrat	1,75E-03	0,175 g/ 100 mL	
Vitaminlösung		1000x	
Biotin	2,00E-05	0,02 g/L	1 mL
Calcium-D-pantothenat	5,00E-04	0,50 g/L	
Thiamine, Hydrochloride	4,00E-03	4,00 g/L	
Pyridoxine, Hydrochloride	1,00E-03	1,00 g/L	

→ auf 1 L mit H₂O_{Reinst} auffüllen

→ pH 5,8

YEPD-Medium

(Yeast Extract Peptone Dextrose)

8,0 g/L Pepton (Casein, tryptisch verdaut)

2,0 g/L Hefeextrakt

50,0 g/L Glukose

2,0 g/L KH₂PO₄

1,0 g/L Magnesiumsulfat x 7H₂O

→ auf 1 L mit H₂O_{Reinst} auffüllen

YED-Medium

(Yeast Extract Dextrose)

1,0 g/L Hefeextrakt

50,0 g/L Glukose

→ auf 1 L mit H₂O_{Reinst} auffüllen

Würzen

12 % Stammwürze (Weyermann® Malzextrakt 72-79 % Extrakt)

18 % Stammwürze (Weyermann® Malzextrakt 72-79 % Extrakt)

Der flüssige Malzextrakt wird mit kochendem Wasser verdünnt und die Stammwürze eingestellt. Nach dem Abkühlen kann die Hefegabe erfolgen.

Bierwürze (hergestellt von deutscher Großbrauerei)

Wasser, Gerstenmalz, Hopfenextrakt

Melasse

- Mischung aus Rüben- und Rohrzuckermelasse

Die Rohmelasse (80 %TS) wird mit Wasser auf ein Gehalt von circa 40-46 %TS verdünnt und mit Schwefelsäure auf ein pH-Wert von 4,7-5,2 eingestellt. Anschließend wird durch Einleiten von Direktampf die Melasselösung erhitzt und bei 123 °C für 90 s sterilisiert. Trubstoffe werden durch Schlammseparatoren abgetrennt und die blanke Melasse über Zwischentanks den Hefefermentern zugeführt.

3.3.2 Anzucht der Hefekulturen im Labor

Vorkultur

Die verwendeten Hefestämme werden aus einer Dauerkultur oder von einer Einzelkolonie vom Schrägagarröhrchen mit einer sterilen Impföse entnommen und in jeweils 100 mL Flüssigkultur (SD, YED, YEPD, Würze, Melasse) im Schikanekolben überführt. Die Anzucht erfolgt bei 28 °C auf einem Horizontalschüttler bei 160 rpm in einer Klimakammer.

Hauptkultur

Nach 48 h wird ein definiertes Volumen an Vorkultur steril entnommen und in frisches Flüssigmedium überführt. Die Gesamtzellzahl beträgt 1×10^6 Zellen/mL. Die Hauptkultur wird bei 160 rpm horizontal geschüttelt und bei 28 °C inkubiert. Je nach Analysenbedarf können die Hefen nach einer bestimmten Kultivierungszeit steril entnommen werden.

3.3.3 Stell- und Versandhefefermentation

Batch-Fermentation zur Herstellung der Stellhefe

Zur Erzeugung von genügend Animpfbiomasse werden in jeweils zwei Reinzuchtschritten (Labormaßstab) Hefen angezogen. Der zweite Reinzuchtschritt dient gleichzeitig zum Start der Stellhefefermentation. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine reine Batch-Fermentation in 25 L Fermentern (Abbildung 4-51), die auf eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit (18-20 h) der jeweiligen Hefe ausgelegt ist. Die Fermentation startet bei einem pH-Wert von circa 4,6 der Melasselösung bei 30 °C. Während des Prozesses wird der pH-Wert mit Salzsäure reguliert, die Temperatur und die Belüftung nach Bedarf gesteuert. Am Ende des Fermentationsverlaufs liegt der pH-Wert bei rund 4,7. Der gesamte Zucker ist im Medium verbraucht und die Hefetrockensubstanz liegt bei 10-15 g HTS/L. Die Stellhefe wird geerntet, gewaschen und zentrifugiert und anschließend in die Versandhefefermentation gegeben. Der Proteingehalt liegt bei 55-60 %.

Versandhefefermentation

Nach der Zugabe der Stellhefe zur frischen Melasse soll unter kontrollierten Bedingungen eine maximale Hefeausbeute von 100 g HTS/L erreicht werden. Bei diesem 16 h-Verfahren wird zunächst nur eine geringe Menge an Melasse vorgelegt und der Rest unter Ethanol-kontrolliertem Melasse-Feed zugegeben. Eine Ethanolbildung muss vermieden werden (EtOH-Konzentration max. 0,3 %), um eine optimale Hefeausbeute je Gramm Zucker (HTS/g Zucker) zu erzielen. Gestartet wird der Prozess bei einem pH-Wert von 4,7. Auch bei diesem Fermentationsverlauf wird der pH-Wert mittels Salzsäure reguliert. Die Temperatur befindet sich im Bereich von 32 °C. Zum Ende des Prozesses wird die Salzsäuregabe gestoppt und der pH-Wert steigt auf einen Wert bis pH 6,0 an. Die Belüftung in den Fermentern wird ebenfalls hochgeregelt. Das Endvolumen der Versandhefefermentationen beträgt circa 10,5 L. Die Hefe wird geerntet, gewaschen und als Hefecreme verwendet. Der Proteingehalt der Versandhefen lag bei den eingesetzten Hefestämmen im Bereich von 41–43 %.

3.3.4 Hefepropagation in der Brauerei

Die Propagation sowie die Bereitstellung der verschiedenen Industriehefen A und B konnte durch die Zusammenarbeit mit einer deutschen Brauerei realisiert werden. Die Hefepropagation und die verschiedenen Hefeführungen sind nach gängigen

Standardverfahren Deutscher Brauereien durchgeführt worden und sind somit repräsentativ.

3.4 Gesamtzellzahlbestimmung mittels NucleoCounter®YC-100™

Für die Herstellung der verschiedenen Hefekulturen sowie für die Ermittlung der Gesamtzellzahl während des Hefewachstums wird ein definiertes Volumen Zellsuspension in ein 1 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension muss auf eine Konzentration zwischen 1×10^5 bis 1×10^7 Zellen/mL (optimaler Messbereich) verdünnt werden. Anschließend wird der Lysispuffer Propidiumiodid zugegeben. Der Gesamtverdünnungsfaktor der Ausgangszellzahl liegt bei 1:10 beziehungsweise 1:100. Die Probe wird mittels Vortexer homogenisiert und 50 µL des Zelllysats in die NucleoCassette geladen. Nach dem Einsetzen der Kassette in den NucleoCounter®YC-100™ wird nach circa 30 s die Gesamtzellzahl (Zellen/mL) angezeigt. Je nach Analysenbedarf werden Proben als Doppelbestimmung steril entnommen und die Gesamtzellzahl ermittelt.

3.5 Aufbereitung der Hefezellen – Proteinextraktion

3.5.1 Proteinextraktion der Laborhefekulturen

Die beimpften Nährmedien (Kapitel 3.3.1) werden je nach Analysenbedarf unterschiedlich lang kultiviert. Mindestens zwei sterile Proben Zellsubstrat je Schikanekolben werden steril entnommen. Mittels NucleoCounter®YC-100™ wird die Gesamtzellzahl der Hefesuspensionen bestimmt (Kapitel 3.4), um anschließend eine definierte Gesamtzellzahl von 1×10^8 Zellen/mL über einen Verdünnungs- oder Aufkonzentrierungsschritt zu erreichen.

Die 1 mL Zellsuspension wird mit 1 mL 99,9 % EtOH versetzt und gemischt. Anschließend wird sie für 5 min bei 20 °C mit 6000 rpm ($2822.4 \times G$) zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig mittels Pipette abgenommen und verworfen. In einem weiteren Waschschrift wird das Zellpellet mit 1 mL 75 % EtOH resuspendiert.*^{3.5.2}

Danach wird erneut bei 20 °C mit 6000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet 1 min lang mit 13000 rpm ($13249.6 \times G$) zentrifugiert. Der klare Überstand wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Zellpellet unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Im nächsten Schritt erfolgt der Zellaufschluss im sauren Milieu. Das Zellpellet wird mit 100 µL einer Mischung aus 70 % Ameisensäure

3. MATERIAL UND METHODEN

und 99,9 % Acetonitril (1:1) versetzt, resuspendiert und für 1 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend wird für 8 min bei 20 °C mit 13000 rpm zentrifugiert. Das Lysat mit den darin extrahierten Hefeproteinen wird in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß überführt. (Nächste Schritte 3.7.2 Matrix- und Präparationsmethode.)

3.5.2 Proteinextraktion aus Praxisproben

(Stell- und Versandhefen, Hefestämme aus Brauereipropagation)

Aus den verschiedenen Prozessstufen der industriellen Propagation oder Fermentation werden steril mindestens 100 mL Hefesuspension entnommen. Zunächst muss die Gesamtzellzahl (nach Kapitel 3.4 Gesamtzellzahlbestimmung mittels NucleoCounter®YC-100™) ermittelt und die Hefesuspension auf eine definierte Zellzahl von 1×10^8 Zellen/mL eingestellt werden.

Jeweils 0,5 mL der Hefesuspension werden in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL Leitungswasser versetzt und gemischt. Die Lösung wird für 1 min bei 20 °C mit 6000 rpm zentrifugiert. Der wässrige, braune Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 1 mL 1 N HCL resuspendiert. Anschließend wird nochmals für 1 min bei 20 °C mit 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Danach folgt der letzte Waschschrift mit 1 mL 75 % EtOH.

Die weiteren Aufarbeitungsschritte erfolgen analog wie in Abschnitt 3.5.1 Proteinextraktion der Laborhefekulturen (mit einem * gekennzeichnet).

3.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Gerät: Spektralphotometer SpectraMax M2, Molecular Devices GmbH

Software: SoftMax® Pro

Die Proteinkonzentration der verschiedenen extrahierten Proben wird nach M. M. Bradford [136] ermittelt. 20 µL Probe werden dafür in eine 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 180 µL Bradford-Reagenz (100 mg Coomassie-Brilliant-Blau G250/ 50 mL EtOH/ 100 mL 85 % H₃PO₄/ auf 1 L H₂O_{Reinst}) vermischt. Nach 10 min Reaktionszeit erfolgt die Messung am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Probe wird als Dreifachbestimmung gemessen. Die Proteinkonzentration wird durch die Erstellung der Kalibriergeraden (Kalibrierpunkte: 0 µg/mL; 5 µg/mL;

10 µg/mL; 20 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL; 200 µg/mL; 1000 µg/mL) mit dem Proteinstandard Rinderserumalbumin (BSA) ermittelt.

3.7 MALDI-TOF-MS Analyse

3.7.1 Kalibrierung des MALDI-TOF-MS-Systems

Die Massenkalisierung erfolgte mit dem Bruker Bacterial Test Standard (BTS), welches ein typisches E. coli DH5alpha Peptid- und Proteinprofil im Bereich von 3,6–17 kDa aufweist. Die BTS-Lösung wird nach dem Präparationsschema der Firma Bruker Daltonics GmbH hergestellt (Anhang 7.1). Es enthält die folgenden acht Proteine, die den Massenbereichen zwischen 3600 Da bis 17000 Da abdecken: RL29[M+2H]²⁺ (3637,8 Da), RS32[M+H]⁺ (5096,8 Da), RS34[M+H]⁺ (5381,4 Da), RS33meth[M+H]⁺ (6255,4 Da), RL29[M+H]⁺ (7274,5 Da), RS19[M+H]⁺ (10300,1 Da), RNase[M+H]⁺ (13683,2 Da) und Myoglobin[M+H]⁺ (16952,3 Da).

3.7.2 Matrix- und Präparationsmethode

Matrix

α-Cyano-4-hydroxycimtsäure (HCCA) Präparation mit "reverse thin layer"- Methode

2,75 mg HCCA werden in 700 µL Acetonitril (ACN), 285 µL H₂O_{Reinst} und 15 µL Trifluoressigsäure (TFA) gelöst (= OSIII). Diese Matrixlösung wird standardmäßig für die Untersuchung der Proteinlösungen mittels MALDI-TOF-MS verwendet.

Präparation

1 µL der extrahierten Proteinlösung (Kapitel 3.5.1, 3.5.2) werden jeweils auf drei Spots des hochpolierten Stahltargets beziehungsweise Proben-teller (Bruker Daltonics GmbH) aufgetragen und bei Raumtemperatur für circa 30 s getrocknet. Anschließend werden jeweils 1,5 µL der organischen Matrixlösung HCCA auf die präparierten Spots aufgetragen. Das Lösungsmittel verdampft und eine teilkristalline Schicht entsteht (Abbildung 3-1).

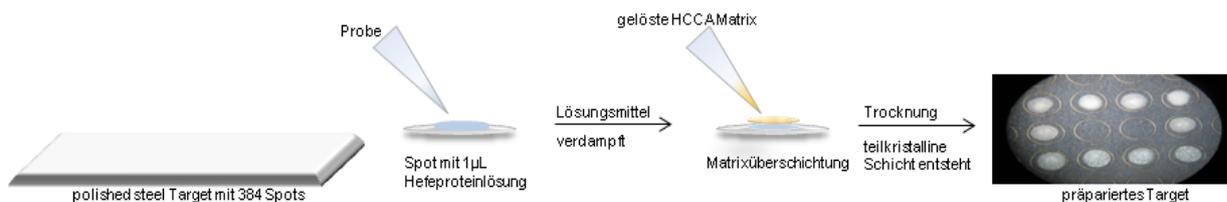


Abbildung 3-1: Schematischer Verlauf der Probenpräparation

Alle in dieser Arbeit verwendeten Edelmetalltargets wurden vor dem Gebrauch nach der Anleitung „hartes“ Reinigungsverfahren (Bruker Daltonics GmbH) gereinigt (Anhang 7.2).

3.7.3 Aufnahme der Massenspektren

Gerät: Bruker autoflex speed™ LRF MALDI-TOF, smartbeam™-II laser,
Nd/YAG Laser 355 nm, 1 kHz, MCP Detektor,
Bruker Daltonics GmbH, Bremen

Geräteeinstellung: siehe Anhang 7.3

Software: FlexControl 3.3 (Build 108), Bruker Daltonics GmbH, Bremen
FlexAnalysis 3.3 (Build 80), Bruker Daltonics GmbH, Bremen

Manuelle MALDI-TOF-MS Messungen

Nach der Probenpräparation wird das Target in das Hochvakuum des Bruker autoflex speed™ LRF MALDI-TOF-MS eingeschleust. Die Messungen finden im positiven linearen Modus mit einem Nd/YAG (Neodym dotierter Yttrium Aluminium Granat)-Laser statt (Geräteparameter Anhang 7.3). Die Probenspots werden mit jeweils 10 mal 100 Laserschüssen (1000 Einzelspektren pro Spot) beschossen und gemessen. Die Summenspektren werden gespeichert und in FlexAnalysis 3.3.80 (Bruker Daltonics GmbH) weiter bearbeitet.

Automatisierte MALDI-TOF-MS Messungen

Die zu analysierenden Spots auf dem präparierten Target werden zunächst in der FlexControl 3.3.108 Software ausgewählt und die Anzahl der Messungen vorgegeben. Die benötigte Laserenergie wird ermittelt sowie das Abtastmuster des Lasers vorgegeben (Methodeneinstellungen AutoXecute, Anhang 7.4). Die zu analysierenden Spots werden hexagonal mit dem Laser abgerastert (Abbildung 3-2).

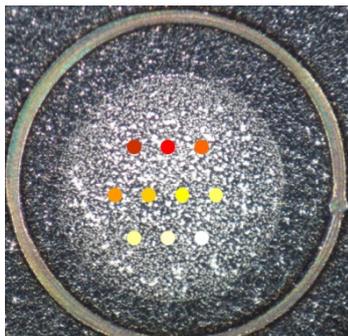


Abbildung 3-2: Hexagonales Abtastmuster (weiß nach rot) auf Target MTP 384 polierter Stahl mit extrahierter Proteinprobe und HCCA-Matrix

Jeder Spot wird mindestens dreimal mit einer Abtastrate von 10 mal 100 Laserschüssen gemessen. Die Summenspektren werden in der FlexAnalysis 3.3.80 Software gespeichert.

3.8 Auswertung der MALDI-TOF-MS-Spektren

Software: FlexAnalysis 3.3 (Build 80), Bruker Daltonics GmbH, Bremen
The Unscrambler® X 10.1, © 2009-2011, CAMO Software AS, NOR
Origin 8.5.1G SR2, © 1991-2011, OriginLab Corporation

3.8.1 Datenvorbehandlung

Die statistische Auswertung der MALDI-TOF-MS-Spektren der zu analysierenden Hefeproteine wird auf den Fingerprintbereich von 2000,36 bis 12999,34 Da beschränkt.

Basislinienkorrektur

Die jeweils 1000 aufsummierten Rohspekten werden als ein Summenspektrum weiter verwendet. Wie bereits beschrieben (Kapitel 2.5.1) wird das Rohspektrum zunächst in dem Bruker Softwareprogramm FlexAnalysis 3.3 (Build 80) (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) einer Basislinienkorrektur unterzogen. Die Grundlinie wird mit der top-hat Funktion [76] subtrahiert.

Glätten

Anschließend werden die Analysendaten in das Statistikprogramm The Unscrambler® X 10.1 (©2009-2011, CAMO Software AS, NOR) importiert und die basislinienkorrigierten Spektren mittels dem SavitzkyGolay-Algorithmus (smoothing

points: left side 3; right side 3; number of smoothing points 7; symmetric kernel) geglättet.

Normierung

Um eine Vergleichbarkeit der spektralen Daten der unterschiedlichen Proben der Hefen zu ermöglichen, wird eine Flächennormierung der Spektren durchgeführt. Jedes Spektrum wird durch den Wert der integrierten Intensitäten dividiert, damit die Fläche des Spektrums gleich Eins wird (Flächennormierung).

Mittelwertzentrierung

Der Spaltenmittelwert (The Unscrambler® X „Mean center data“) aller Intensitäten wird von jedem Massenspektrum subtrahiert und dadurch das Zentrum des jeweiligen Datensatzes in den Koordinatenursprung verschoben. So werden die Unterschiede der verschiedenen Spektren untereinander deutlicher hervorgehoben und nicht die absoluten Intensitäten der Spektren.

3.8.2 SIMCA

Die mittenzentrierte Datenmatrix besteht aus n Zeilen (n Proben) und 11.356 Spalten (Fingerprint m/z-Bereich von 2000,36-12999,34 Da). Bevor ein spezifisches und verlässliches Hefestamm-Modell erstellt werden kann, muss jeder Datensatz von Ausreißern bereinigt werden.

Entfernung von Ausreißern

Für die Ausreißerbetrachtung wird für jeden Datensatz eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und für jedes Spektrum der Abstand zum Modell sowie der Einfluss auf das Modell ermittelt (Kapitel 4.2).

Modell-Bildung

Für jeden Hefestamm muss ein Modelldatensatz erstellt werden, der als Trainingsdatensatz (Trainingsstämme) die gesamte Varianz des spezifischen Hefestammes repräsentiert und damit die typischen Eigenschaften des Modells widerspiegelt. Dies wird mit den Softwaretools von The Unscrambler® X 10.1 „model distance“ und „modeling power“ durchgeführt (Kapitel 4.3, 4.4).

Die Klassifizierungsmodelle werden mit dem SIMCA-Algorithmus von The Unscrambler® X 10.1 erstellt. Mit Hilfe von Testdatensätzen wird das Modell-System auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit getestet. Zu beachten ist, dass die Testdatensätze unabhängig von dem erstellten Modell-System sind.

Klassifizierung unbekannter Hefeproben

Um das Maß für die Zugehörigkeit eines unbekanntes Hefestammes zu einem bestimmten Hefestamm zum SIMCA-Modell vorherzusagen, werden die unbekanntes Hefeproben in den Datenraum der zuvor erstellten Klassen (Hefestämme) projiziert. Die Spektren der unbekanntes Proben werden mit Hilfe des Coomans Plot (Kapitel 4.4.1) aufgrund der berechneten Distanzen zu den jeweiligen Modell-Klassen (Hefestämme) zugeordnet.

3.9 Molekularbiologische Referenzanalytik

3.9.1 Sequenzierung mittels ITS-Primern

Mit Hilfe der Polymerasen Kettenreaktion (*engl.* Polymerase Chain Reaction PCR) und einer anschließenden Nukleotidsequenzierung wurden in der spezifischen ITS1-5.8S-ITS2-Region (internal transcribed spacer) Polymorphismen (Auftreten mehrerer Genvarianten innerhalb einer Population) zwischen den verwendeten Hefestämmen untersucht. Verwendet wurden die Primer ITS1 und ITS4 (Tabelle 3-7) nach White et al. 1990 [106].

Tabelle 3-7: Verwendete Forward und Reverse Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)	Guanin und Cytosin-Gehalt (%)	Schmelzpunkt (°C)
ITS1 (for)	TCCGTAGGTGAACCGCGG	19	63	61
ITS4 (rev)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	45	55

Die Sequenzierung erfolgte bei der Igc-genomics GmbH.

3.9.2 genetische Fingerprint δ 12/21-Primer

Für die Referenzanalytik wurde die Differenzierung der Hefestämme mit Hilfe des genetischen Fingerprints verschiedener δ -Primer realisiert. Hefen besitzen wiederkehrende DNA-Abschnitte im Genom. Diese DNA-Sequenzen (δ -Elemente)

3. MATERIAL UND METHODEN

haben circa eine Länge von 300 bp und flankieren das TY1-Retrotransposon [137]. Das Genom der *S. cerevisiae* besitzt 100 Kopien dieser δ -Elemente, welche spezifisch verteilt sind. Aufgrund der unterschiedlichen Verteilungen innerhalb der Stämme kann mit spezifischen δ -Primern eine Stammunterscheidung anhand der unterschiedlichen Fragmentmuster erreicht werden. Die verwendete Methode basiert auf Ness et al. (1993) [138], bei der mit δ 12/21-Primern, deren Bindestellen die δ -Elemente sind, DNA-Abschnitte vervielfältigt werden. Durchgeführt wurde die Analyse von der Fachabteilung Bioprozesstechnik und Angewandte Mikrobiologie (BEAM) der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.

4. Ergebnisse und Diskussion

In dem folgenden Kapitel werden die erzielten Ergebnisse der Arbeit vorgestellt und beziehungsweise auf die formulierten Ziele in Kapitel 2.7 diskutiert.

Im ersten Teil des Kapitels wird die Systementwicklung dargestellt. Iterativ wurden verschiedene Targets, Matrices sowie unterschiedliche Lösungsmittel- und Analytenverhältnisse getestet und die MALDI-TOF-MS Parameter angepasst.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen folgte die Entwicklung einer Aufarbeitungsmethode, mit dem Ziel, die extrahierten Hefeproteine signifikant zu detektieren und die Massenspektren in Form von spezifischen Protein-Fingerprints zur Differenzierung unterschiedlicher Hefestämmen zu nutzen.

4.1 Methodenentwicklung

Eine Vielzahl an unterschiedlichen chemischen sowie technischen Parametern können die MALDI-TOF-MS-Spektren beeinflussen. Ein wichtiger Aspekt ist das Löslichkeitsverhalten des Analyten und der Matrix. Nur durch ein optimal abgestimmtes Analyt-Matrix-Verhältnis kann eine gute Ionisierung der Analyten erfolgen und somit ein möglicher Differenzierungseffekt erreicht werden. Wichtig hierfür ist die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels, welches in Verbindung mit der Matrix beziehungsweise mit den Hefeproteinen gleichmäßig verdunstet und eine gute Homogenität bei der Kristallisation des Analyt-Matrixsystems erreicht.

Des Weiteren beeinflussen neben dem Analyt-Matrix-Verhältnis [139] der pH-Wert [140, 141], Metallsalze [142], Gegenionen [143], die Auftragungsdichte beziehungsweise die Auftragungsmethode die Ionenbildung und damit die Messungen.

Ebenfalls sind die Geräteparameter wie die Laserenergie und die Detektorspannung des MALDI-TOF-MS zu beachten. Die gezielte Anpassung der Laserenergie entsprechend dem Analyt-Matrix-Komplex kann zu einer Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (S/N) führen.

Dieses komplexe System weist viele kritische Aspekte auf, die vor einer erfolgreichen Methodenentwicklung optimiert werden müssen.

4.1.1 Target- und Matrixauswahl

Dieses Kapitel befasst sich mit der Auswahl eines Proben Targets, der geeigneten Matrix sowie der richtigen Analyt-Matrix-Präparationstechnik.

Die Targets sind meist flache Metallplatten, die in das MALDI-TOF-MS-System eingeschleust werden. Sie haben eine bestimmte Anzahl an kleinen Vertiefungen, den sogenannten Spots. Für die Auswahl spielt die generelle Eignung sowie die Haltbarkeit, Robustheit und Resistenz gegenüber den notwendigen Chemikalien eine wichtige Rolle. In weiteren Schritten wurde untersucht, welche Matrix sich für die Messung der aufbereiteten Hefeproteine eignet. Basierend auf unterschiedlichen Literaturquellen, vor allem aus der klinischen Diagnostik, wurden verschiedene Ansatzpunkte bei der Target- und Matrixauswahl untersucht (Tabelle 4-1, 4-2). Die Tabellen geben einen Überblick über den Literaturstand zu Beginn der Forschungsarbeiten und während des Forschungsverlaufs.

Tabelle 4-1: Auflistung unterschiedlicher analytischer Methoden zur Untersuchung von Bakterien und klinischen Hefen mittels MALDI-TOF-MS zum Forschungsbeginn

Quellen	Verfahrensbeschreibung	Analyt
[131] 2003	<ul style="list-style-type: none"> • Zellen waschen mit 0,1 % TFA; waschen mit H₂O_{dest.}; resuspendiert mit 100 µL MeOH • Überstand 1:1 bzw. 1:20 mit Matrix mischen • 1 µL Mischung auf Target (Typ Stahl) Matrix: DHBA; HABA; Sinapinsäure (H ₂ O _{dest.} / MeOH/ AS:IPA:H ₂ O (17:33:50); ACN:H ₂ O (33:67); TFA:ACN:H ₂ O (0,067:33:67))	Hefen, klinische Diagnostik und Fermentation
[43] 2008	<ul style="list-style-type: none"> • Zellfixierung in 50 % MeOH • Matrix: SA 	Hefen <i>Candida</i> Spezies
[42] 2009	<ul style="list-style-type: none"> • Kolonie gelöst in 0,3 mL H₂O_{dd} + 900 µL EtOH → zentrifugieren • Pellet luftgetrocknet und mit 50 µL 70 % AS + 50 µL ACN versetzt → zentrifugieren • 1 µL Überstand auf Target (Typ geschliffener Stahl) • 2 µL Matrix : HCCA (50 % ACN/2,5 % TFA) 	klinische Hefen/hefeartig wachsende Arten
[127] 2010	<ul style="list-style-type: none"> • Kolonie gelöst in RNase freiem Wasser + 900 µL EtOH → zentrifugieren • Pellet luftgetrocknet und mit 25 µL 70 % AS + 25 µL ACN versetzt → zentrifugieren • 1 µL Überstand auf Target (Typ unbekannt) • 1 µL Matrix: HCCA (50 % ACN/2,5 % TFA) 	klinische Bakterien/Hefen

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 4-2: Auflistung unterschiedlicher analytischer Methoden zur Untersuchung von Bakterien und klinischer Hefen mittels MALDI-TOF-MS im Forschungsverlauf

Quellen	Verfahrensbeschreibung	Analyt
[133] 2013	<ul style="list-style-type: none"> • Zellen in 1 mL H₂O → zentrifugieren • Pellet in 300 µL H₂O + 900 µL EtOH_{abs.} → zentrifugieren 	Hefen, klinische Diagnostik und Fermentation
[4] 2014	<ul style="list-style-type: none"> • 1 µL Hefemassee suspendiert in H₂O_{dest} • Inaktivierung mit 70 % EtOH • Proteinextraktion mit AS/ H₂O_{dest}/ACN 	<i>Lactobacillus brevis</i>
[7] 2015	<ul style="list-style-type: none"> • Kolonie gelöst in 3 µL H₂O_{dest.} + 900 µL EtOH_{abs.} → zentrifugieren • Pellet mit 10 µL 70 % AS + 10 µL ACN versetzt → zentrifugieren • 1 µL Überstand auf Target (Typ unbekannt) • 1 µL Matrix: HCCA (50 % ACN/ 0,025 % TFA) 	Weinhefen

Für die Proteinuntersuchungen mittels MALDI-TOF-MS werden laut Literatur (Tabellen 4-1, 4-2) bevorzugt die Matrices α -Cyano-4-hydroxymizmsäure (HCCA), Sinapinsäure (SA) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet. In der Abbildung 4-1 sind die chemischen Strukturen der drei Matrices dargestellt.

a)

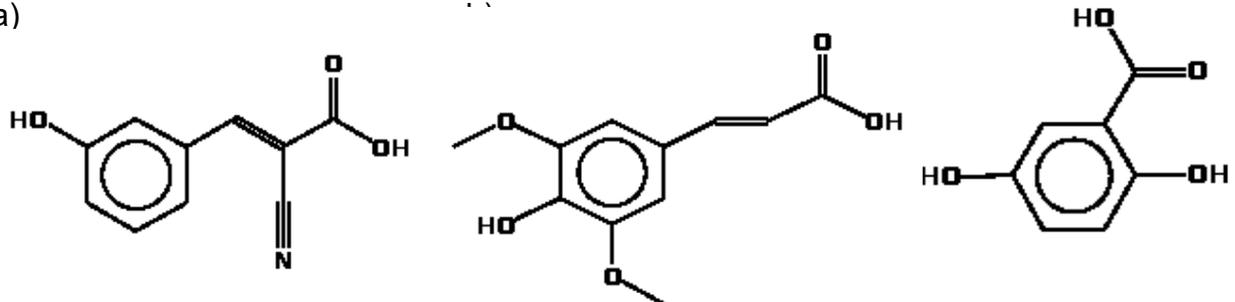


Abbildung 4-1: Strukturen der Matrices a) HCCA, b) SA, c) DHB

Der aromatische Ring der unterschiedlichen Matrices absorbiert die erzeugte Laserenergie, wodurch die Proteine vor der direkten Pyrolyse des Lasers geschützt werden. Das Einbetten des Analyten in eine Kristallstruktur ist sinnvoll, aber nicht notwendig, um große Analytionen zu untersuchen [145]. In Versuchen wurde gezeigt, dass Analyten bei einer thin-layer-Präparation häufiger bei einem großen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis an einer entsprechenden Oberfläche haften können [145]. Aufgrund der schnellen Verdampfung des Lösungsmittels bilden sich kleine Matrix-Analyt-Kristalle aus, die ein großes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis besitzen. Je nach Analyt-Matrix-Verhältnis findet eine entsprechende Fragmentierung der Analyten

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

statt [147]. HCCA eignet sich zur Analyse von kleineren Proteinen im Bereich von 0,7-20 kDa [42]. Mit Sinapinsäure ist die Untersuchung größerer intakter Proteine (10 - 150 kDa) möglich genauso wie mit DHB. Für die Betrachtung des Kristallisationsverhaltens wurden zunächst handelsübliche Matrices nach Herstellerangaben angesetzt. Die in Tabelle 4-3 aufgeführten Matrices wurden untersucht.

Tabelle 4-3: Matrices für die Untersuchung von Hefeproteinen

Matrices
HCCA [148]
2,6-Dihydroxyacetophenon (DHAP)
Sinapinsäure [149]
Bernsteinsäure
Dihydroxybenzoesäure (DHB) [150]
Nicotinsäure

Die verschiedenen Matrixlösungen sind anschließend auf jeweils acht Targetspots der Platten „MTP 384 polierter Stahl“ und „MTP 384 geschliffener Stahl“ (Bruker Daltonics GmbH) aufgetragen worden (Abbildungen 4-2 und 4-3).

In den nachfolgenden Abbildungen 4-2 und 4-3 sind die unterschiedlichen Kristallisationen der verschiedenen Matrices dargestellt.

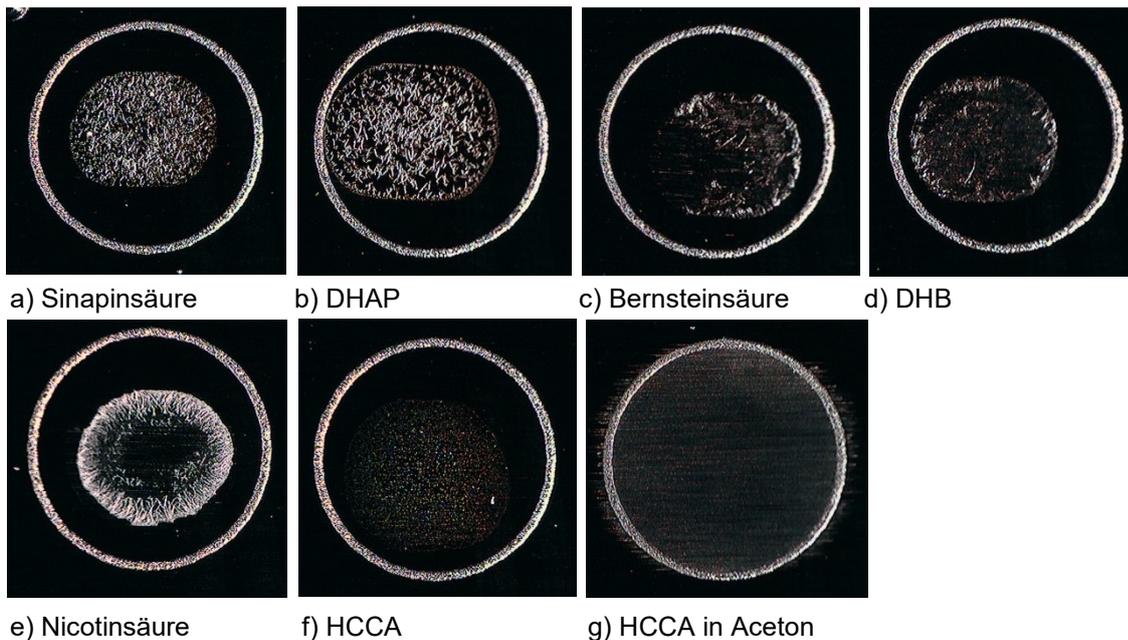


Abbildung 4-2: Unterschiedliche Matrices auf poliertem Stahltarget; Mikroskop (600 fach)
a) Sinapinsäure, b) DHAP, c) Bernsteinsäure, d) DHB, e) Nicotinsäure, f) HCCA, g) HCCA in Aceton

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die verwendeten Matrices zeigten alle ein unterschiedliches Kristallisationsverhalten. DHB und Bernsteinsäure (Abbildung 4-2 c und d) bildeten große Kristallnadeln am äußeren Rand aus. Es sind nur wenige Kristalle im Matrixzentrum erkennbar. Bei der Nicotinsäure hatte sich ein noch stärkerer Kristallnadelrand gebildet (Abbildung 4-2 e). HCCA und SA zeigten dagegen eine homogene und feinkristalline Struktur auf dem polierten Stahltarget (Abbildung 4-2 a und f).

Zusätzlich wurden verschiedene Konzentrationen an Matrix wie HCCA, dem Lösungsmittel Acetonitril und der Trifluoressigsäure getestet. Die Abbildungen 4-3 a)-c) zeigen die verschiedenen Matrixlösungen der HCCA gelöst in ACN, TFA und Wasser. Der Lösungsmittelanteil an ACN steigt von a) nach c) und der Anteil an Wasser nimmt ab.

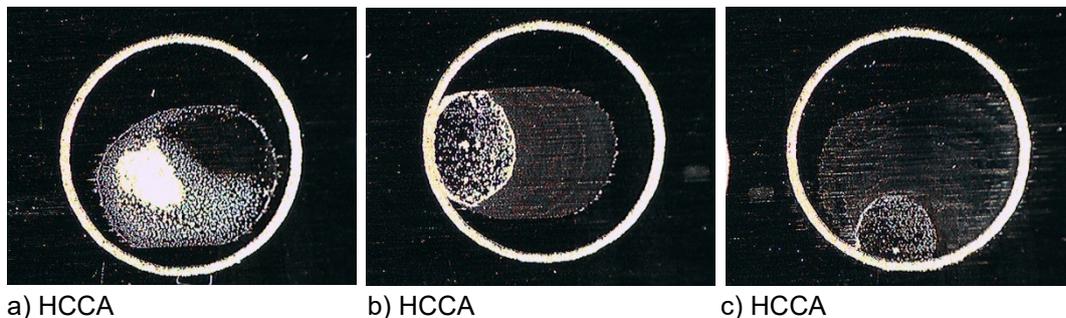


Abbildung 4-3: HCCA-Matrix auf geschliffenem Stahltarget mit unterschiedlichen Lösungsmittelkonzentrationen; Mikroskop (600 fach)
a) HCCA (750 μl ACN/ 15 μl TFA/ 235 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{rein}}$)
b) HCCA (850 μl ACN/ 15 μl TFA/ 135 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{rein}}$)
c) HCCA (985 μl ACN/ 15 μl TFA)

Bei einem circa drei zu eins Mischungsverhältnis von ACN zu Wasser bildeten sich weiße Kristallflocken aus.

Durch einen höheren Anteil an dem Lösungsmittel ACN (Abbildung 4-3 b und c) wurde die Oberflächenspannung der Matrixlösung herabgesetzt und damit die partielle Benetzung des Targetspot erschwert. Es konnte keine punktuelle Matrixlösung auf den Spot positioniert werden. Diese Punkte mussten für die weitere Entwicklung berücksichtigt werden.

Matrixpräparationstechnik

Die Analyt-Matrix-Präparation hat einen großen Einfluss auf die Qualität der MALDI-TOF-Massenspektren [151] (Kapitel 2.1) und somit auf die Möglichkeit der Differenzierung der Hefeproteine beziehungsweise deren molekularen Protein-

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fingerprints. Neben der Auswahl einer geeigneten Matrix und der Entwicklung einer schnellen und effektiven Proteinextraktion, wurden iterativ verschiedene Analyt-Matrix-Präparationstechniken getestet.

Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.1 *Matrixauswahl* sind verschiedene Auftragungsmethoden sowie Targets verglichen worden:

- dried droplet
(Analyt und Matrix werden gemischt und auf das Target aufgetragen. Anschließend verdampft das verwendete Lösungsmittel.) [150, 152]
- thin layer
(Die Matrix wird auf das Target vorgelegt, das Lösungsmittel verdampft und eine feine kristalline Matrixschicht entsteht. Die Analytlösung wird anschließend darüber geschichtet.) [153, 154]
- double layer
(Eine Kombination aus dried droplet und thin layer. Zunächst wird die thin layer Methode angewandt, anschließend folgt die dried droplet Methode.) [144]
- reverse thin layer
(Der Analyt wird aufgetragen, das Lösungsmittel verdampft und anschließend wird die Matrix aufgetragen.) [155]

Die in der Tabelle 4-1 angegebenen Literaturquellen verwenden für die Untersuchung der klinischen Bakterien beziehungsweise klinischen Hefen vorrangig die dried droplet, thin layer oder reverse thin layer Methode. Laut Marklein et al. [42] eignet sich insbesondere die HCCA-Matrix für die Untersuchung von Peptiden und Proteinen. Die Verwendung von HCCA hat den Vorteil, dass sich die Matrix sehr gut in organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Aceton und Acetonitril löst. Durch das schnelle Verdampfen der Lösungsmittel kann sich eine homogene Kristallstruktur auf dem Target ausbilden, an der sich aufgrund der hohen Oberflächenaffinität Peptide oder Proteine binden können [156].

Parallel zu den Versuchen aus 4.1.1 *Matrixauswahl* wurden unterschiedliche Matrices (siehe Tabelle 4-4) mit verschiedenen Präparationstechniken verglichen. Denn neben einer homogenen Kristallisation ist die Ionisierung der in der Matrix eingebetteten Analytmoleküle Grundvoraussetzung. Die gebildeten Massenspektren, mit ihren

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

charakteristischen molekularen Protein-Fingerprints, können so zur Differenzierung der verwendeten Hefestämme genutzt werden.

Für jede Untersuchungsreihe sind acht Spots auf unterschiedlichen Targets (MTP 384 polierter Stahl, MTP 384 geschliffener Stahl), mit je 0,5 µL Proteinextraktionslösung und 0,5 µL Matrixlösung belegt worden. Es wurden die in Tabelle 4-4 aufgeführten Auftragungstechniken getestet.

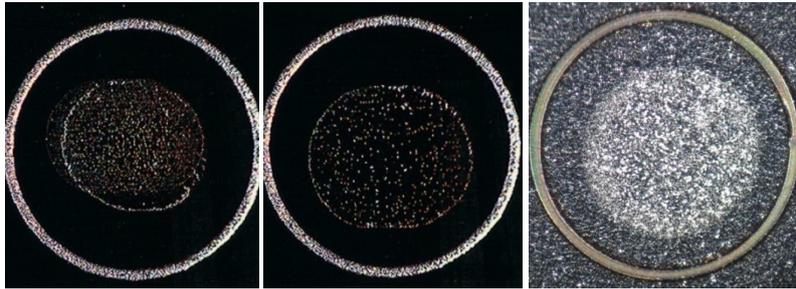
Tabelle 4-4: Verwendete Matrices und deren Auftragetechniken

Matrix	Auftragung
HCCA	<ul style="list-style-type: none">• dried droplet• thin layer• double layer• reverse thin layer
2,6-Dihydroxyacetophenon (DHAP)	
Sinapinsäure (SA)	
Bernsteinsäure	
Dihydroxybenzoesäure (DHB)	
Nicotinsäure	

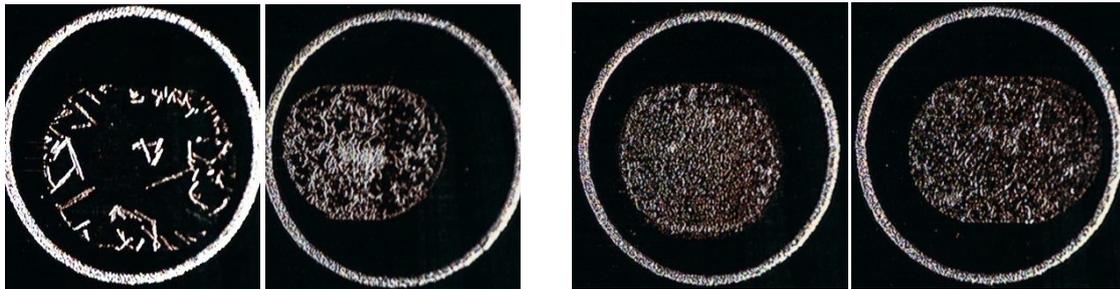
Als Modellhefe wurde die *S. cerevisiae* 2.200 verwendet. Deren Proteine wurden zunächst in einer 70 % Ameisensäure/ 99,9 % Acetonitril (1:1)-Lösung extrahiert. Der *E. coli* Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics GmbH) wurde zur Kalibrierung und Überprüfung der Massenbereiche zu jeder Messreihe mitgeführt (Kapitel 3.7.1). Die Messungen wurden alle bei gleichen Bedingungen und Geräteeinstellungen durchgeführt (Anhang 7.3, 7.4). Anhand der erzielten Teilergebnisse aus Matrix- und Probenextraktion wurden die Geräteparameter optimiert und angepasst.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

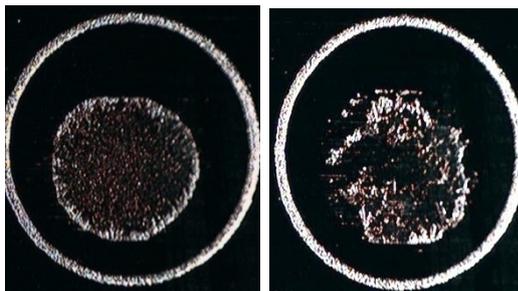
In den nachfolgenden Abbildungen 4-4 bis 4-5 sind die unterschiedlichen Präparationstechniken auf den Targets dargestellt.



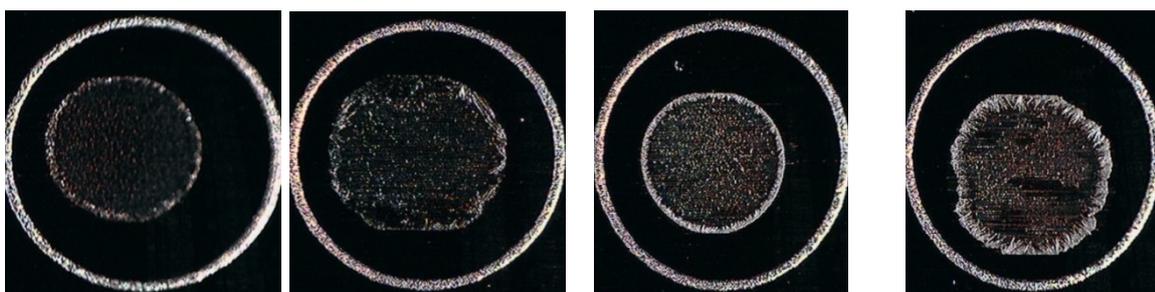
a) HCCA *thin layer* HCCA *dried droplet* HCCA *reverse thin layer*



b) DHAP *thin layer* DHAP *dried droplet* c) SA *thin layer* SA *dried droplet*



d) Bernsteinsäure *thin layer* und *dried droplet*



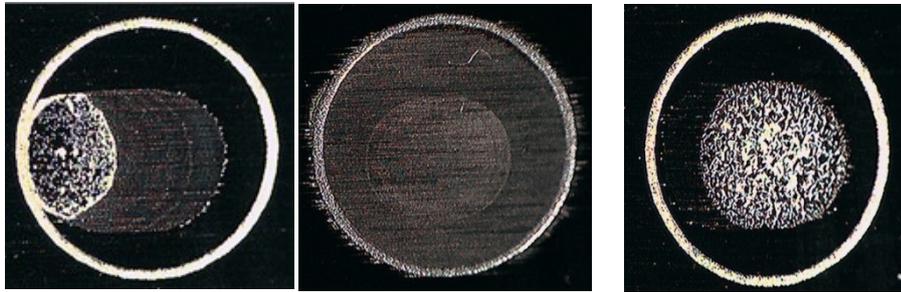
e) DHB *thin layer* DHB *dried droplet* f) Nicotinsäure *thin layer* Nicotinsäure *dried droplet*

Abbildung 4-4: Kristallisationsverhalten der unterschiedlichen Matrices auf poliertem Stahltarget, Mikroskop (600 fach)

- a) HCCA *thin layer*, HCCA *dried droplet*, HCCA *reverse thin layer*
- b) DHAP *thin layer*, DHAP *dried droplet*
- c) SA *thin layer*, SA *dried droplet*
- d) Bernsteinsäure *thin layer*, Bernsteinsäure *dried droplet*
- e) DHB *thin layer*, DHB *dried droplet*
- f) Nicotinsäure *thin layer*, Nicotinsäure *dried droplet*

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie in der Abbildung 4-5 zu sehen ist, verläuft bei der HCCA dried droplet beziehungsweise thin layer Methode die Matrix-Analyt-Lösung. Die Kristallisation war gering und inhomogen.



a) HCCA dried droplet HCCA thin layer (Aceton) b) SA dried droplet

Abbildung 4-5: Kristallisationsverhalten von HCCA und Sinapinsäure auf geschliffenem Stahltarget, Mikroskop (600 fach)

a) HCCA dried droplet, HCCA thin layer (Aceton); b) SA dried droplet

Bereits bei diesen ersten Ergebnissen zeigt sich der Einfluss des Lösungsmittels auf die Targetpräparation. In Abbildung 4-5 a) HCCA thin layer (Aceton) ist dargestellt wie die Kristallisation der Matrix HCCA gelöst in Aceton sich auf dem Spot verhält. Aceton wird zur Ausbildung von Dünnschichtfilmen für biologische Applikationen eingesetzt, da Aceton schnell verdunstet [146]. In Kapitel 4.1.4 wird näher auf den Einfluss des Lösungsmittels auf die Matrix eingegangen.

Zur Auswertung wurden die aufgenommenen Massenspektren der *S. cerevisiae* 2.200 miteinander verglichen. In der Abbildung 4-6 sind drei Massenspektren (Massenbereich 4,5-30 kDa) der *S. cerevisiae* 2.200 mit unterschiedlichen Auftragetechniken a) dried droplet double layer, b) single layer, c) reverse thin layer) dargestellt.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

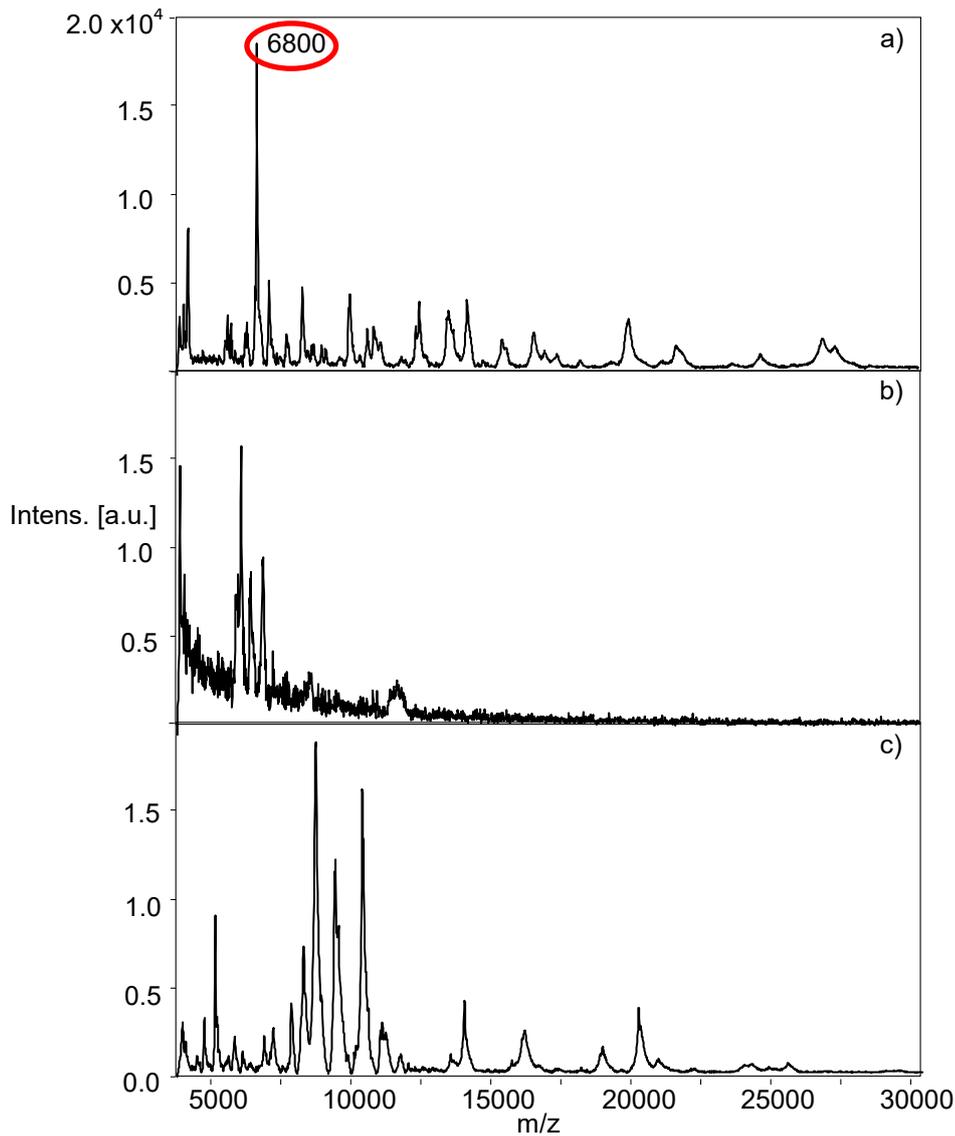


Abbildung 4-6: MS-Spektrum (Protein-Fingerprint) der Hefe *S. cerevisiae* 2.200 a) dried droplet b) single layer, c) reverse thin layer

Bei der Auswertung des Massenspektrums a) dried droplet ist ein intensives Ionensignal bei 6800 Da detektiert worden. Die nachfolgenden Peaks sind in ihrer Intensität gleichartig und nicht signifikant.

Im Massenspektrum b) single layer zeigen sich im m/z -Bereich von 12500-30000 Da keine auswertbaren Signale. Die drei Peaks im m/z -Bereich von 6000-7000 Da sind schlecht aufgelöst. Das gesamte Massenspektrum zeigt ein starkes Rauschen.

Auf dem polierten Stahltarget konnten die Matrix-Analyt-Mischungen punktueller aufgetragen werden. Eine reproduzierbare Benetzung der Spots sowie eine homogene Kristallisation sind mit der Matrix HCCA erreichbar gewesen. DHAP und DHB bildeten große Kristallnadeln am äußeren Rand aus. Nur dort war eine manuell auswertbare

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Messung möglich. Dies ist für die Zielsetzung einer automatisierten Messtechnik ungeeignet.

Das Ergebnis der Kristallisation von Sinapinsäure war vergleichbar mit der von HCCA. Die Fragmentierung der Analyten bei Verwendung von Sinapinsäure ist aufgrund der schonenden Ionisierung gering und wird für größere Proteine im double layer Verfahren empfohlen [157]. Es konnten einzelne Peaks detektiert werden. Im systematischen Vergleich zeigte sich jedoch, dass die „harte“ HCCA-Matrix im positiven Modus (Massenbereich m/z von 4,5-30 kDa) eine bessere Auflösung erzielte. Sowohl bei der manuellen als auch bei der automatisierten Messung konnten aufgrund der homogenen Kristallisation auf dem polierten Stahltarget reproduzierbare Massenspektren generiert werden.

Es zeigte sich, dass das reverse thin layer Verfahren, welches für die Untersuchung von Oligosacchariden entwickelt wurde [155], sich am geeignetsten erwies. Diese Art der Auftragung ist sehr einfach in der Anwendung und zeigt reproduzierbare Ergebnisse. Mit der reverse thin layer Technik (Abbildung 4-6 c) konnte im gesamten Massenbereich eine gute Signalauflösung erzielt werden. Der detektierte charakteristische molekulare Protein-Fingerprint der *S. cerevisiae* 2.200 mit dem reverse thin layer Verfahren kann anhand der Vielzahl an Peaks eine Differenzierung anderer Hefestämme ermöglichen.

In weiteren Schritten musste ein optimales Matrix-Analyt-Verhältnis entwickelt werden, da sich bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen das Kristallisationsverhalten veränderte (Kapitel 4.1.2-4.1.4). Ebenso musste die Ausbildung des sogenannten hot spots beachtet werden. Das heißt, dass die Proteine nicht gleichmäßig verteilt auf dem Targetspot liegen, sondern eine Art konzentriertes Zentrum bilden. Die Ausbildung eines hot spots ist bei dieser Art der Matrix-Analyt-Präparation geringer, da die Proteinlösung zunächst auf dem Spot aufgetragen wird und eine langsame und gleichmäßige Verdampfung des Lösungsmittels (hier Acetonitril) stattfindet. Erst danach wird die getrocknete Probe mit der Matrix überschichtet und eine ebenfalls langsame und gleichmäßige Kristallisation erreicht. Bei dieser Technik ist darauf zu achten, dass nach dem Trocknen der Proteinlösung sofort die Matrixlösung aufgetragen wird, da mögliche Verunreinigungen oder Oxidationsprozesse die Messung behindern können.

Bei diesen Versuchen wurde neben der HCCA-Matrix von der Firma Bruker auch die kostengünstigere Matrix HCCA der Firma Fluka getestet. Die Testspektren des *E. coli* Bacterial Test Standard zeigten keine Unterschiede. Daher wurde für die nachfolgenden

Testreihen neben der HCCA von Bruker auch die von Fluka verwendet und im Verlauf der Arbeit weiter miteinander verglichen.

Während der Messungen am MALDI-TOF-MS wurden zur besseren Auflösung der Massenspektren die Anzahl der Laserschüsse von 5 mal 100 Laserschuss auf 10 mal 100 Laserschuss erhöht sowie die Laserfrequenz auf 20 Hz verringert. Somit konnte der Mittelwert der gemessenen Massenspektren dem Matrix-zu-Analyt-Verhältnis angepasst werden.

Wie bereits S. Trimpin (2002) [132] in ihrer Dissertation darstellte, zeigte sich auch in dieser Arbeit, dass bei einer lösungsmittelbasierenden Probenpräparation eine höhere Laserleistung notwendig ist, um die Gitterenergien im Kristall zu überwinden und eine effektive Desorption/Ionisation zu erreichen.

Des Weiteren wurden Versuche mit Mischmatrices wie HCCA/SA (1:1), HCCA/sDHB (1:1), HCCA/DHB (1:1), HCCA/DHAP (1:1) durchgeführt. Es konnten keine verwertbaren Ergebnisse mit den Mischmatrices erreicht werden, daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Fazit:

Als Fazit aus diesen ersten Untersuchungen wurde das Targetpräparationsverfahren reverse thin layer mit der Matrix HCCA favorisiert. Es konnten sowohl mit der manuellen wie automatisierten Messtechnik in einem Massenbereich von 4,5-30 kDa reproduzierbare Massensignale detektiert werden.

Auf dem polierten Stahltarget konnten die Lösungen punktueller aufgetragen werden und somit eine reproduzierbare und homogene Kristallisationen mit der HCCA erreicht werden.

4.1.2 Proteinextraktionsmethode

Ziel dieses Abschnittes war es, eine einfache, aber effektive Probenaufbereitung der Hefezellen zu entwickeln. Jeder Hefestamm soll durch einen charakteristischen, molekularen Protein-Fingerprint mittels statistischer Methoden differenzierbar sein.

Für einen Zellaufschluss müssen die Zellwände der Hefen mechanisch oder biochemisch zerstört oder permeabilisiert werden. Die freigesetzten Enzyme oder Strukturproteine sollen nicht denaturiert werden und die eingesetzten Detergenzien die massenspektrometrischen Untersuchungen nicht beeinflussen. Des Weiteren waren bei

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

der Probenextraktion reproduzierbare und hohe Aufschlussgrade der Hefezellen notwendig, um Massenspektren mit hohen Signalintensitäten zu erreichen.

Der Einsatz von gesundheitsgefährdenden Agenzien sollte auf ein Minimum reduziert werden und die Gesamtkosten beziehungsweise der Zeitaufwand möglichst gering sein. Außerdem soll das gesamte Aufarbeitungssystem für eine spätere Anwendung eines Testkits genutzt werden können. Daher sollte der Anwender nur wenige Aufarbeitungsschritte durchführen müssen.

Die Zellwände der Hefen sind aus Polysacchariden und die daran gebundenen Proteine aufgebaut. Viele Hefezellwandproteine sind kovalent an Glucan und Chitin in der Zellwand gebunden. Das β -Glucan besteht aus Glukose-Monomereinheiten. Diese Monomere sind über 1,6-, 1,3- und 1,2-glykosidische Verbindungen verknüpft und bilden das Stützgerüst der Zellwand. Zusätzlich sind Mannane kovalent an Proteine gebunden. Um die intrazellulären Bestandteile der Hefezellen freizusetzen, reicht es meistens aus die Zellwand leicht zu schädigen. Für größere, geladene Moleküle ist das schwieriger und ein mechanischer Zellaufschluss ist notwendig.

Die verschiedenen Aufschlusstechniken wurden an der Backhefe *S. cerevisiae* 2.200 und der untergärigen Brauhefe *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug3 getestet. Die technischen Einstellungen der MALDI-TOF-MS sind wie in Kapitel 4.1.1 *Matrixpräparationstechnik* beschrieben. Der Massenbereich wurde aufgrund einer größeren Anzahl an auswertbaren Peaks auf m/z 2000-20.000 Da erweitert.

Direkttransfer der Hefezellen

Bei dieser Versuchsdurchführung war zu untersuchen, ob die Hefezellen beziehungsweise deren Zellwände aufzuschließen sind oder ob die intakte Hefezelle zur Messung verwendet werden kann.

Dafür ist der direkte Transfer der Hefezelle auf das polierte Target getestet worden. Eine Hefesuspension mit einer Gesamtzellzahl von 1×10^8 Zellen/mL wurde zentrifugiert (1 min, 2500 rpm) und anschließend der Überstand (SD-Medium) entfernt. Vorsichtig wurde etwas Zellmasse mit einer Pipettenspitze auf das Target aufgetragen und mit Ameisensäure überschichtet. Die Ameisensäure zerstört die Hefezellenwand, so dass die Proteine frei vorliegen. Nach einer Minute Inkubation wurde die Probe mit der HCCA-Matrix beschichtet.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Aus verschiedenen Gründen war davon auszugehen, dass mit dieser Art der Probenuntersuchung kein reproduzierbares Ergebnis erzielt werden kann. Die Anzahl der Hefezellen pro Milliliter kann stark variieren, der Aufschluss verläuft nicht konstant und anhaftende Medienreste an den zu untersuchenden Hefezellen können die Messungen stören.

Wie in Abbildung 4-7 darstellt, zeigte diese Art der Probentechnik keine auswertbaren Ergebnisse.

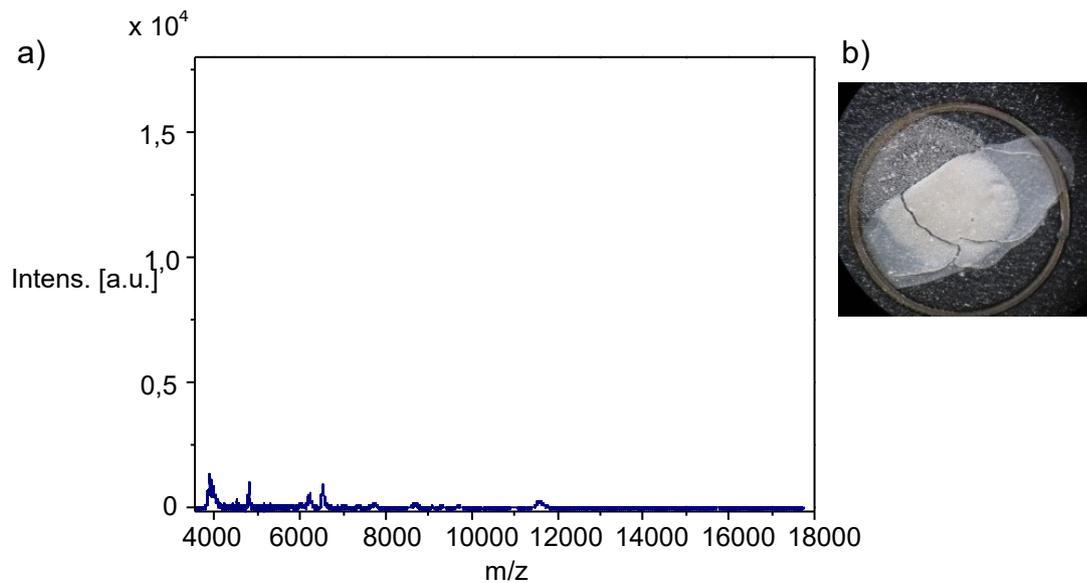


Abbildung 4-7: a) Massenspektrum des untergärigen Hefestammes ug3; b) Targetspot: Aufarbeitung mit der Direkt-Transfermethode

Aufschluss mit Dismembrator und Stahlkugeln

Im nächsten Schritt wurde der Aufschluss mit einem BRAUN Dismembrator und Stahlkugeln [158] durchgeführt. Die Lebendzellzahl der obergärigen Backhefe *S. cerevisiae* 2.200 lag vor dem Zellaufschluss bei $3,3 \times 10^9$ Zellen/mL. Der Aufschluss war nicht effektiv, da noch eine Lebendzellzahl von $4,9 \times 10^7$ Zellen/mL nachgewiesen werden konnte. Es waren keine auswertbaren Massenspektren detektierbar. Auch der Versuch einer Aufkonzentrierung der Proteine durch Carrez-Fällung mit Kaliumhexacyanoferrat, Zinksulfat und Trichloressigsäure (TCA) führte zu keinem verwertbaren Ergebnis. In der Abbildung 4-8 sind die Massenspektren der *S. cerevisiae* 2.200 nach der Proteinfällung mit unterschiedlichen Trichloressigsäurekonzentrationen dargestellt.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

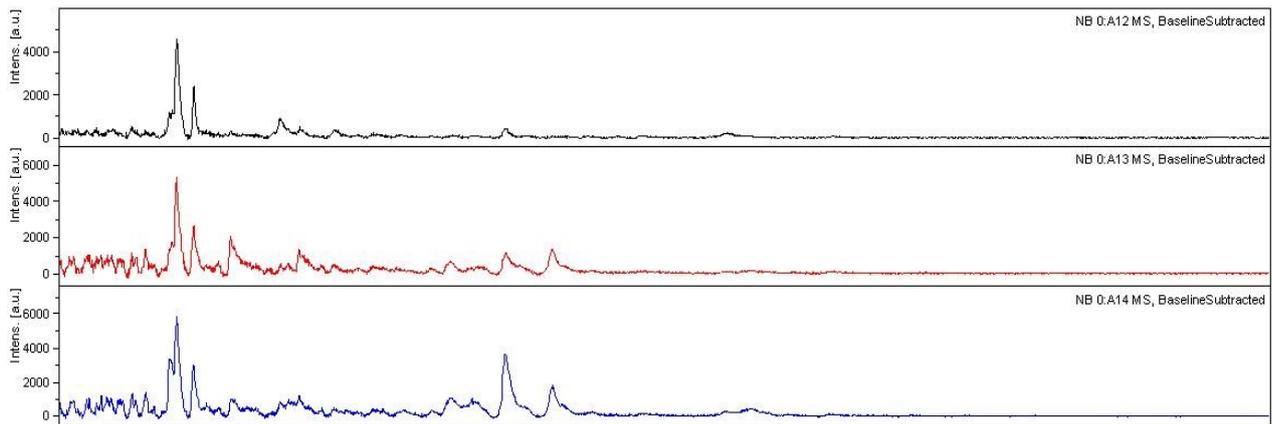


Abbildung 4-8: Massenspektren von *S. cerevisiae* 2.200 nach Proteinfällung mit TCA-Konzentrationen von oben nach unten 5 % (schwarz), 10 % (rot), 20 % (blau)

Verwendet wurden 5 % TCA (schwarz), 10 % TCA (rot) und 20 % TCA (blau). Die Proteine konnten nicht in Ameisensäure und Acetonitril resuspendiert werden. Die Spektren zeigen keine reproduzierbaren Massensignale.

Dieses mechanische Aufschlussverfahren wurde daher nicht weiter verwendet.

Aufschluss mit Glasperlen

Als weiteres Verfahren wurde der Aufschluss mit Glasperlen [177, 178] bewertet. Hefezellsuspension wird in eine geschlossene Kammer mit Glasperlen (\varnothing 50 μ m) gegeben und mittels Schwingmühle bei hoher Frequenz geschüttelt. Durch den Aufprall der Perlen und den Scherkräften fragmentieren die Hefezellen. Ein ausreichender Aufschlussgrad lag vor. Dies konnte durch quantitative Proteinmessungen belegt werden. Dazu war allerdings eine Anpassung der üblichen Methode nach BRADFORD erforderlich (Kapitel 3.6). So wurde die Farbstoffkonzentration erhöht und die Kalibrierstandards in der Lösungsmittelmatrix Ameisensäure/ACN verdünnt, um vergleichbare Bedingungen für Standards und Proben zu schaffen. Auswertbare Massenspektren konnten mit dem MALDI-TOF-MS generiert werden.

Die Untersuchung der extrahierten Proteine mittels SDS-PAGE-Elektrophorese war aufgrund des niedrigen pH-Wertes von 2,3 nicht erfolgreich. Die Proteine liefen entgegen der üblichen Lauffront. Auch durch den Einsatz von Puffersystemen konnte keine Verbesserung erzielt werden. Zudem wirkte der hohe Anteil an Salzfracht auf das Gelsystem störend. Im Laufe der Entwicklungsarbeit zeigte sich, dass trotz der auswertbaren Ergebnisse mit dem Glasperlenaufschluss der chemische Aufschluss aufgrund der Reproduzierbarkeit geeigneter ist.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Chemischer Zellaufschluss

Allgemein ist bekannt, dass durch den Einsatz von Detergenzien (z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Triton X-100) und Agenzien ein Zellaufschluss erreicht werden kann [69]. Es musste jedoch beachtet werden, dass die Hefeproteine unter den vorherrschenden Bedingungen unverändert bleiben.

Proteine haben polare, apolare sowie geladene Aminosäuregruppen. Intrazelluläre Proteine wie zum Beispiel Enzyme sind gut in wässrigen Medien löslich. Die polaren, geladenen Amid- und Carbonylgruppen bilden mit Wassermolekülen Wasserstoffbrücken aus. Dagegen weisen strukturbildende Proteine (z. B. Membranproteine) eine schlechte Löslichkeit auf. Die integralen Membranproteine können aufgrund der hydrophoben Eigenschaften nur mit Hilfe von Detergenzien gelöst werden. [159]

In den ersten Versuchen wurde der Aufschluss der Hefezellen der *S. cerevisiae* 2.045 und *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 untersucht, die in den Labormedien SD -, YED-, YEPD-, Würzemedium und Melasse kultiviert wurden. Zunächst wurde sich an der Aufarbeitung nach Marklein et al. [134] orientiert.

Tabelle 4-5: Zellzahlbestimmung (OD_{600}) von *S. pastorianus* ug1 und *S. cerevisiae* 2.045

Inkubationszeit [h]	Zellzahl [OD_{600}]	
	<i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>) ug1	<i>S. cerevisiae</i> 2.045
0	0.156	0.146
3.5	0.251	0.309
7	0.409	0.894
10	0.690	1.616
12	1.684	6.064
25	13.98	13.86
49	18.62	22.16
125	37.12	43.64

Aus den verschiedenen Wachstumsphasen der Hefen wurde jeweils 1 mL Zellsuspension in ein 2 mL Extraktionsröhrchen (Eppendorf, Deutschland) überführt. Im ersten Schritt musste das Medium von den Hefezellen getrennt werden, um mögliche Begleitstoffe aus den Medien wie Salze, Alkohole, hoch- oder niedermolekulare Zucker, Proteine, die nicht aus der Hefe stammen, zu entfernen. Diese können die Messung

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

und somit das Massenspektrum beeinflussen. Außerdem sollte sich der Status quo der Hefe nicht mehr verändern.

Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 20 °C mit 6000 rpm (2822.4 x G) zentrifugiert und der Überstand mittels Pipette abgenommen und verworfen. Anschließend wurden 300 µL Reinstwasser sowie 900 µL 99,9 % EtOH zugegeben und mittels Vortexer homogenisiert. Es wurden nochmals 8 min bei 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Zellpellet konnte unter Stickstoffstrom getrocknet werden. Im nächsten Schritt erfolgte der Zellaufschluss im sauren Milieu. Das Zellpellet wurde mit 50 µL 70 % Ameisensäure und 50 µL 99,9 % Acetonitril versetzt, resuspendiert und für 1 min bei 20 °C inkubiert. Es war darauf zu achten, dass der Anteil an ACN in der Lösung nicht zur Ausfällung der Proteine führte. Anschließend ist für 8 min bei 20 °C mit 13000 rpm (13249.6 x G) zentrifugiert worden. Das Lysat mit den darin extrahierten Hefeproteinen wurde in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Von diesem Überstand sind jeweils 1 µL Probe auf das Target aufgetragen worden. Nachdem die Probe getrocknet war wurden 1 µL HCCA Matrix aufgetragen. In der Abbildung 4-9 ist das Massenspektrum der *S. cerevisiae* 2.045 dargestellt. Es lag eine Gesamtzellzahl von 10^8 Zellen/mL vor. Die Zellen befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase.

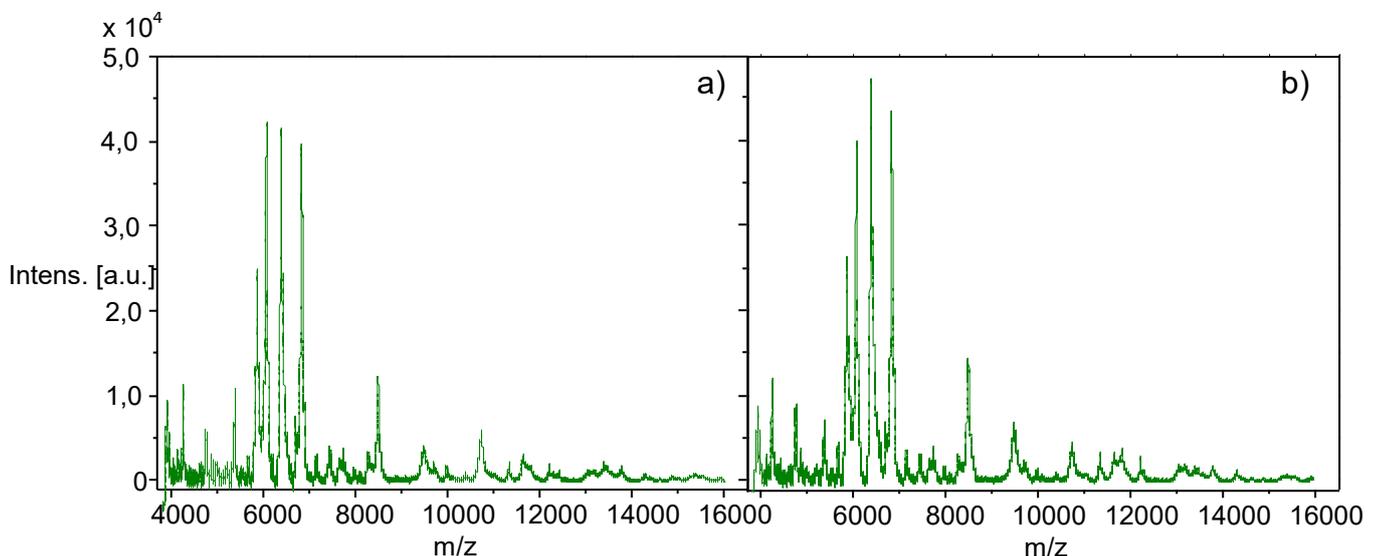


Abbildung 4-9: Protein-Fingerprint der Hefe *S. cerevisiae* 2.045 mit reverse thin layer Verfahren
a) frische Hefesuspension; b) Zellsuspension mit EtOH zwei Tage Lagerung bei -22 °C

In den Abbildungen 4-9 a) und b) ist das Massenspektrum der *S. cerevisiae* 2.045 mit dem reverse thin layer Verfahren dargestellt. Anhand der beiden Massenspektren kann belegt werden, dass mit der oben genannten Proteinextraktion erste Protein-Fingerprints gemessen werden konnten. In dem Massenbereich von 5.700 bis 7.000 Da

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

sind vier Signale, sowohl in der frischen Proteinprobe sowie in der eingefrorenen Probe, detektierbar. In der Literatur [172, 179] wird beschrieben, dass zur Identifizierung von Mikroorganismen vor allem der Bereich von 2-20 kDa genutzt wird. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit für die 13 verschiedenen Hefestämme der *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* bestätigt werden. Auch die Möglichkeit der Konservierung der extrahierten Hefeproteine in Ethanol bei -22 °C ist mit dieser Aufarbeitung möglich. Die Extraktionsmethode von Marklein et al. [134] wurde wie nachfolgend beschrieben weiterentwickelt.

Die Verwendung von Reinstwasser im ersten Schritt der Extraktion soll als Waschschrift dienen. Jedoch weist demineralisiertes Wasser einen hohen osmotischen Effekt auf die Hefezellen auf. Die Zellen können platzen und das Zellinnere austreten [160]. Bei einer geringen Ionenkonzentration können sich die Oberflächenladungen kompensieren und eine Aggregatbildung findet statt. Bei der Optimierung der Aufarbeitung wurde daher auf Reinstwasser verzichtet und auf nicht demineralisiertes Wasser zurückgegriffen.

Ethanol diene zur Fixierung des Status quo der Hefe. Auch hier war zu beachten, dass ein zu hoher Anteil an organischem Lösungsmittel nicht zur fraktionierten Fällung der Proteine führt. Jedoch lagen bei diesem Extraktionsschritt noch keine größeren Konzentrationen an gelösten Proteinen in der Zellsuspension vor. Resultierend aus den verschiedenen Versuchen zeigte sich der Einsatz von 1 mL EtOH auf 1 mL Zellsuspension am geeignetsten für die Fixierung des Hefestatus.

Die Ameisensäure dient zur Zelllyse. Bei der die Zellwand der Hefen zerstört wird und das Lysat aus der Zelle tritt. Im weiteren Schritt mussten die Proteine mit Hilfe von ACN abgetrennt und in Lösung gebracht werden.

Da ACN auch als Lösungsmittel zur Herstellung der HCCA-Matrix dient, wurde der Einsatz von ACN bevorzugt, um zusätzliche Einflussfaktoren zu mindern.

In Vorversuchen wurden ebenfalls eine Autolyse mit Toluol, die Zerstörung der Zellmembran mit Triton X-100 sowie die enzymatische Lyse mit Zymolyase getestet. Diese Tests führten zu keiner Verbesserung der Ergebnisse und waren zeitintensiver in der Handhabung.

Zur Bewertung der Inaktivierung und Destruktion der Hefezellen wurden das Spatelplattenverfahren und die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

4.1.3 Bewertung der Inaktivierung und Destruktion

Spatelplattenverfahren

Für die Untersuchungen wurden verschiedene Hefeproben zu den unterschiedlichen Stadien der Proteinextraktion untersucht. In der Tabelle 4-6 sind die verschiedenen Zwischenschritte der Proteinextraktion der *S. cerevisiae* 2.200 dargestellt.

Tabelle 4-6: Zwischenschritte der Proteinextraktion

Probe	Gesamtzellzahl [Zellen/mL]	Proteinextraktionsschritte
1	1×10^8	<i>S. cerevisiae</i> 2.200 + 1 mL 99,9 % EtOH
2	1×10^8	<i>S. cerevisiae</i> 2.200 gelöst in 300 μ L H ₂ O _{dest.} + 900 μ L 99,9 % EtOH
3	1×10^8	Zellpellet in 300 μ L H ₂ O _{reinst.} + 900 μ L 99,9 % EtOH
4	1×10^8	Zellpellet in 100 μ L Ameisensäure + 100 μ L ACN 1 min

Die Hefezellen wurden in 1 mL H₂O_{dest.} resuspendiert und eine dekadische Verdünnungsreihe bis zu einer Zellzahl von 10^2 Zellen/mL hergestellt. Von den Proben sind jeweils, in einer Doppelbestimmung, 100 μ L der Verdünnungsstufen 10^4 Zellen/mL, 10^3 Zellen/mL und 10^2 Zellen/mL ausplattiert worden (Agar: Scharlau Microbiology, 500 g Chloramphenicol Glucose Agar (CGA)). Zur besseren Bewertung der Vitalität wurde zusätzlich eine Methylenblaufärbung durchgeführt (50 μ L Probe + 50 μ L Methylenblau; Inkubation bei 22 °C für 30 min; Zugabe von 400 μ L ddH₂O). Durch die Methylenblaufärbung sind die Proben nochmals dekadisch verdünnt worden (z. B. 10^7 Zellen/mL auf 10^6 Zellen/mL).

Die Auswertung der Agar-Platten zeigte für die Proben 2 bis 4, dass sowohl nach 48 h und 96 h kein Zellwachstum stattgefunden hatte. Die Inaktivierung der Hefezellen erfolgt bei den getesteten Verfahren somit vollständig.

Die Probenreihe der verschiedenen Aufschlüsse wurde zusätzlich mikroskopiert und die oben ermittelten Ergebnisse mittels Spatelplattenverfahren bestätigt (siehe Abbildungen 4-10).

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

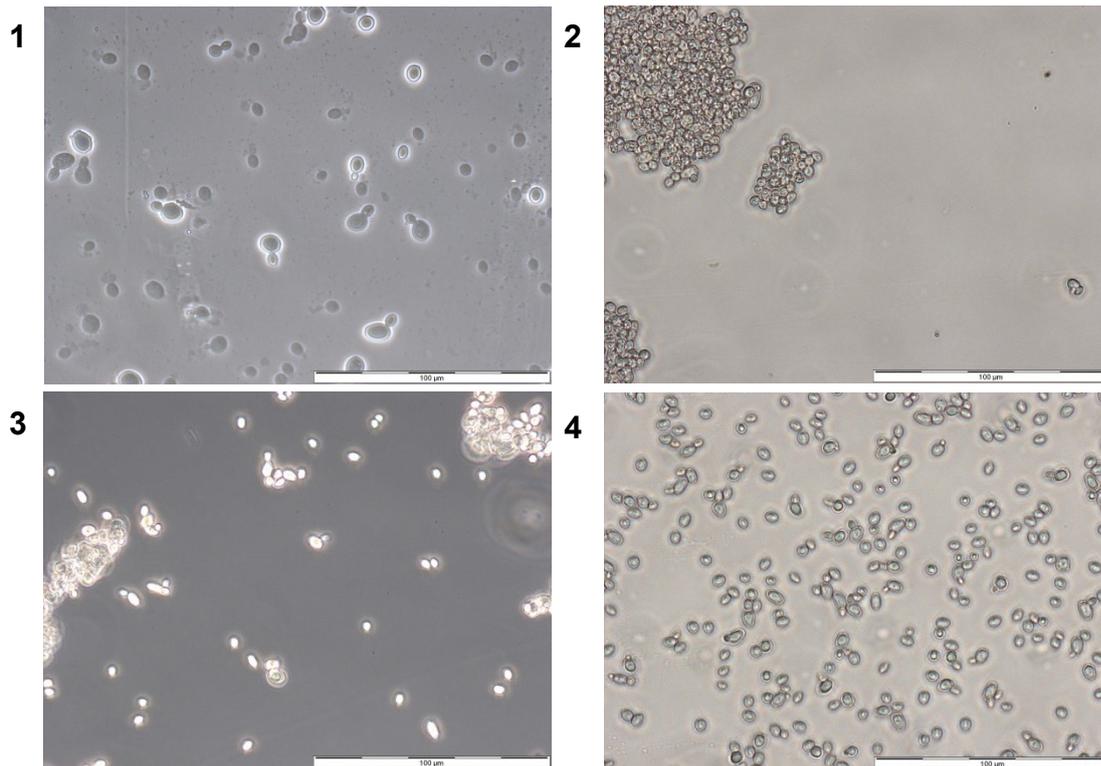


Abbildung 4-10: *S. cerevisiae* 2.200: 1.) Phasenkontrast 2; Probe 1; gute Darstellung der Zellwände, Zellen sind weitgehend intakt; 2.) Phasenkontrast 1; Probe 2; Aggregation der Zellen erkennbar; 3.) Phasenkontrast 2; Probe 3 Aggregation der Zellen; 4.) Phasenkontrast 1; Probe 4; Zellwände sind deformiert und permeabel

Fazit:

Die weiterentwickelte Methode zum chemischen Aufschluss mit 50 µL 70 % Ameisensäure und 50 µL 99,9 % Acetonitril erwies sich als erfolgreich und es konnte auf zusätzliche mechanische Aufschlüsse verzichtet werden. Zur Zellfixierung wurde Ethanol statt Methanol verwendet. Die reine Extraktionszeit beträgt 25 Minuten. Unnötig war der Einsatz von zusätzlichen Lösungsmitteln wie Toluol.

4.1.4 Einfluss des Lösungsmittels auf die Matrix

In einem iterativen Schritt sollte neben der Auswahl einer geeigneten Matrix (Kapitel 4.1) das optimale Mischungsverhältnis von Matrix und Lösemittel (OS *engl.* organic solvent) getestet werden. Variiert wurde das Konzentrationsverhältnis der eingesetzten Matrix HCCA und die Lösungsmittelzusammensetzung von OS (Tabelle 4 -7).

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 4-7: Zusammensetzung der Matrixlösung

Matrix	Einwaage	OS
HCCA (Fluka)	1,5-6,5 mg	500 ACN / 475 H ₂ O / 25 TFA (Bruker)
HCCA (Bruker)	(0,5 mg Schritte)	985 µl ACN / 15 µl TFA 850 µl ACN / 15 µl TFA / 135 µl Wasser 750 µl ACN / 15 µl TFA / 235 µl Wasser 700 µL ACN / 15 TFA / 285 µL Wasser 650 µl ACN / 15 µl TFA / 335 µl Wasser 500 µl ACN / 15 µl TFA / 475 µl Wasser 500 µl ACN / 15 µl TFA / 485 µl Wasser 500 µl ACN / 25 µl TFA / 475 µl Wasser 500 µl ACN / 35 µl TFA / 465 µl Wasser 500 µl ACN / 45 µl TFA / 455 µl Wasser 350 µl ACN / 15 µl TFA / 635 µl Wasser Wasser / ACN (2:1) [x] Wasser / ACN (2:1) + 0,1 % TFA (Endkonzentration) [164] AS/ Wasser / Isopropanol (3:1:2) [165] ACN/ 0,1 % TFA (1:2) / Aceton

Die Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels, wie zum Beispiel Acetonitril, in der die Matrix in Lösung gebracht wird hat einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung einer homogenen Kristallisation auf dem Targetspot.

In organische Lösungsmittel wie Aceton, Methanol, Ethanol, Propanol oder Acetonitril werden hydrophobe Proteine (Membranproteine) gelöst und nicht ausgefällt. Dies beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Es entsteht ein weniger polares Milieu in der Lösung und dies reduziert die Löslichkeit der Proteine.

Bei der Verdunstung des organischen Lösungsmittels entstehen Kapillarkräfte, die zur Ausbildung von sogenannten Eintrocknungsringen führen können [162]. Einen Einfluss auf die Verdunstung hat die Temperatur. Daher wurden die Proben stets in einem klimatisierten Raum bei 20 °C ±1 °C aufgetragen, um konstante Bedingungen zu gewährleisten. In verschiedenen Arbeiten von R. Deegan [162] und S. Gabriel [146] ist beschrieben, dass je schneller die Verdampfung verläuft, schmalere Ringe ausgebildet werden und die Analytmenge in der Spotmitte abnimmt. Daher ist die Auswahl eines schnell verdampfenden Lösungsmittels wie Acetonitril gut geeignet, um eine zu starke Ringbildung am Rand des Probenspots zu verhindern.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In verschiedenen Ansätzen wurde die Konzentration von Acetonitril zu Wasser variiert. In den Abbildungen 4-11 A) bis D) sind die verschiedenen Spektren sowie die belegten Targetspot dargestellt. Abbildung A) zeigt die Ergebnisse der Matrixmischung mit dem geringsten Lösungsmittelanteil (2,5 mg HCCA (Fluka) OS: 350 μ L ACN + 15 μ L TFA + 635 μ L Wasser), Abbildung D) mit der höchsten Konzentration (2,5 mg HCCA (Fluka) OS: 985 μ L ACN + 15 μ L TFA).

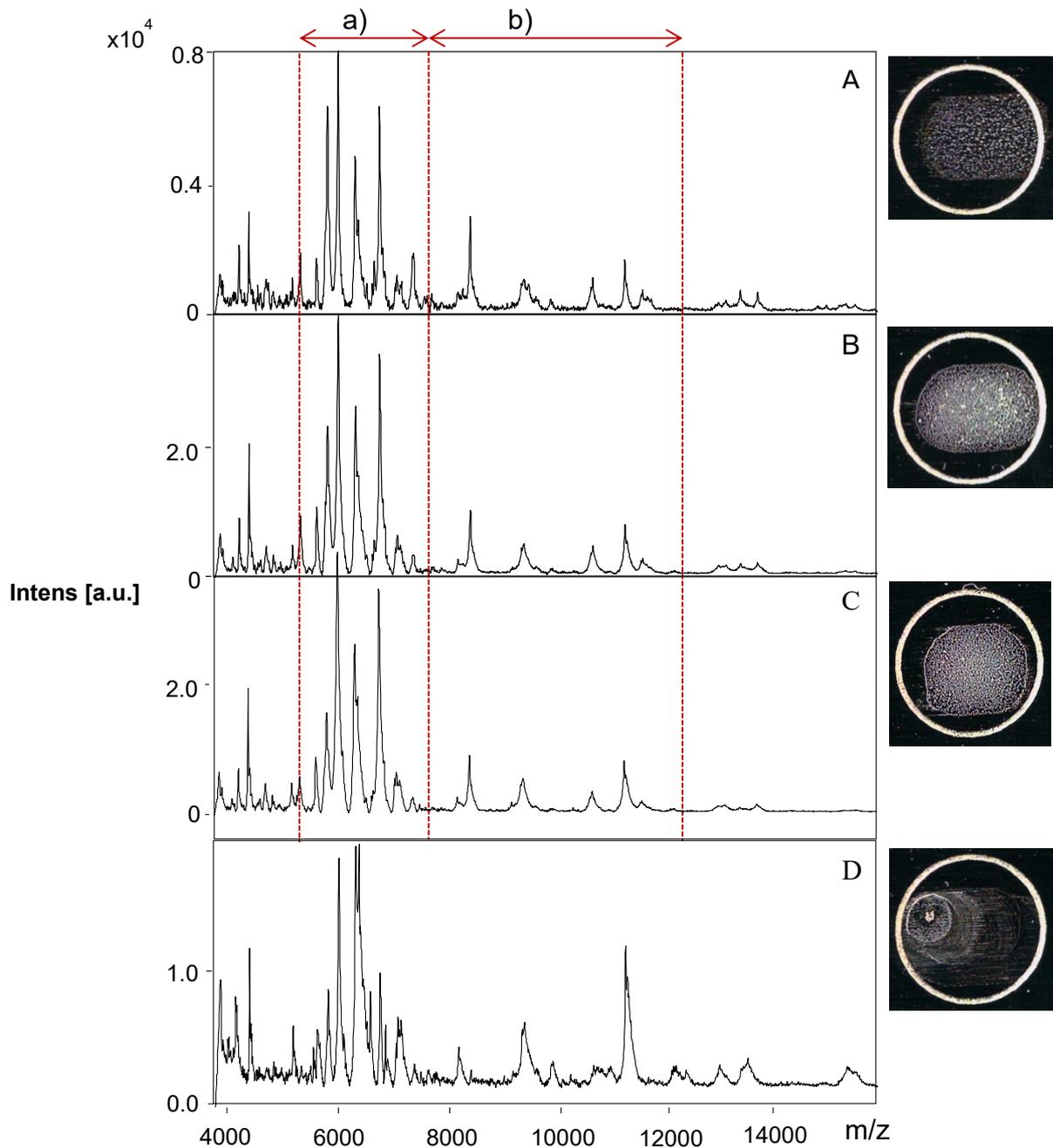


Abbildung 4-11: A) 2,5 mg HCCA (Fluka) OS: 350 μ L ACN + 15 μ L TFA + 635 μ L Wasser auf PS; B) 2,5 mg HCCA (Fluka) OS: 650 μ L ACN + 15 μ L TFA + 335 μ L Wasser auf PS; C) OS: 750 μ L ACN + 15 μ L TFA + 235 μ L Wasser auf PS; D) OS: 985 μ L ACN + 15 μ L TFA auf GS

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Bereich a) von 5-7,5 kDa sind vier charakteristische Peaks erkennbar. Zwischen b) 8-12 kDa sind ebenfalls kleinere, aber ausgeprägte Peaks detektierbar. In der Abbildung 4-11 D) wurde bei der Lösung OS auf Wasser verzichtet. Analyt und Matrix wurden auf ein poliertes Stahltarget aufgetragen. Es ist ein Verlaufen der Probe auf dem Analysenspot zu erkennen. Eine automatisierte Messung war nicht möglich. Die Massenspektren der manuellen Messungen waren ebenfalls schlecht aufgelöst. Zusätzlich wurde die Matrixkonzentration variiert.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Abbildung 4-12 ist der Konzentrationsverlauf von A) 1,5 mg HCCA in 1 mL OS, B) 4,5 mg HCCA in 1 mL OS bis zu 6,5 mg HCCA in 1 mL OS dargestellt. Auf den Spots B) und C) haben sich bei einer erhöhten Matrixkonzentration weiße Kristallflocken ausgebildet. Die Matrix liegt hier in einem Überschuss vor. Die Messungen an diesen Punkten waren nicht möglich. Nur am Rand der Probenspots konnten manuelle Messungen durchgeführt werden. Aber auch eine zu niedrige Konzentration an Matrix, wie in Abbildung 4-12 A) führte nur durch manuelle Messungen zu einem Ergebnis.

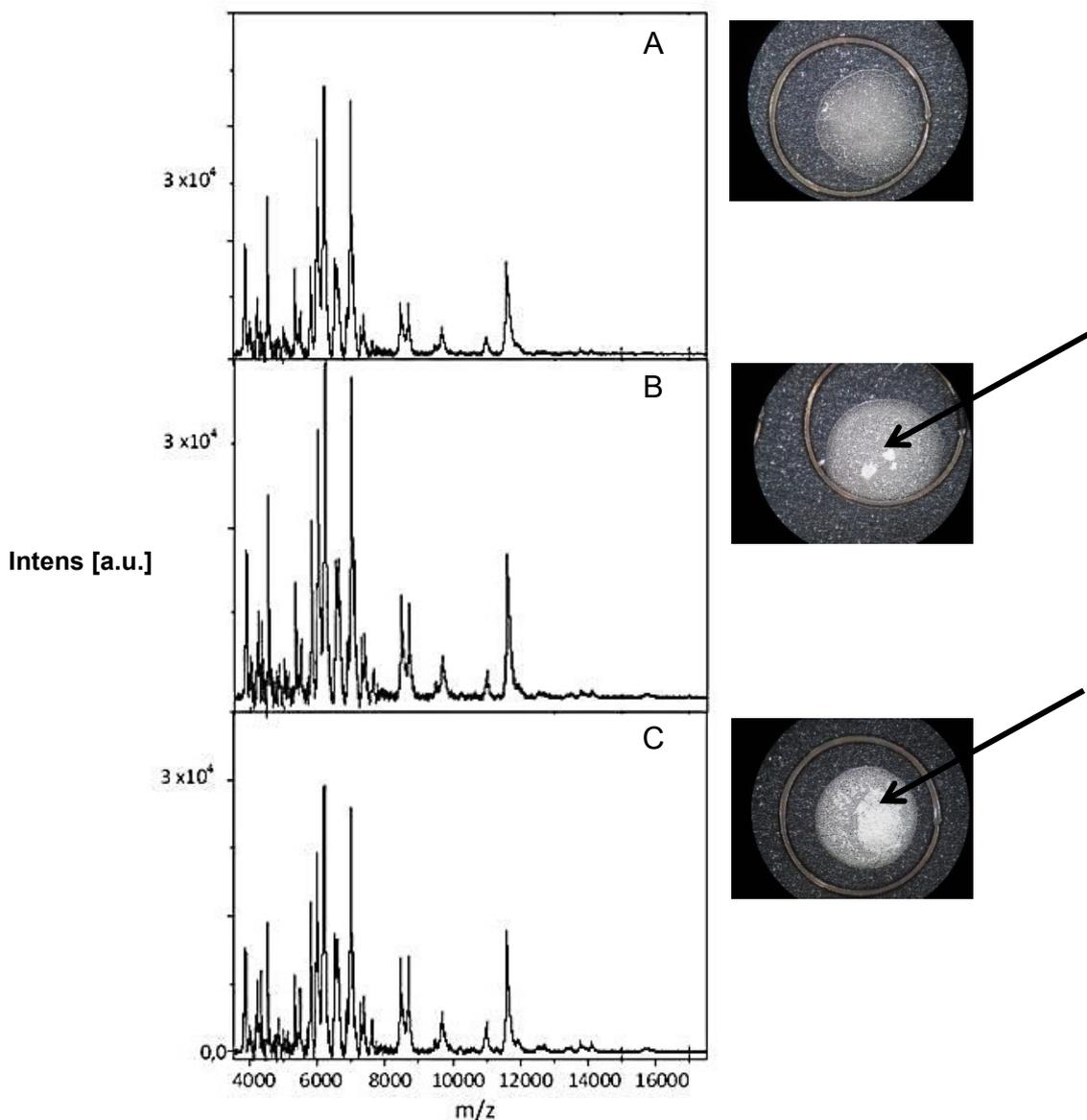


Abbildung 4-12: Vergleich unterschiedlicher HCCA Matrixkonzentrationen; A) 1,5 mg HCCA in 700 μ L ACN/ 15 TFA/ 285 μ L Wasser (OS III); B) 4,5 mg HCCA in OS III; C) 6,5 mg HCCA in OS III

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fazit:

Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit sowohl bei den manuellen wie automatischen Messungen wurde die Zusammensetzung der Matrix und des Lösungsmittels wie folgt gewählt: 2,7 mg HCCA gelöst in OS III (700 μ L ACN + 285 μ L H₂O_{Reinst} + 15 μ L TFA).

Bei diesen Versuchen konnte nochmals bestätigt werden, dass das Produkt der Firma Fluka adäquat zum Produkt der Firma Bruker eingesetzt werden kann.

In der Abbildung 4-13 sind die zwei Massenspektren a) der Brauhefe *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 und b) der Backhefe *Saccharomyces cerevisiae* 2.200 (rechts) dargestellt.

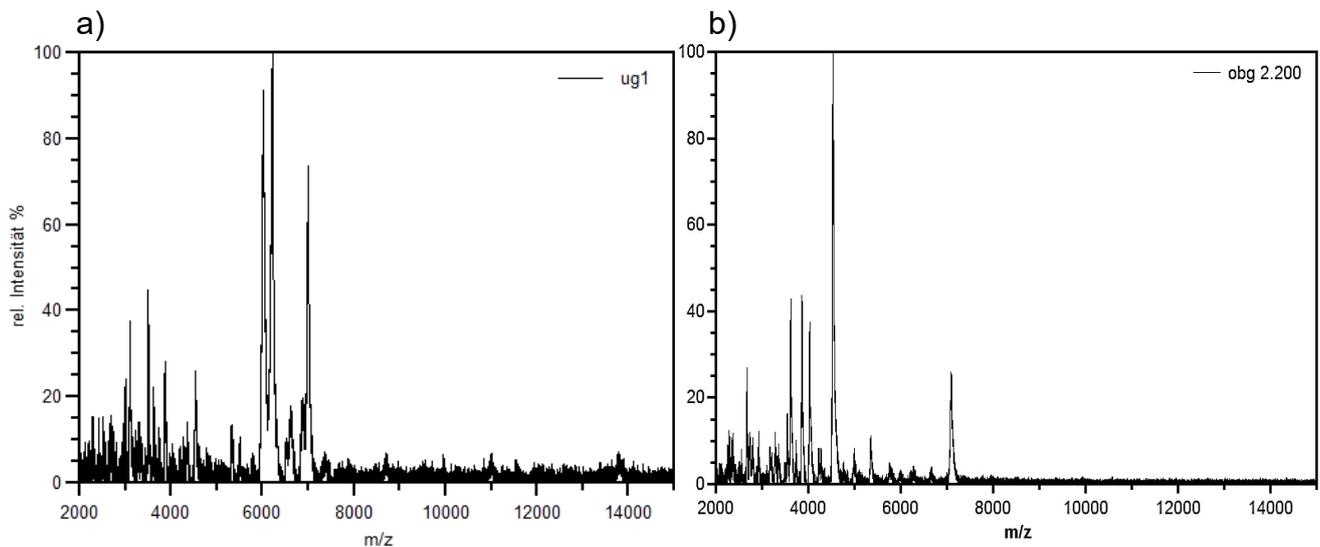


Abbildung 4-13: MS-Spektren a) der untergärigen Brauhefe ug1 und b) der obergärigen Backhefe *S. cerevisiae* 2.200 mit Matrixlösung 2,7 mg HCCA + OS III

Die im SD-Medium angezogenen Hefen befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase mit einer Gesamtzellzahl von 5×10^7 Zellen/mL. Die Proteinextraktion fand mit den in Kapitel 4.1.2 beschriebenen weiterentwickelten Methoden statt. Als Matrixlösung konnte die optimierte Zusammensetzung von HCCA und OSIII verwendet werden. Die Massenspektren wiesen zu diesem Zeitpunkt bereits sichtbare Unterschiede zwischen den beiden Hefespezies auf. Der untersuchte m/z-Bereich wurde von 4-20 kDa auf 2-20 kDa angepasst.

Hinsichtlich der allgemeinen Anwendbarkeit der festgelegten Bedingungen:

- Target: polierter Stahl
- Matrix: 2,7 mg HCCA (Fluka)
- Matrixlösung: OS III 700 μL ACN + 285 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{Reinst}}$ + 15 μL TFA
- Auftragung: reverse thin layer 1 μL Probe; 1,5 μL Matrix
- m/z 2-20 kDa
- Laserschüsse 10 x 100 (20 Hz)

mussten in weiterführenden Untersuchungen die verschiedenen Hefestämme untersucht und eine Differenzierung durch die multivariate Datenanalyse erzielt werden. Im weiteren Forschungsverlauf war es von großem Interesse, ob die Hefestämme in den unterschiedlichen Wachstumsphasen unterschiedliche Protein-Fingerprints aufweisen. So können anhand der Massenspektren die unterschiedlichen Wachstumsstadien ermittelt und benannt werden, was eine weitere wertvolle Information darstellt. Dieser Ansatz führte im Rahmen dieser Arbeit zu einer erhöhten Komplexität.

In den vorangegangenen Versuchen wurden die analysierten Hefestämme nur aus ihrer logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Um reproduzierbare Ergebnisse zu generieren und bewerten zu können, müssen alle Hefen in einem kontrollierten Anzuchtverfahren untersucht werden. Dazu sind wie in Kapitel 3.3 beschrieben die Hefestämme in den unterschiedlichen Labormedien angezogen worden. In den unterschiedlichen Wachstumsphasen sind Proben von Hefezellen entnommen und nach Kapitel 4.1.2 aufgearbeitet worden.

4.1.5 Wachstumsphase der Hefestämme

Während der Anzucht der Hefen in Hefereinzuchtanlagen reagieren Hefezellen auf die sich verändernden chemischen und physikalischen Bedingungen. Diese phänotypische Zustandsänderung wird durch den Status des Proteoms beziehungsweise Metaboloms der Hefezellen dargestellt. Für die Festlegung eines analytisch vergleichbaren Zustandes zur phänotypischen Charakterisierung und Differenzierung der unterschiedlichen Hefestämme ist ein reproduzierbares Anzuchtverfahren notwendig (Kapitel 3.3.2). Neben den definierten physikalischen Bedingungen wurde zunächst ein synthetisches Medium verwendet, da komplexe Medien wie Würzen oder Melasse in ihrer Zusammensetzung Variationen aufweisen können und somit keine exakte Reproduktion der Abläufe und Daten ermöglichen können.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wachstumsverlauf

Untersucht wurden industrierelevante Kulturhefestämme der Spezies *S. cerevisiae* und *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) sowie die Fremdhefe *S. diastaticus* und Nicht-S.-Fremdhefe *Pichia membranifaciens*. Die 11 Hefestämme der *S. cerevisiae* und *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) sind für den Einsatz in der Brau- und Backhefeindustrie von großem Interesse. Hier handelt es sich um die meist genutzten untergärigen und obergärigen Kulturhefen aus den Datenbanken der VLB und VH. *S. diastaticus* zählt zu den weit verbreiteten übervergärenden Schadhefen in der Brauerei. Sie nutzt Nährstoffe, die nach der Vergärung durch die *S. cerevisiae* übrig bleiben. *Pichia membranifaciens* gehört zu den typischen Vertretern der Fremdhefen in der Brauerei und kann zu einer Produktschädigung führen (z. B. Trübung, Filmbildung). Die Untersuchung des Wachstums der verschiedenen Hefestämme im Labormaßstab wurde zunächst durchgeführt, um das spezifische Wachstumsverhalten der jeweiligen Hefestämme über den gesamten Zeitraum der verschiedenen Wachstumsstadien (Latenz-, Akzelerations-, exponentielle, Verzögerungs-, stationäre und letale Phase) [46] zu ermitteln. Verwendet wurden ein SD-Medium nach B. H. Olson und M. J. Johnson [135], sowie die Medien YED und YEPD (Kapitel 3.3.1). Der Wachstumsverlauf wurde mittels Nucleocounter (Kapitel 3.4) überwacht und dokumentiert. Es sind die Mittelwerte der verschiedenen Laboransätze ($n \geq 5$), mit je einer Doppelbestimmung, der verwendeten Medien aufgetragen.

Die Ergebnisse für das SD-Medium sind in den Abbildungen 4-14 bis 4-15 dargestellt, für YED in der Abbildung 4-16 und für YEPD 4-17.

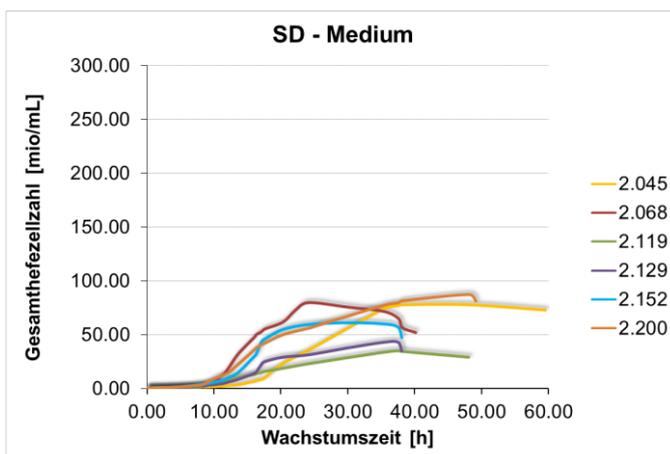


Abbildung 4-14: Wachstumsverlauf von *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen im chemisch definierten Medium. Die Schüttelkolben wurden zum Zeitpunkt $t=0$ mit einer definierten Zellzahl von 1×10^6 Zellen/mL der jeweiligen Vorkultur angeimpft. Die Probenahme wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt und die Zellzahlen mittels Nucleocounter ermittelt.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

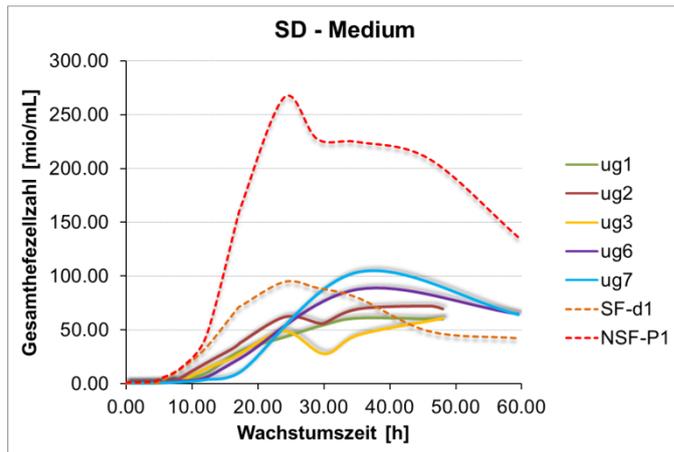


Abbildung 4-15: Wachstumsverlauf von *S. pastorianus* (*ssp. S. carlsbergensis*) Stämmen, *S. Fremdhefen* und Nicht-*S.-Fremdhefen* im chemisch definierten Medium. Die Schüttelkolben wurden zum Zeitpunkt $t=0$ mit einer definierten Zellzahl von 1×10^6 Zellen/mL der jeweiligen Vorkultur angeimpft. Die Probennahme wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt und die Zellzahlen mittels Nucleocounter ermittelt.

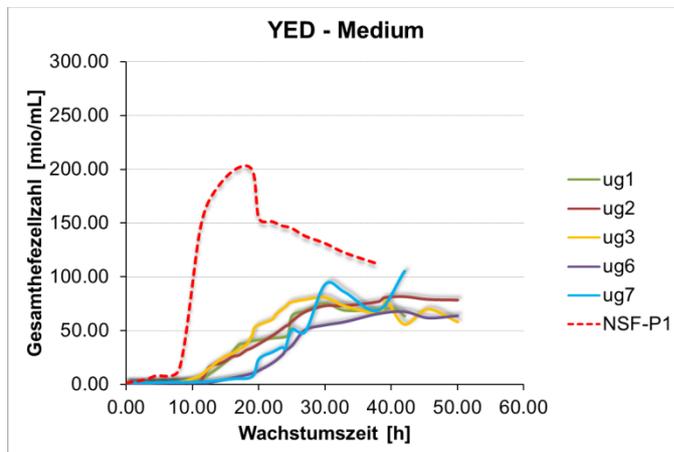


Abbildung 4-16: Wachstumsverlauf von *S. pastorianus* (*ssp. S. carlsbergensis*) Stämmen, *S. cerevisiae var. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* im Yeast extract Dextrose Medium. Die Schüttelkolben wurden zum Zeitpunkt $t=0$ mit einer definierten Zellzahl von 10^6 Zellen/mL der jeweiligen Vorkultur angeimpft. Die Probennahme wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt und die Zellzahlen mittels Nucleocounter ermittelt.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

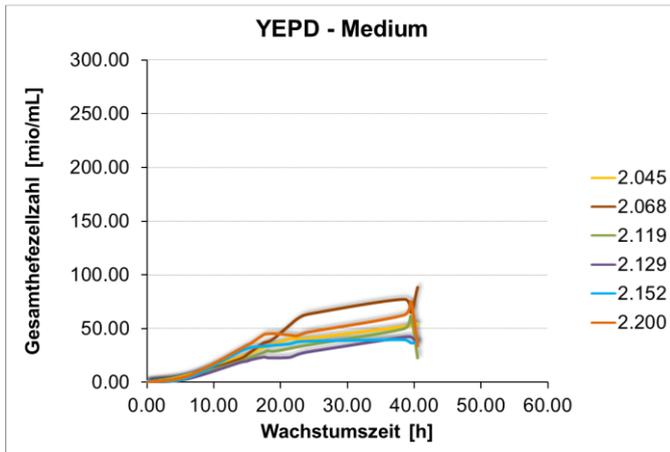


Abbildung 4-17: Wachstumsverlauf von *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen im Komplexmedium Yeast extract Peptone Dextrose Medium. Die Schüttelkolben wurden zum Zeitpunkt $t=0$ mit einer definierten Zellzahl von 10^6 Zellen/mL der jeweiligen Vorkultur angeimpft. Die Probenahme wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt und die Zellzahlen mittels Nucleocounter ermittelt.

In den Abbildungen 4-14 und 4-17 sind die Wachstumskurven der Hefestämme *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*), Nicht-S.-Fremdhefen sowie der *Saccharomyces cerevisiae* Stämme im SD-Medium und YED- beziehungsweise YEPD-Medium dargestellt. Die mittels Nucleocounter ermittelten Gesamtzellzahlen wurden auf der y-Achse gegen die Wachstumszeit (x-Achse) aufgetragen. Es wurde hier bewusst auf die logarithmische Darstellung verzichtet, um die Zellzahl der Hefen in den unterschiedlichen Wachstumsphasen besser erfassen zu können. Das Wachstum der Hefen verlief in den Phasen der Latenz-, Akzelerations-, exponentielle, Verzögerungs-, stationäre und letale Phase wie in der Literatur beschrieben [56].

In der Tabelle 4-8 ist dargestellt wie hoch die durchschnittliche relative Standardabweichung war, zum Zeitpunkt der Probenentnahmen während des Wachstumsverlaufs der unterschiedlichen Hefen. Es wurde wie oben beschrieben mindestens $n \geq 5$ verschiedene Laboransätze, mit je einer Doppelbestimmung, der verwendeten Medien ausgewertet.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 4-8: Relative Standardabweichung der untersuchten Wachstumsphasen der 13 Hefestämme

Hefestamm	Relative Standardabweichung [%]		
	SD-Medium	YED-Medium	YEPD-Medium
2.200	0,27		0,33
2.152	0,39		0,09
2.129	0,22		0,11
2.119	0,70		0,30
2.068	0,27		0,20
2.045	0,39		0,21
ug1	0,13	0,23	
ug2	0,10	0,31	
ug3	0,15	0,41	
ug6	0,06	0,25	
ug7	0,09	0,30	
NSF-P1	0,09	0,12	
SF-d1	0,17		

Es konnte ein standardisiertes Anzuchtverfahren etabliert werden, so dass ein gleichbleibender Wachstumsverlauf gewährleistet war. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass vom Soll abweichende MALDI-TOF-MS-Spektren ihre Ursache im Anzuchtverfahren haben.

Wachstumsverlauf von S. cerevisiae 2.200 und S. carlsbergensis ug1

In den verschiedenen Wachstumsphasen wurden von den 13 unterschiedlichen Hefestämmen jeweils 1 mL Zellsuspension steril entnommen und wie in Kapitel 4.1.2 aufgearbeitet. Die Versuche wurden mindestens drei Mal wiederholt.

Wie in Kapitel 2.3.1 *Taxonomie der Brauhefen* beschrieben gehören die Arten *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces pastorianus* zur Gruppe *Saccharomyces sensu stricto*, die sich aufgrund ihrer rDNA-Spacer-Sequenzen unterteilen lassen [50, 55]. Die *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) hat eine hohe genetische Verwandtschaft mit *S. cerevisiae* (53 %) und *S. bayanus* (72 %) [47]. Aufgrund der Unterschiede im Wachstumsverhalten, Kohlenhydratstoffwechsel und Proteinzusammensetzung wurden die beiden Hefestämme *S. cerevisiae* 2.200 und *S. carlsbergensis* ug1 exemplarisch genutzt, um die Divergenz der beiden obergärigen und untergärigen Hefearten aufzuzeigen. In der Abbildung 4-18 sind die

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Massenspektren der untergärigen Brauhefe *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 und der obergärigen Backhefe *S. cerevisiae* 2.200 dargestellt. Das Wachstum im SD-Medium wurde in einem Zeitraum von 50 h dokumentiert. Es sind deutliche Veränderungen im Protein-Fingerprintprofil der beiden Hefespezies zu erkennen. Im Spektrenverlauf von ug1 sind im Bereich a) von 2-4 kDa und b) 6-10 kDa Signale zu finden. In der ersten Gruppe (2-4 kDa) sind die beiden Peaks bei 3341 Da und 3575 Da auffällig. In der Latenzphase (0 - 3,5 h) lag eine Gesamtzellzahl von 10^6 Zellen/mL vor. Es sind keine auswertbaren MS-Spektren generiert worden. In der Beschleunigungsphase (3,5 h) sind erste Signale detektierbar die während des exponentiellen Wachstums an Intensität zunehmen. Dabei zeigt das Signal bei der Masse 3575 Da einen deutlichen Intensitätsanstieg (3-10 h). Die Intensität des Signals bei 3341 Da ist während der Wachstumszeit von 3-10 h gering. Erst im Übergang von der exponentiellen- zur stationären Phase (25 h) steigt die Intensität signifikant an. In der letalen Phase gleicht das MS-Spektrum dem der Beschleunigungsphase.

Im Massenbereich b) von 6-10 kDa sind vier Peaks, deren Intensitätsverhältnisse sich im Verlauf des Wachstums immer wieder verändern.

Vergleicht man die Spektren der *S. cerevisiae* 2.200 mit denen von *S. carlsbergensis* ug1 ist ein deutlicher Unterschied in den Spektren erkennbar. Bei der *S. cerevisiae* 2.200 sind im Massenbereich a) zwischen 2-8 kDa mehrere Signale detektiert worden. Wobei zwei Signale (3621 Da; 5356 Da) zwischen 0 h und 12 h charakteristisch sind. Nach 26 h sind im gesamten Massenbereich zwischen 2 bis 6 kDa eine Vielzahl an Peaks detektiert worden.

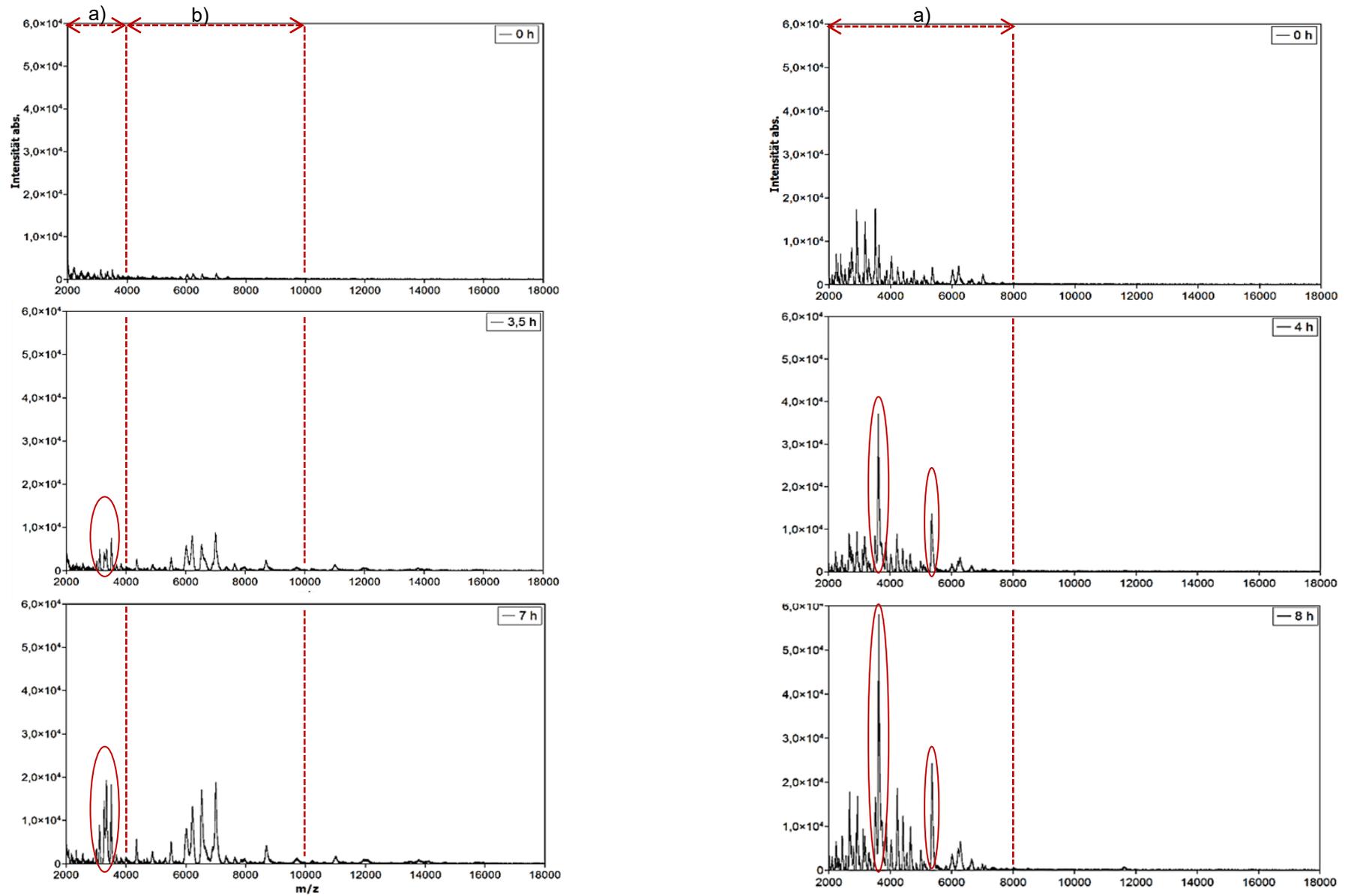


Abbildung 4-18: Wachstumsverlauf von *S. carlsbergensis* ug1 (links) und *S. cerevisiae* 2.200 (rechts)

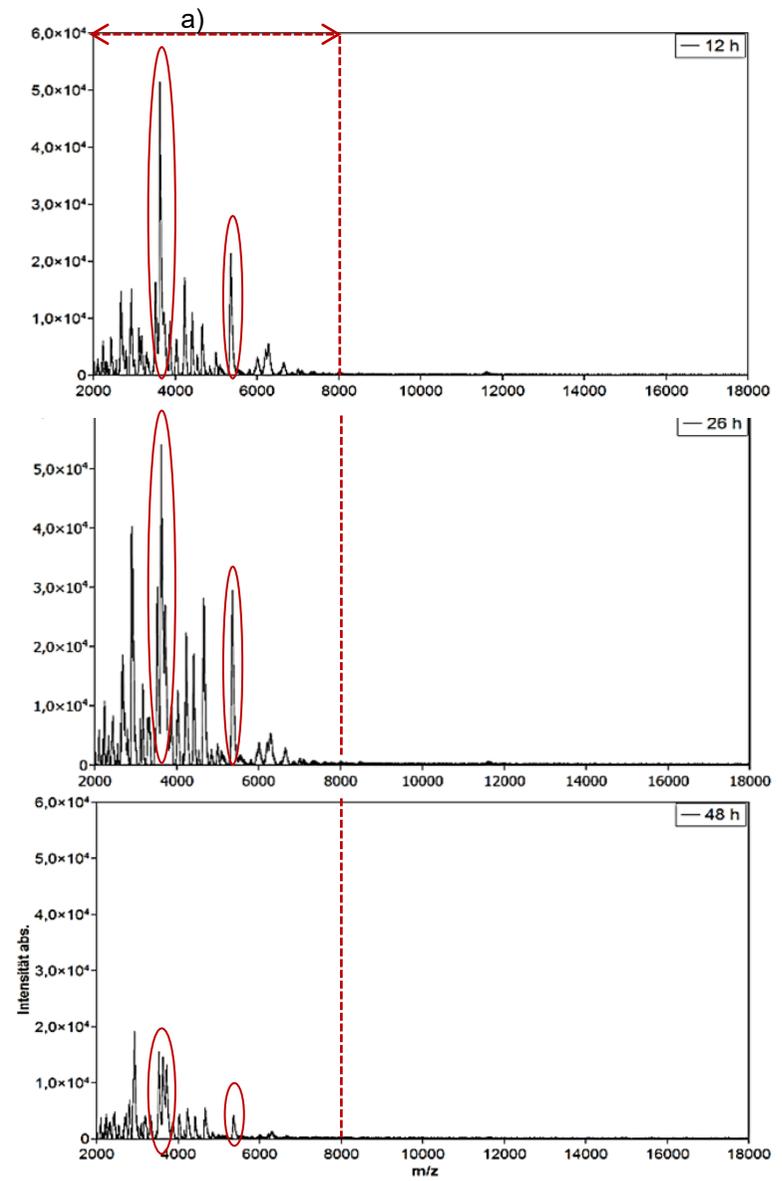
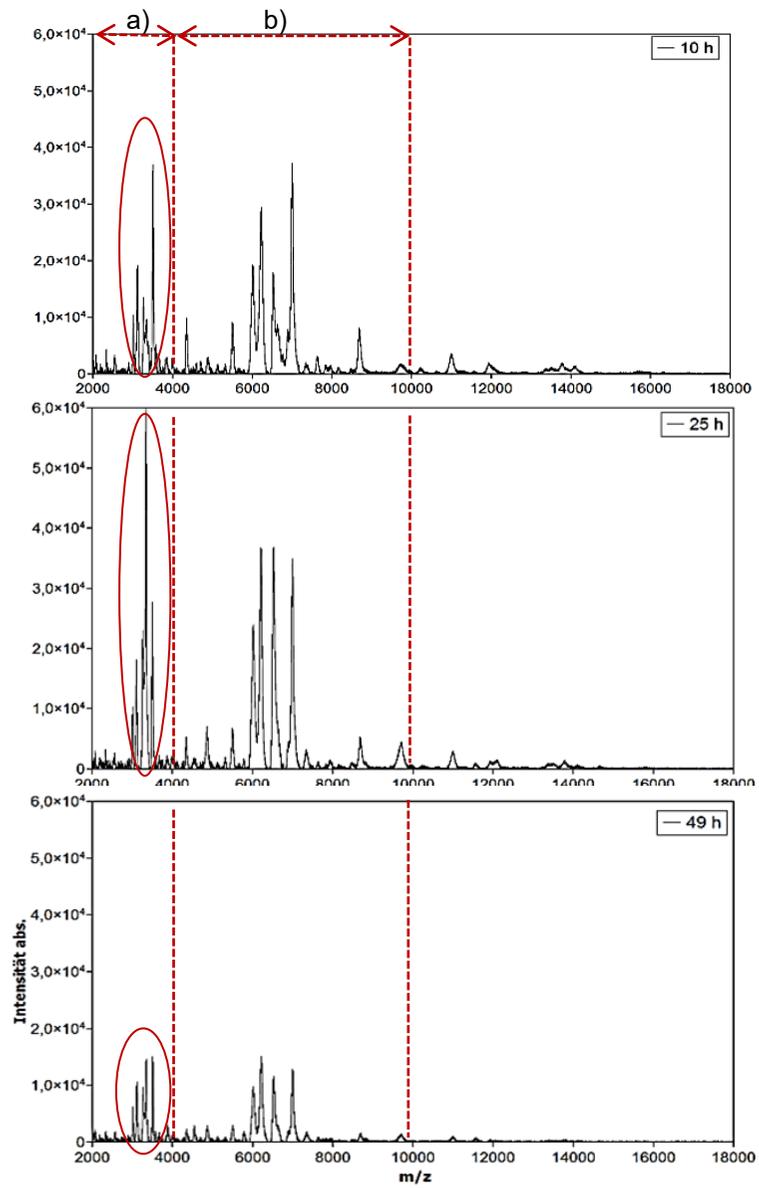


Abbildung 4-18: Wachstumsverlauf von *S. carlsbergensis* ug1 (links) und *S. cerevisiae* 2.200 (rechts)

Fazit:

In diesem Versuch ist deutlich zu erkennen, dass die Wachstumsphasen einen Einfluss auf die Massenspektren der Hefestämme haben.

Eine Erklärung kann die unterschiedliche Konzentration der Hefezellen während des Wachstums sein. Somit variiert die zu extrahierende Proteinmenge. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Untersuchungen eine Hefekonzentration von 10^8 Zellen/mL für die Aufarbeitung festgelegt. Dies stellt die praxisnahe Anwendung dar, da dies die gängige Hefekonzentration bei industriellen Propagationen ist [161]. Hierdurch werden zusätzliche Einflüsse von schwankenden Zellkonzentrationen auf die Messungen ausgeschlossen.

Für den besseren Vergleich der Daten soll an dieser Stelle der Themenkomplex der Hauptkomponentenanalyse eingeführt werden. Denn durch die Vielzahl an Daten ist die Erfassung grafischer Unterschiede der Massenspektren für das menschliche Auge nicht mehr möglich.

Ausgehend von den mittels MALDI-TOF-MS gemessenen Protein-Fingerprints der 13 unterschiedlichen Reinzuchthefen soll mit Hilfe der chemometrischen Methoden PCA und SIMCA eine Differenzierung beziehungsweise Klassifizierung der unterschiedlichen Hefestämme gefunden werden.

4.2 Hauptkomponentenanalyse der Wachstumsphasen

Ziel war es, mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse herauszufinden, ob sich die verschiedenen Wachstumsstadien (Latenz-, Akzelerations-, exponentielle, Verzögerungs-, stationäre und letale Phase) innerhalb eines Hefestammes differenzieren lassen und ob anhand der gemessenen Protein-Fingerprints zu den unterschiedlichen Wachstumsstadien herausgefunden werden kann, welche MS-Daten für eine Klassifizierung der unterschiedlichen Hefen geeignet sind.

Die an den 13 Hefestämmen durchgeführten MS-Messungen führten zu großen spektralen Datenmatrices. Zur Auswertung und besseren Visualisierung der Daten wurde die Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Bei diesem Verfahren der multivariaten Statistik werden die ursprünglichen, unabhängigen Variablen der Datenmatrix X (original MS-Daten) in die neuen künstlichen Variablen, sogenannte

Hauptkomponenten (PC), überführt. Die ursprüngliche Datenmatrix wird auf einen niedriger dimensionierten Raum projiziert (siehe auch Kapitel 2.5.2).

4.2.1 Auswertung der Daten im SD-Medium

Von jedem Hefestamm wurden $n \geq 5$ unabhängige Laboransätze im SD-Medium untersucht (Kalibrierdatensätze). Innerhalb der unterschiedlichen Wachstumsphasen (HK 0 h - 50 h) sind jeweils $n \geq 2$ Proben entnommen und aufgearbeitet worden. Dafür wurden die Hefeproteine aus den aufkonzentrierten Proben mit einer Zellzahl von 1×10^8 Zellen/mL extrahiert und mindestens $n \geq 3$ auf das Target aufgetragen. Anschließend sind mit jeweils 10 mal 100 Laserschüssen (1000 Einzelspektren pro Spot) die einzelnen Spots beschossen und gemessen worden (siehe Tabelle 4-9).

Tabelle 4-9: Anzahl der Kalibrierdaten bzw. -spektren der untersuchten Hefestämme im SD-Medium

Hefestamm	Anzucht gesamt $n \geq 5$	MS-Spektren (Einzelspektren)
2.200	8	306 (306.000)
2.152	5	189 (189.000)
2.129	5	240 (240.000)
2.119	5	261 (261.000)
2.068	5	193 (193.000)
2.045	5	240 (240.000)
ug1	7	333 (333.000)
ug2	6	340 (340.000)
ug3	5	309 (309.000)
ug6	5	240 (240.000)
ug7	5	225 (225.000)
SF-d1	5	116 (116.000)
NSF-P1	5	110 (110.000)

Die aufsummierten „Rohspektren“ wurden als ein Summenspektrum in dem Bruker Softwareprogramm FlexAnalysis 3.3 (Build 80) (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) einer Basislinienkorrektur unterzogen (3.8.1). Die Grundlinie wird mit der top-hat Funktion [76] subtrahiert. Anschließend konnten die MS-Daten als txt.-Datei in das The Unscrambler® X 10.1 - System (©2009-2011, CAMO Software AS, NOR) übertragen und bearbeitet werden. Der untersuchte Massenbereich ist auf 2000,36-12999,34 Da

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

beschränkt worden, da keine zusätzlichen beziehungsweise Signale von 13-20 kDa detektiert wurden. Wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben, wurden die Daten nach dem Savitzky-Golay-Verfahren geglättet, um enthaltene Störsignale, die in Form eines „Spektrengeräusch“ auftreten, zu bereinigen. Die Signalintensitäten, die durch unterschiedliche Schichtdicken der Matrices oder eventueller Unterschiede in den „hot spots“ (Probenverteilung auf dem Target) entstehen, wurden mit der Flächennormierung ausgeglichen.

Die bearbeiteten Massenspektren der unterschiedlichen Wachstumsstadien wurden von jedem Hefestamm zu einem Datensatz zusammengefügt und eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. In der Abbildung 4-19 ist der Score-Plot des Hefestammes *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1, gewachsen im SD-Medium, abgebildet.

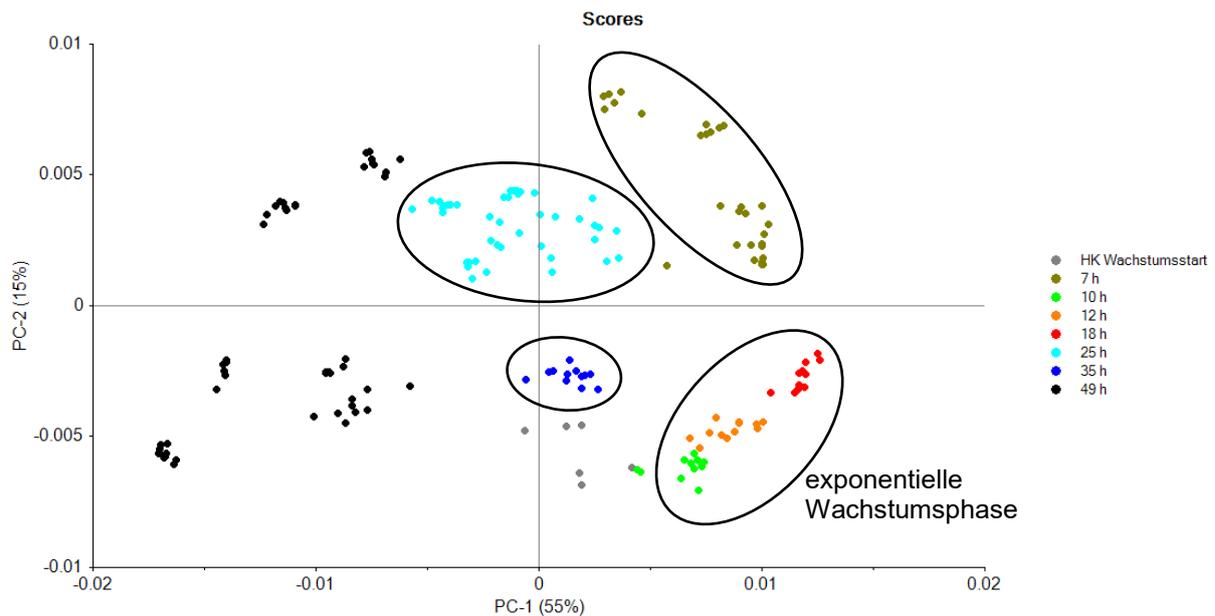


Abbildung 4-19: Score-Plot der untergärigen Reinzuchtheefe *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 im SD-Medium gewachsen (49 h) 10^8 Zellen/mL; jeder Punkt entspricht einem aufsummierten Massenspektrum; dargestellt sind die ersten zwei Hauptkomponenten (PC1-2), die zusammen 70 % der Gesamtvarianz erklären

Der dargestellte Score-Plot der untergärigen Reinzuchtheefe *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 enthält jeweils das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse der gewichteten, durch die Standardabweichung dividierten, MS-Daten ausgewählter Kalibrierdaten. Im Score-Plot 4-19 sind die Daten der Protein-Fingerprints der unterschiedlichen Wachstumsstadien im dem neuen Koordinatensystem (Koordinaten relativ zu den Hauptkomponenten) dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die acht Klassen (Wachstumsstadien)

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Hauptkultur (HK) Wachstumsstart (grau), 7 h (dunkelgrün), 10 h (hellgrün), 12 h (orange), 18 h (rot), 25 h (hellblau), 35 h (dunkelblau) und 49 h (schwarz) gut voneinander differenzieren lassen. Die Streuung innerhalb der Klassen ist außer bei den beiden Klassen HK Wachstumsstart (grau) und 49 h (schwarz) gering. Die Streuung dieser Daten ist damit zu erklären, dass das Signal-Rausch-Verhältnis in den gesamten Massenspektren der beiden Wachstumsstadien sehr gering war. Trotz Glättung der Daten konnten keine signifikanten Signale bei den beiden Klassen HK Wachstumsstart und 49 h ausgewertet werden. Diese Daten wurden von dem Kalibrierdatensatz entfernt. Des Weiteren fällt auf, dass die Daten der exponentiellen Wachstumsphase (10 h - 18 h) sich voneinander differenzieren lassen, aber trotzdem eine eigene Klasse bilden.

Der Score-Plot besteht aus den beiden Hauptkomponenten PC-1 und PC-2. Die erste Hauptkomponente erklärt 55 % Varianz der Daten. Die Projektion aller Objekte (Messungen) auf dieser PC-1 Achse, zeigt die größtmögliche Variabilität zueinander. Die zweite Hauptkomponente PC-2 mit 15 % bildet den maximalen Anteil der von der ersten Hauptkomponenten PC-1 nicht erfassten Varianz. Die ersten beiden Hauptkomponenten erklären zusammen 70 % der Varianz der Daten. Auch für den obergärigen Hefestamm *S. cerevisiae* 2.200 konnte eine erste gute Differenzierung der unterschiedlichen Wachstumsstadien erreicht werden (Abbildung 4-20).

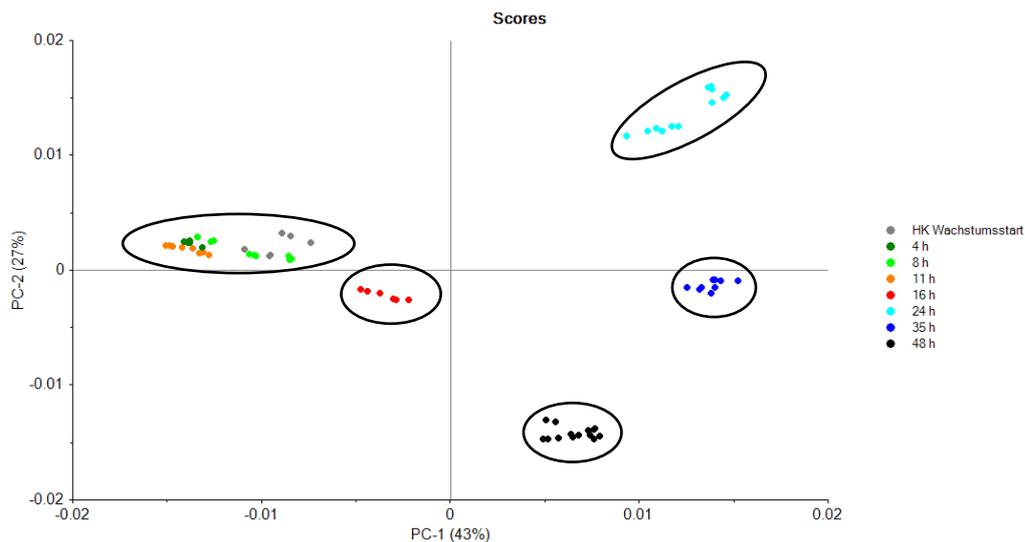


Abbildung 4-20: Score-Plot der obergärigen Reinzuchtheefe *S. cerevisiae* 2.200 in SD-Medium gewachsenen (48 h) 10^8

Die Klasse 24 h stationäre Wachstumsphase (hellblau) sowie die beiden Klassen 35 h (dunkelblau) und 48 h (schwarz) letale Phase befinden sind im rechten Teil des Score-

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Plots und die Daten der Latenz-, Akzelerations-, und exponentiellen Phase auf der linken Seite des Score-Plot. Dieser Score-Plot PC-1 und PC-2 erklärten ebenfalls 70 % der Varianz der Daten.

Im Anhang 7.5 sind die Score-Plots der restlichen 11 Hefestämme, gewachsen im SD-Medium, dargestellt. Auch bei diesen Hefestämmen konnte eine Differenzierung der Wachstumsstadien erreicht werden.

Fazit:

Ein Ziel dieser Forschungsarbeit war es, mit Hilfe eines mathematischen Modells eine Differenzierung der verschiedenen Wachstumsstadien der Hefestämme betrachten zu können. Die oben dargestellten ersten Ergebnisse zeigen, dass die gewählten methodischen Ansätze vielversprechend sind und eine Differenzierung erlauben.

Wie in den Kapiteln 2.3.2 Hefepropagation und 2.4.2 Fermentation beschrieben hat die Propagation im Labormaßstab den Zweck, Hefereinkulturen heranzuziehen die eine ausreichende Zellzahl, Vitalität sowie Viabilität besitzen.

Deshalb wurden im nächsten Schritt die Datensätze HK Wachstumsstart (grau) und HK 49 h (schwarz) aus den Kalibrierdaten entfernt. Die Daten weisen zum einen keine spezifischen Protein-Fingerprints im Massenspektrum auf, außerdem werden zum Anstellen der Propagation keine Zellen aus der letalen Phase entnommen.

Die Daten der HK 25 h wurden zunächst für eine bessere Aufgliederung der Kalibrierdaten berücksichtigt, auch wenn in der Brau- und Backhefeindustrie keine Hefezellen aus der stationären Phase für eine Propagation genutzt werden.

Nach der Reduzierung der Daten wurde wieder eine PCA für die 13 Hefestämme durchgeführt. In der Abbildung 4-21 sind die ersten zwei Hauptkomponenten (PC1-2) der Reinzuchtheffe *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 mit den fünf unterschiedlichen Klassen HK 7 h (hellgrün), HK 10 h (orange), HK 12 h (dunkelgrün), HK 18 h (rot) und HK 25 h (hellblau) dargestellt. Jeder Punkt entspricht einem aufsummierten MS-Spektrum.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

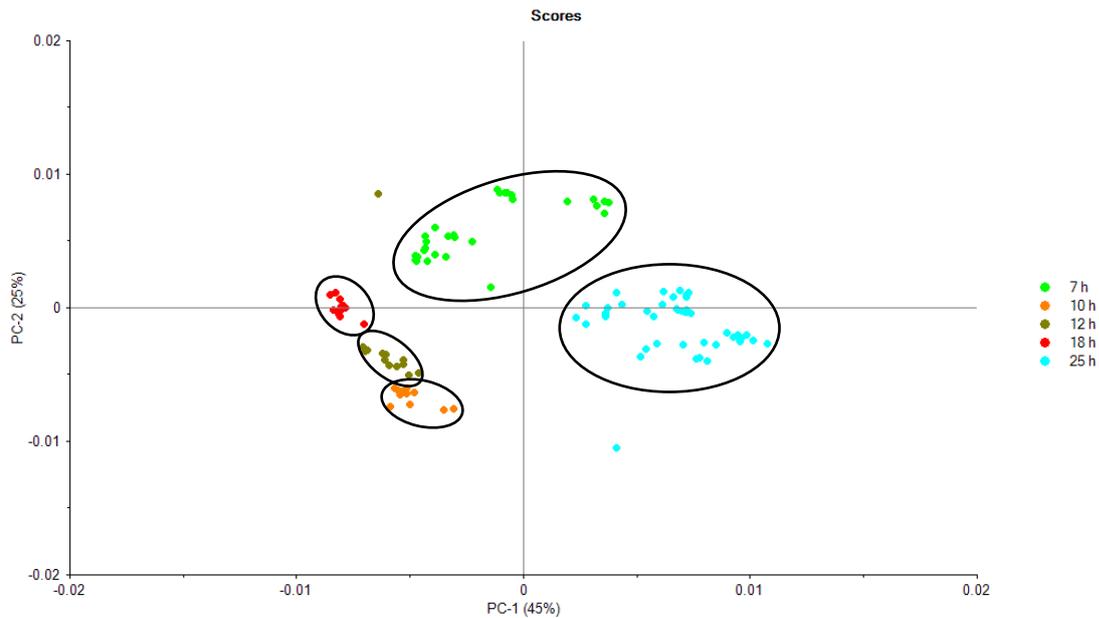


Abbildung 4-21: Score-Plot der untergärigen Reinzuchtheefe *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) u91 in SD-Medium gewachsen (HK 7 h - 25 h) 10^8 Zellen/mL

Auch hier zeigt sich eine gute Trennung der unterschiedlichen Klassen (Wachstumsphasen). In dem PC-1-PC-2-Scoreplot ist zu erkennen, dass die Klasse 18 h (rot) sich auf der negativen PC-2 Achse befindet und die Klasse 25 h (hellblau) auf der positiven PC-2 Achse und sie sich somit deutlich voneinander trennen. Was nicht verwunderlich sein sollte, da sich die Hefe bei 18 h im exponentiellen Wachstum und bei 25 h bereits in der stationären Phase befand. Dagegen befinden sich die Klassen 12 h (dunkelgrün) und 10 h (orange) in der Richtung negative PC-1 und PC-2 Achsen. Auch hier liegen die Daten des exponentiellen Wachstums der Hefe von HK 10 h, HK 12 h und HK 18 h dicht beieinander und bilden zusammen eine Gruppe. Die Datenpunkte der Klasse 7 h (hellgrün) streuen stärker und befinden sich auf der Seite der positiven PC-1 Achse.

Im PC-3-PC-4-Scoreplot (Abbildung 4-22) ist zu erkennen, dass keine gute Trennung der einzelnen Klassen 7 h bis 25 h mehr möglich ist. Die Klasse 25 h (hellblau) streut sowohl auf der positiven als auch auf der negativen PC-4 Achse. Ebenfalls tritt eine Streuung der Klasse 7 h (hellgrün) mit negativem PC-3 und PC-4 Scorewert auf. Die Proben der Klasse 18 h (rot) haben positive PC-3-PC-4-Scorewerte und weisen keine Streuung auf. Für die Klasse 10 h (orange) ist es genau gegensätzlich, sie zeigen negative PC-3-PC-4-Scorewerte.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

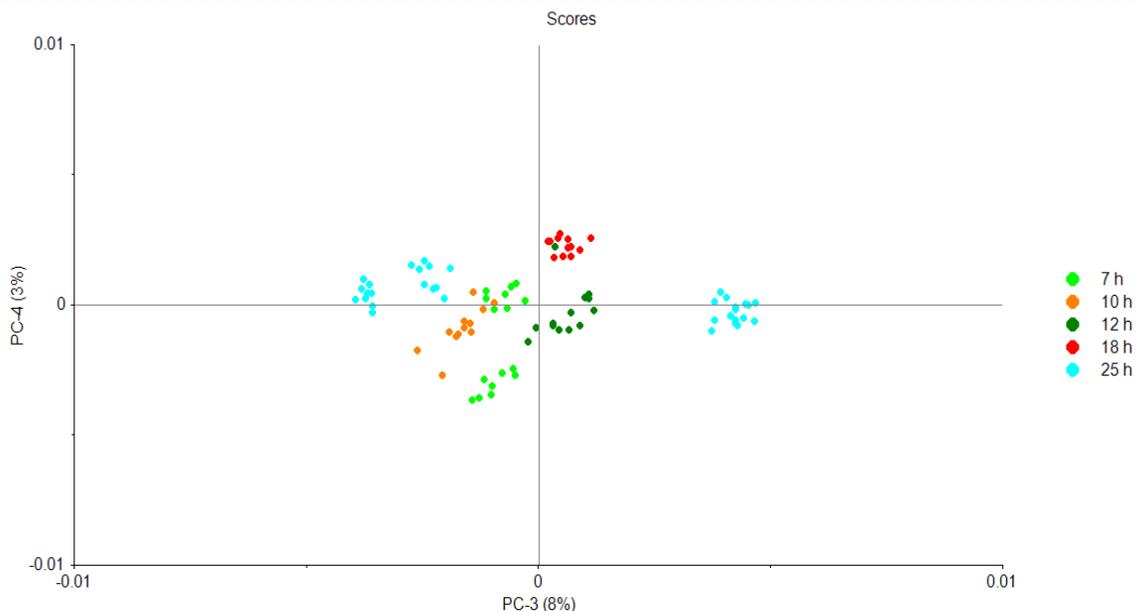


Abbildung 4-22: Score-Plot für PC-3 und PC-4 der untergärigen Reinzuchtheefe *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 in SD-Medium gewachsen (HK 7 h - 25 h) 10^8 Zellen/mL

Um die Ursache der Gruppenbildung näher zu betrachten, werden die x-Loadings ausgewertet.

x-Loadings

An dem Loadingsplot (Abbildung 4-23) ist zu erkennen, dass die erste Hauptkomponente PC-1 dominiert wird durch die Unterschiede der Variablen (Massen x-Achse des Massenspektrum) im Bereich 2000-2800 Da, 2800-3500 Da und 6000-7300 Da (roter Rahmen in Abbildung 4-23).

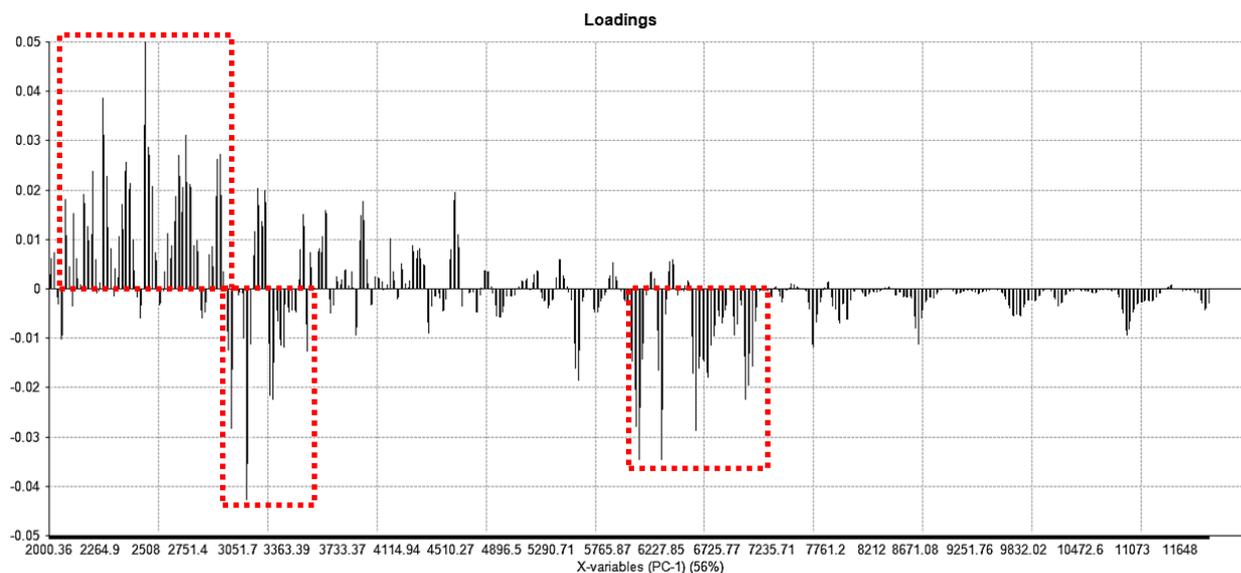


Abbildung 4-23: Loadingsplot für PC-1 der mittels MALDI-TOF-MS ermittelten MS-Daten der untergärigen Reinzuchtheefe *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 in SD-Medium gewachsen (HK 7 h - 25 h) 10^8 Zellen/mL

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die PC-3 (Abbildung 4-25) enthält die Informationen der Variablen 3400-3500 Da und erklärt nur noch 8 % der Gesamtvarianz.

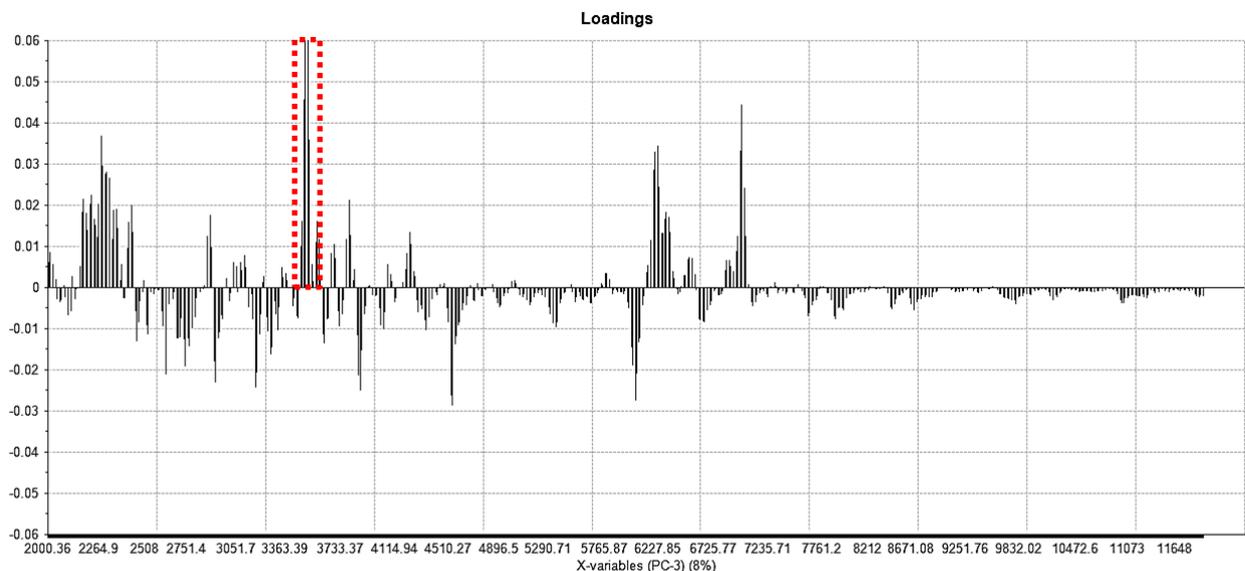


Abbildung 4-25: Loadingsplot für PC-3 der mittels MALDI-TOF-MS ermittelten MS-Daten der untergärigen Reinzuchtheefe *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 in SD-Medium gewachsen (HK 7 h - 25 h) 10^8 Zellen/mL

Die ersten vier Hauptkomponenten erklären zusammen 88 % der Gesamtvarianz. Das reicht nicht aus, um die Varianz in der Datenmatrix vollständig zu erklären und das Modell der Reinzuchtheefe *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 vollständig zu beschreiben.

Erst fünf Hauptkomponenten erklären über 90 % der Gesamtvarianz. Für eine spätere SIMCA-Klassifikation ist es notwendig für jedes Modell (Hefestamm) die richtige Anzahl der Hauptkomponenten zu verwenden. Zu wenige Hauptkomponenten können zu Informationsverlusten innerhalb der Datensätze führen und zu viele Hauptkomponenten zum Überbewerten des Rauschanteils. Daher wurden von jedem Kalibrierdatensatz eines Hefestammes, welcher zur Bildung eines Modells verwendet werden sollte, eine Kreuzvalidierung und eine Ausreißerbetrachtung mittels Influence-Plot durchgeführt.

Kreuzvalidierung und Influence-Plot

Bei einer Kreuzvalidierung (*engl.* Full Cross Validation) wird eine Klassifikationsmethode bei gegebener Größe N des Kalibrierdatensatzes jeweils auf $(N - 1)$ Beobachtungen angewendet und für die N -te Beobachtung getestet. Dieser Vorgang wird N mal wiederholt. Es wird somit nacheinander jeweils eine MS-Messung

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

aus dem Kalibrierdatensatz entfernt und das Modell ohne diese Messung neu erstellt. Jede Probe wird genau einmal weggelassen. [70]

Das heißt, bei diesem Modell der *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 sind es 333 Daten (siehe Tabelle 4-9) und somit 333 Kalibriermodelle. Daraus ergibt sich eine Abweichung zwischen den ursprünglichen MS-Kalibrierdaten und den mit Hilfe des Modells vorhergesagten Daten. Vorteil dieser Methode ist, dass die Fehlerrate beinahe unverzerrt ist. Die Residuen sind als Maß für diese Abweichung heranzuziehen. Mit Hilfe der Residuen kann dann wiederum die nicht erklärte Varianz der Validierung (Abbildung 4 - 26 rote Balken) betrachtet werden, so dass sich die zu 100 % durch das Modell erklärte Varianz ergeben sollte.

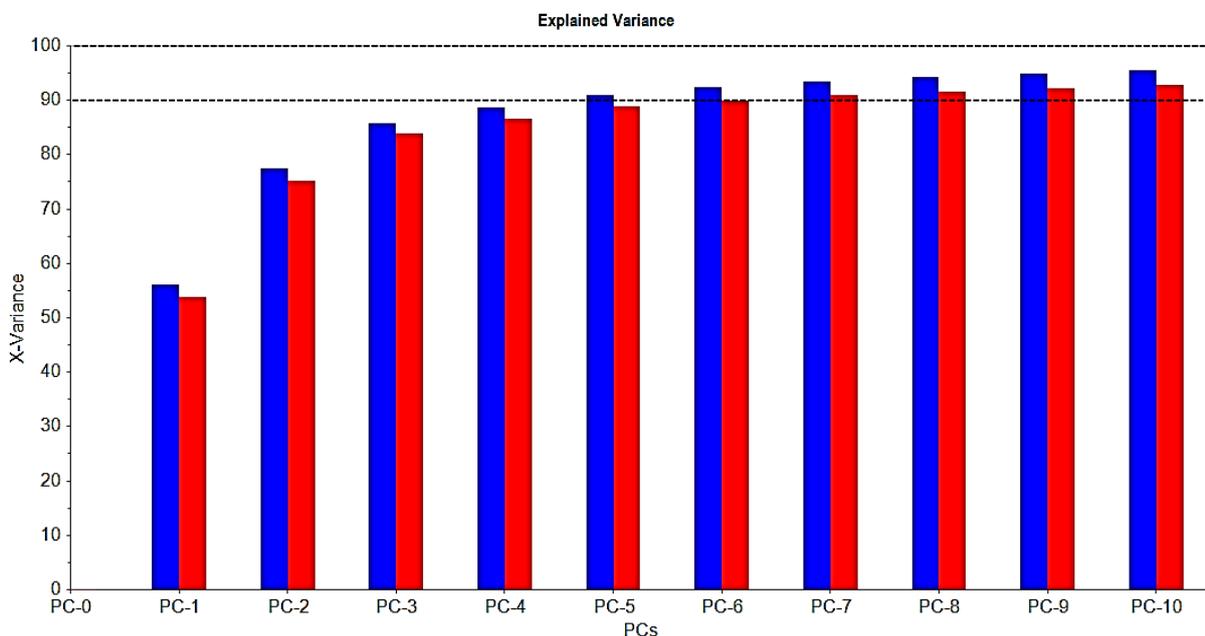


Abbildung 4-26: Erklärte Varianz der X-Variablen; Kalibrierung (blau), Validierung (rot)

In der Abbildung 4-26 ist die erklärte Varianz für die Kalibrierung (blau) und die Validierung (rot) als Balkendiagramm dargestellt. Mit Hilfe dieser Grafik ist schnell zu erkennen, dass bei PC-5 über 90 % der Gesamtvarianz der Kalibrierdaten erklärt ist. Bei der PC-7 kann mit über 90 % die Varianz der Validierung beschrieben werden. Die erklärte und nicht erklärte Varianz der Validierung beziehungsweise der Kalibrierung sollten nahe beieinander liegen. Hier liegt eine Differenz von 2 % vor. Dies kann begründet werden durch folgende Sachverhalte: Die Hefe ist ein komplexes Lebewesen, auch unter optimalen Versuchsbedingungen kommt es bedingt durch minimale Abweichungen im Geno- und Phänotyp ein und derselben Hefe zu Schwankungen in der Proteinzusammensetzung der einzelnen Zellen. Zusätzlich sind

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Messunsicherheiten und Differenzen bei der Probenvorbereitung zu berücksichtigen. Aufgrund dieser Auswertung fiel die Entscheidung auf ein Modell mit sieben Hauptkomponenten, da bei PC-7 über 90 % der Gesamtvarianz erklärt werden.

Wie groß der Einfluss einer Probe auf das erstellte PCA-Modell ist, zeigt der Influence-Plot. In der Abbildung 4-27 ist der Influence-Plot der Proben des Hefestammes ug1 dargestellt. Aufgetragen auf der x-Achse ist die Leverage, der Einfluss den jedes Objekt (MS-Daten) auf das Modell ausübt. Die Restvarianz wird anhand der y-Achse dargestellt.

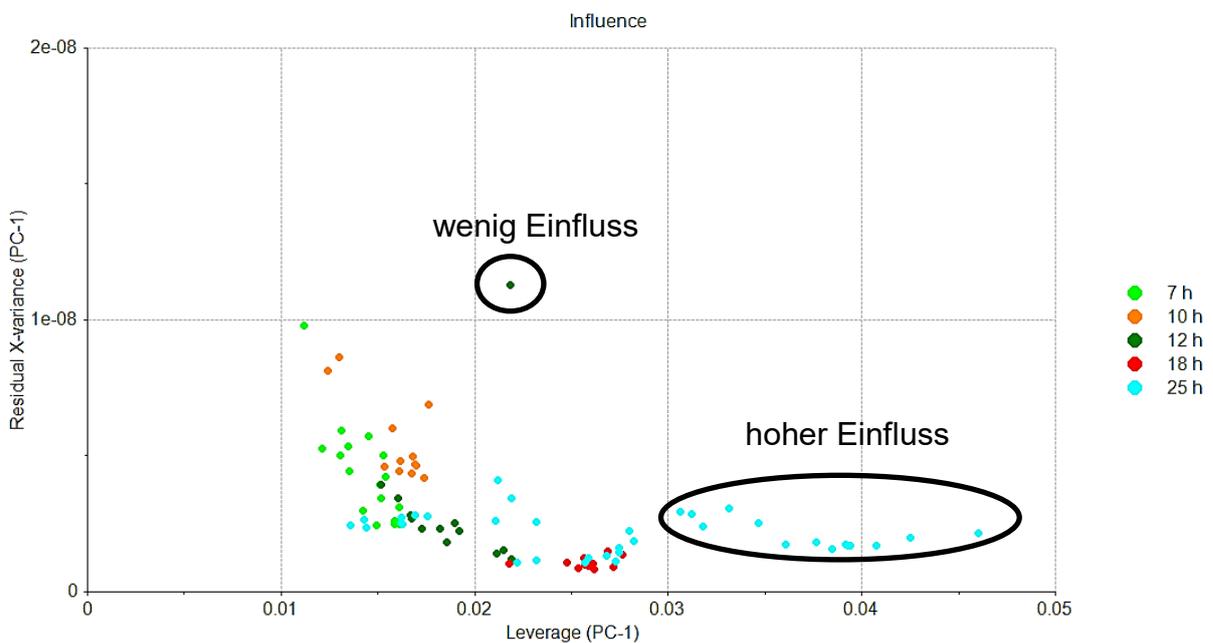


Abbildung 4-27: Influence Plot des Hefestammes ug1

Werte mit einem hohem „Leverage“ sind Datenpunkte, die das Modell beeinflussen können. Die in der Abbildung umkreisten Datenpunkte der Hauptkultur 25 h (hellblau) haben einen höheren Leverage-Wert (0,03 bis 0,045) als die „Mitte“ des PCA-Modells (0,015) und beeinflussen das Modell. Die Daten haben einen drei- beziehungsweise vier-mal so starken Einfluss auf das Modell mit einer Hauptkomponente wie eine Durchschnittsprobe. Bei der Betrachtung der verschiedenen PCA-Score-Plots (Abbildung 4-21 und 4-22) ist erst bei PC-3-PC-4 ein deutlicher Einfluss der Kalibrierdaten von 25 h (hellblau) im Score-Plot zu erkennen. Ein Teil der Proben von 25 h grenzt sich deutlich von den anderen Klassen ab (rechter Quadrant auf PC-4 Achse). Der Datenpunkt 12 h (dunkelgrün) in der oberen Hälfte der Grafik (Abbildung 4-27) wird von diesem Modell nicht ausreichend beschrieben und hat wenig

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Einfluss auf das Modell. Hier handelt es sich um einen Ausreißer. Mit Hilfe der Influence-Plots lassen sich so Ausreißer betrachten und das Kalibriermodell mit einer vollständigen Kreuzvalidierung überprüfen.

Die Kalibrierdaten aller Hefestämme wurden so getestet und die optimale Anzahl der PCs für jeden einzelnen Hefestamm erarbeitet. In der Tabelle 4-10 sind die Anzahl der verwendeten PCs für die untersuchten Hefestämme im SD-Medium aufgelistet.

Tabelle 4-10: Anzahl an PCs der untersuchten Hefestämme im SD-Medium

Hefestamm	PCs	Erklärte Varianz [%]
2.200	12	98
2.152	11	95
2.129	15	90
2.119	7	92
2.068	7	95
2.045	15	91
ug1	10	95
ug2	5	98
ug3	12	97
ug6	12	94
ug7	12	94
SF-d1	10	95
NSF-P1	6	95

4.2.2 Auswertung der Daten im YED- und YEPD-Medium

Wie in Kapitel 3.3.2 *Anzucht der Hefekulturen im Labor* beschrieben, wurden die unterschiedlichen Hefestämme ebenfalls in den Labormedien YED beziehungsweise YEPD angezogen und die charakteristischen Protein-Fingerprints mittels MALDI-TOF-MS ermittelt. In der Tabelle 4-11 ist die Anzahl der Kalibrierdaten der untersuchten Hefestämme im YED- und YEPD-Medium dargestellt.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 4-11: Anzahl der Kalibrierdaten bzw. -Spektren der untersuchten Hefestämme im YED- und YEPD-Medium

Hefestamm	Anzucht gesamt n ≥ 5	MS-Spektren (Einzelspektren)
2.200	5	109 (109.000)
2.152	5	91 (91.000)
2.129	5	73 (73.000)
2.119	5	111 (111.000)
2.068	5	197 (197.000)
2.045	5	145 (145.000)
ug1	6	96 (96.000)
ug2	6	139 (139.000)
ug3	8	103 (103.000)
ug6	5	105 (105.000)
ug7	5	112 (112.000)
NSF-P1	5	56 (56.000)

Als Beispiel soll hier wieder die untergärige Reinzuchtheife *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 dienen.

In der Abbildung 4-28 ist der Score-Plot PC-1 - PC-2 der untergärigen Reinzuchtheife ug1 dargestellt. Es wurden die Kalibrierdaten der exponentiellen Wachstumsphase (12 h dunkelgrün, 16 h blau, 17 h rosa, 19 h rot) sowie der stationären Phase (25 h hellblau) der Hefe ug1 betrachtet.

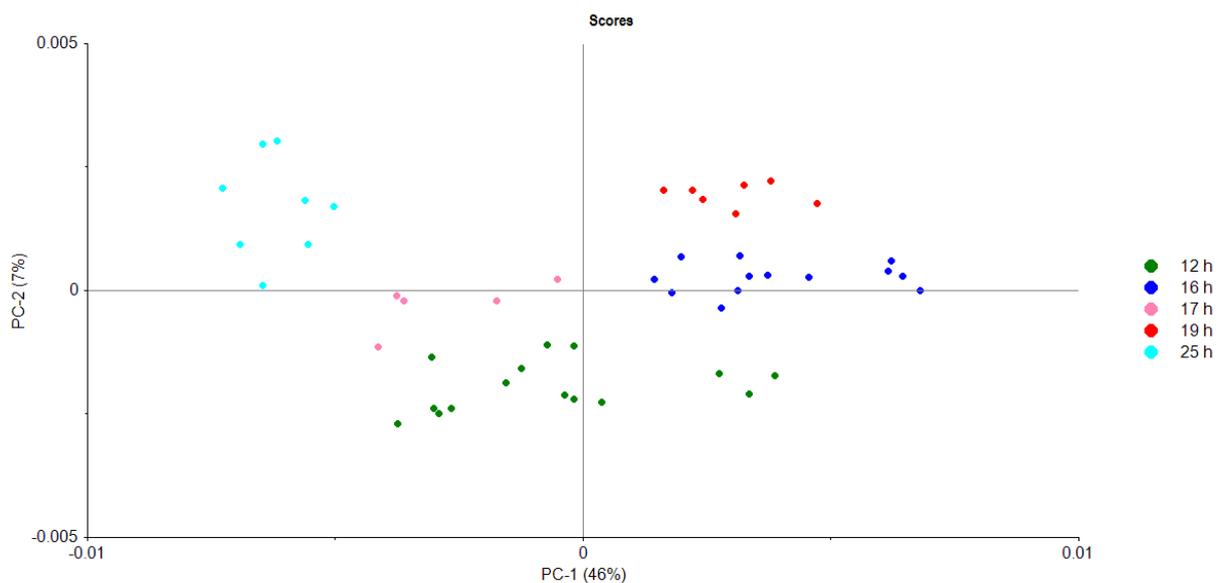


Abbildung 4-28: Score-Plot für PC-1 und PC-2 der untergärigen Reinzuchtheife *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 in YED-Medium gewachsen (HK 12 h - 25 h)

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die verschiedenen Klassen (Hauptkulturen) lassen sich auch hier voneinander differenzieren, aber die einzelnen Datenpunkte innerhalb einer Klasse streuen stark. Bei der Auswertung der Erklärten Varianz für die Kalibrierung (blau) und der Validierung (rot) in der Abbildung 4-29 ist im Gegensatz zur erklärten Varianz der Hefe ug1 im SD-Medium (Abbildung 4-26: Erklärte Varianz der X-Variablen; Kalibrierung (blau), Validierung (rot)) hier mit 10 PCs noch keine vollständige erklärte Varianz der Datenmengen erreicht worden.

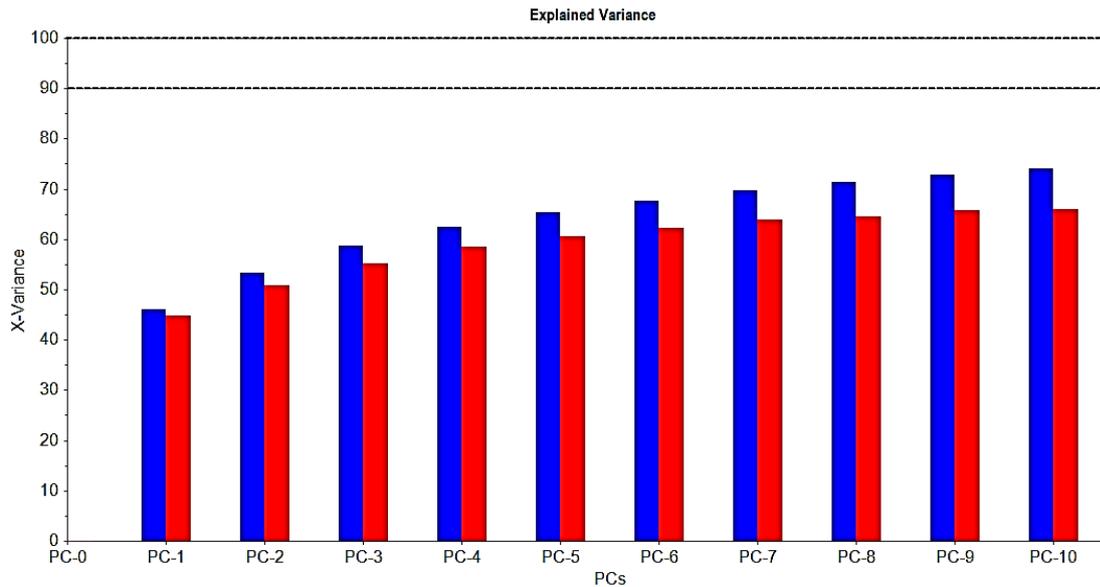


Abbildung 4-29: Erklärte Varianz der X-Variablen; Kalibrierung (blau), Validierung (rot)

Auch die Differenz zwischen Kalibrierung und Validierung ist mit durchschnittlichen 6 % noch zu hoch. Damit ist das Modell nicht valide und muss um weitere Daten ergänzt werden. Trotzdem soll dieses Modell des Hefestammes ug1 im YED-Medium gewachsen zur Differenzierung im SIMCA-Modell hier zunächst verwendet werden. Für die 12 anderen Hefestämme sind die Score-Plots der YED- und YEPD-Medien im Anhang 7.6 dargestellt.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Tabelle 4-12 sind die Ergebnisse der Hauptkomponenten für die Medien YED und YEPD aufgelistet.

Tabelle 4-12: Anzahl an PCs der untersuchten Hefestämme im YED- bzw. YEPD-Medium

Hefestamm	PCs	Erklärte Varianz [%]
2.200	20	83
2.152	20	82
2.129	20	86
2.119	20	78
2.068	20	80
2.045	20	80
ug1	20	75
ug2	20	88
ug3	20	75
ug6	20	88
ug7	20	91
NSF-P1	20	80

Fazit:

Ziel war es, mit Hilfe der PCA herauszufinden, ob anhand der gemessenen MS-Daten der Protein-Fingerprints der 13 Hefestämme eine Differenzierung der verschiedenen Wachstumsstadien innerhalb eines Hefestammes möglich ist.

Die Hauptkomponentenanalyse erlaubt eine unabhängige Analyse der jeweiligen MS-Datensätze. Nach der Entfernung von Ausreißern sowie der Datensätze Latenz-, und letale Phase ist eine Differenzierung der Wachstumsstadien innerhalb der Hefestämme möglich. Somit sind die entwickelten Proteinextraktionsmethoden (Kapitel 4.1.2), die optimierte Targetpräparation (Kapitel 4.1.1) sowie die MALDI-TOF-MS Einstellungen (Kapitel 4.1) für diese Art der Differenzierung geeignet.

Ein weiteres Ziel war es, die Trennung der unterschiedlichen Hefestämme voneinander zu erreichen. Mit Hilfe der überwachten chemometrischen Verfahren wie der SIMCA-Methode soll dies ermöglicht werden.

4.3 SIMCA - soft independent modelling of class analogy

Für eine Klassifizierung nach der SIMCA-Methode wird ein PCA-Modell von jedem Hefestamm benötigt. Diese Modelle müssen den jeweiligen Hefestamm beschreiben können (Kalibrierdatensatz). Von den Hefestämmen wurden zu unterschiedlichen Wachstumsphasen charakteristische Protein-Fingerprints beziehungsweise MS-Daten ermittelt und eine PCA durchgeführt. Nachdem für jedes PCA-Modell die optimale Anzahl an PCs ermittelt, Ausreiser entfernt und eine Kreuzvalidierung durchgeführt wurde, enthält jedes Modell einen charakteristischen Datensatz für jeden Hefestamm. Die Kernidee besteht darin, jeden Hefestamm durch ein geeignetes Hauptkomponentenmodell zu beschreiben und eine unbekannte Probe in die Gruppe einzuordnen, deren Modell sie am nächsten kommt [163].

Die Zuordnung zu den entsprechenden Hefestämmen wird auf Grundlage des Probe-zu-Modell-Abstandes vorgenommen. Für jede Probe werden alle Variablen, entsprechend dem Hauptkomponentenmodell, neu berechnet und mit dem aktuellen Wert verglichen. Der Probe-zu-Modell-Abstand ist ein Maß dafür, wie weit die unbekannte Probe von den modellierten Hefeklassen entfernt ist.

In der Tabelle 4-13 sind die Anzahl der Kalibrierdatensätze im SD-Medium sowie YEPD- oder YED-Medium aufgelistet. Für jeden Hefestamm wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und die optimale Anzahl an PCs für das jeweils erstellte Modell festgelegt.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 4-13: Anzahl an Kalibrierspektren der verschiedenen Hefearten *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens*

Gattung	Art	Stämme	Kalibrierspektren	
			SD-Medium	YED- bzw. YEPD-Medium
		2.200	306 (306.000)	109 (109.000)
		2.152	189 (189.000)	91 (91.000)
		2.129	240 (240.000)	73 (73.000)
		2.119	261 (261.000)	111 (111.000)
		2.068	193 (193.000)	197 (197.000)
		2.045	240 (240.000)	145 (145.000)
S.	<i>cerevisiae</i>	6 Stämme	1429	726
		ug1	333 (333.000)	96 (96.000)
		ug2	340 (340.000)	139 (139.000)
		ug3	309 (309.000)	103 (103.000)
		ug6	240 (240.000)	105 (105.000)
		ug7	225 (225.000)	112 (112.000)
S.	<i>pastorianus</i>	5 Stämme	1447	555
		SF-d1	116 (116.000)	-
S.	<i>diastaticus</i>	1 Stamm	116	-
		12 Stämme	2992	1281
<i>Pichia</i>	<i>membranifaciens</i>	NSF-P1	110 (110.000)	56 (56.000)
		1 Stamm	110	56

Für die Entwicklung der SIMCA-Modelle wurden für die drei Hefearten *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* und *S. diastaticus* insgesamt 2992 Kalibrierspektren für die Versuche im SD-Medium und 1281 Kalibrierspektren für die Medien YEPD und YED ausgewertet. Für die Gattung *Pichia membranifaciens* wurden insgesamt 166 Kalibrierspektren für die Etablierung genutzt. Von diesen Spektren wurden wie oben (Kapitel 4.2.1) beschrieben die Daten der Latenz- und Letalphase aus den Kalibriermodellen entfernt. So verblieben zur Modellbildung 2066 Summenspektren für das SD-Medium und 1165 Summenspektren für die YEPD- und YED-Medien. Diese Kalibrierspektren wurden einer Basislinienkorrektur, Glättung, Flächennormierung und einem Ausreißertest unterzogen. So wurden für das SD-Medium weitere 792 Summenspektren (38 %) aussortiert und mit 1274 Summenspektren Hefestamm spezifische PCA-Modelle erstellt. Für die YEPD- und YED-Medien wurden 100 Summenspektren (8,6 %)

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

aussortiert und mit 1065 Summenspektren spezifische PCA-Modelle erstellt. Die detaillierte Aufstellung der Daten ist in der Tabelle 4-14 aufgelistet.

Tabelle 4-14: Anzahl der verwendeten Kalibrierspektren (Summenspektren)

Gattung	Art	Hefestämme	Kalibrierspektren	
			SD-Medium	YED- bzw. YEPD-Medium
S.	<i>cerevisiae</i>	2.200	44	87
		2.152	111	80
		2.129	135	73
		2.119	124	111
		2.068	117	166
		2.045	155	119
S.	<i>pastorianus</i>	ug1	126	96
		ug2	53	112
		ug3	54	58
		ug6	66	54
		ug7	139	70
S.	<i>diastaticus</i>	SF-d1	81	-
<i>Pichia</i>	<i>membranefaciens</i>	NSF-P1	69	39

In der Tabelle 4-14 ist zu sehen, dass eine unterschiedliche Anzahl an Kalibrierspektren für die unterschiedlichen Hefestämme vorlag. Hier wurde versucht, kein Übergewicht einzelner Hefestämme im Modell zu erzeugen und möglichst alle Versuchsdaten für die Modellbildung zu nutzen.

Basierend auf den erstellten PCA-Modellen (Kalibrierdaten) der verschiedenen Hefestämme wurden im nächsten Schritt Testdatensätze den Modellen zugeordnet. Dafür wurden alle PCA-Modelle in einer Datei zusammengeführt und deren Name sowie die optimale Anzahl der verwendeten PCs gespeichert.

4.4 Etablierung und Validierung

4.4.1 Zuordnung von Testdaten zum SIMCA-Modell

Für die Etablierung der SIMCA-Methode wurden MS-Spektren verwendet, die ihren Ursprung aus denselben Datensätzen haben, die auch zur Modellbildung genutzt wurden. Mit ihnen soll geprüft werden, in wie fern die Testspektren den entsprechenden Hefestamm-Modellen zugeordnet werden können. Die Testdaten wurden nicht zur Modellbildung genutzt. Insgesamt wurden 1003 Testspektren verwendet.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Hier soll wieder am Beispiel der untergärigen Reinzuchtheife *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) ug1 die SIMCA-Klassifizierung veranschaulicht werden. Es wurden 30 unabhängige Testdaten von dem Hefestamm ug1 verwendet. Für eine erste einfache und anschauliche Beurteilung der Zuordnung kann der Cooman's Plot herangezogen werden.

Coomans' Plot

In diesem Plot werden die orthogonalen Distanzen der Testdaten von dem Hefestamm ug1 zu jeweils einem der 23 Kalibrier-Modelle der verschiedenen Hefestämme dargestellt. In der Abbildung 4-30 sind die orthogonalen Distanzen der Testdaten von ug1 (grün) gewachsen im YED-Medium zu den Kalibrier-Modellen der Hefestämme 2.068 (rot) und ug1 (blau) gewachsen im YED beziehungsweise YEPD-Medium dargestellt.

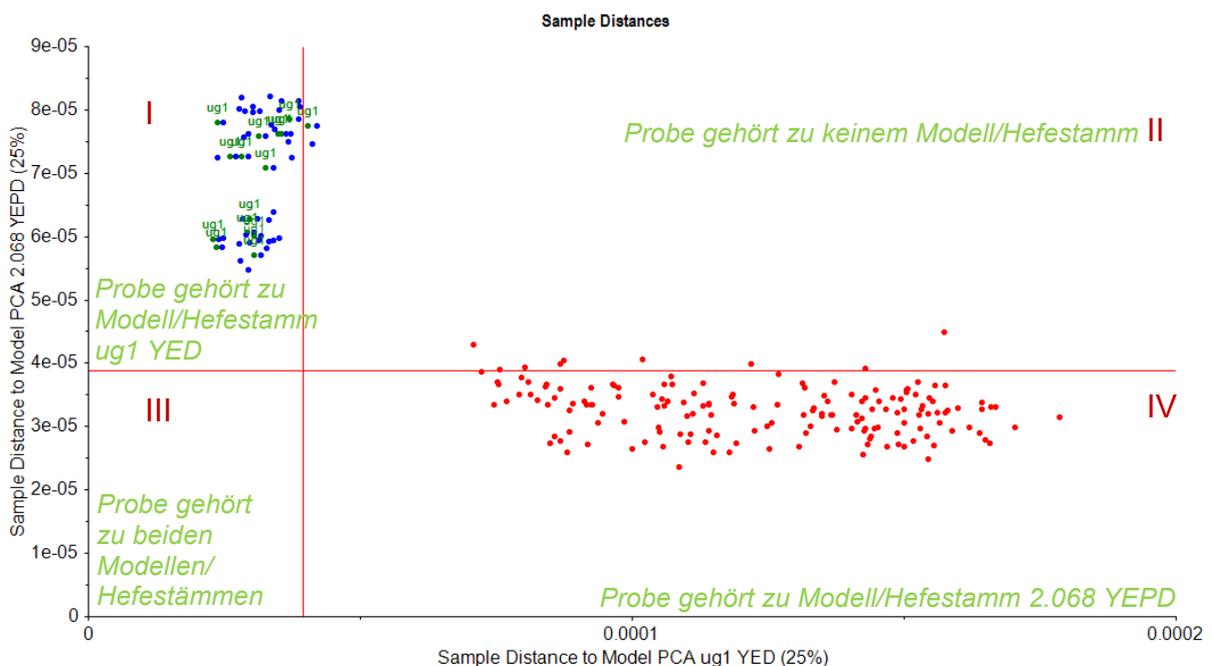


Abbildung 4-30: Coomans' Plot: Zuordnung der Testdaten des Brauhefestammes ug1 (grün) zu den Kalibrier-Modellen 2.068 (rot) und ug1 (blau)

Der Plot besteht aus den vier Quadranten I, II, III und IV die durch die roten Zugehrigkeitsgrenzen „membership limits“ gebildet werden. Diese „membership limits“ sind von dem gewählten Signifikanzniveau abhängig. Auf der x- beziehungsweise y-Achse sind die Distanzen, hier 25 % zu den jeweils zwei ausgewählten Kalibrier-Modellen ug1 YED und 2.068 YEPD abzulesen. Im I. Quadranten befinden sich die

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Kalibrierdaten von ug1 (blau) und im IV. Quadranten die Kalibrierdaten von 2.068 (rot). Die beiden Kalibrier-Modelle liegen gut voneinander getrennt vor. Somit stellt der Cooman's Plot den Probe-zu-Modell-Abstand für die Kalibrier-Modelle ug1 YED (blau), 2.068 YEPD (rot) und den Testdaten von ug1 YED (grün) dar. Befinden sich die Testdaten von ug1 (grün) innerhalb des I. Quadranten oder IV. Quadranten, können sie eindeutig einem Kalibrier-Modell zugeordnet werden. Im III. Quadranten wären sie beiden Modellen zuzuordnen und im Bereich des II. Quadranten wären sie keinem der beiden Modellen zugeordnet. Der grüne Testdatensatz von ug1 YED, welcher sich innerhalb der Zugehörigkeitsgrenzen eines Kalibrier-Modells befindet, kann dem Hefestamm ug1 YED (blau) eindeutig zugeordnet werden. In der nächsten Abbildung 4-31 wurden die Testdaten von *S. pastorianus* ug1 YED (grün) zu den zwei Kalibrier-Modellen der obergärigen Hefestämme der *S. cerevisiae* 2.068 (rot) und 2.152 (blau) gewachsen in YEPD-Medium zugeordnet.

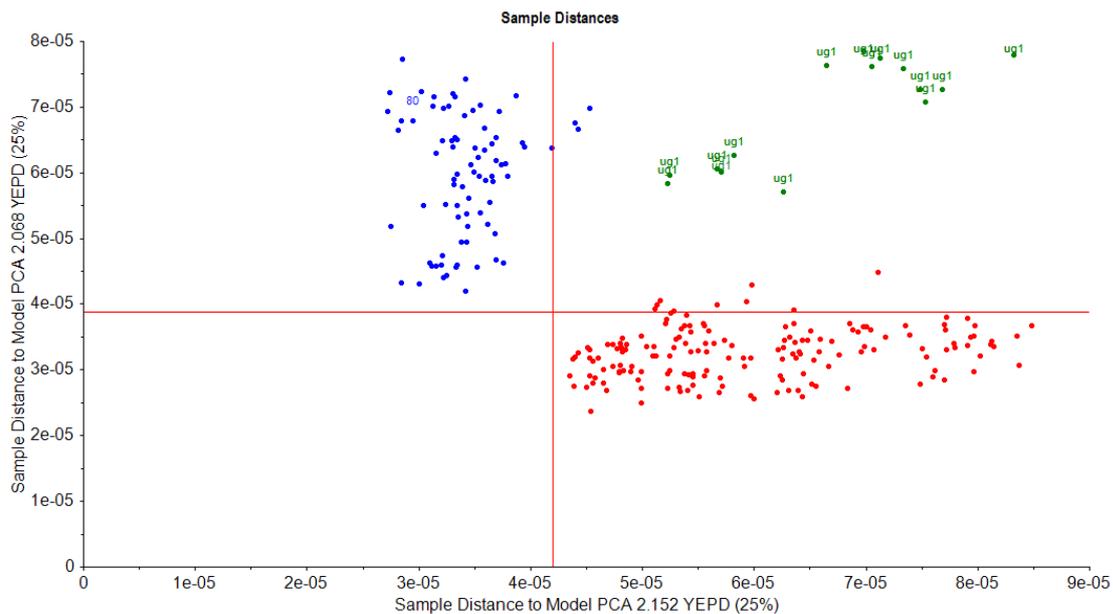


Abbildung 4-31: Coomans`Plot: Zuordnung der Testdaten des Brauhefestammes ug1 (grün) zu den Kalibrier-Modellen 2.068 (rot) und 2.152 (blau)

Im Gegensatz zu dem ersten Coomans`Plot (Abbildung 4-30) liegen die Testdaten von ug1 im II. Quadranten und können somit keinem der beiden Kalibrier-Modelle von 2.068 YEPD (rot) oder 2.152 YEPD (blau) zugeordnet werden. Die beiden Kalibrier-Modelle liegen eindeutig voneinander getrennt vor. Der Coomans`Plot bietet hier eine erste gute Möglichkeit die Zuordnung von Testdaten grafisch darzustellen.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Modellabstand

Grundsätzlich muss der Modellabstand zu den jeweiligen Kalibriermodellen groß genug sein, um eine gute Trennung der verschiedenen Hefestämme gewährleisten zu können. Der Modellabstand jedes Modells zu sich selbst beträgt eins [164]. Ab einem Modellabstand von größer drei kann von einer Trennung gesprochen werden. In der Abbildung 4-32 ist der Modellabstand des Kalibriermodells der Nicht-*Saccharomyces*-Fremdhefe NSF-P1 gegen sich selbst und den restlichen Kalibriermodellen der unterschiedlichen Hefestämme dargestellt.

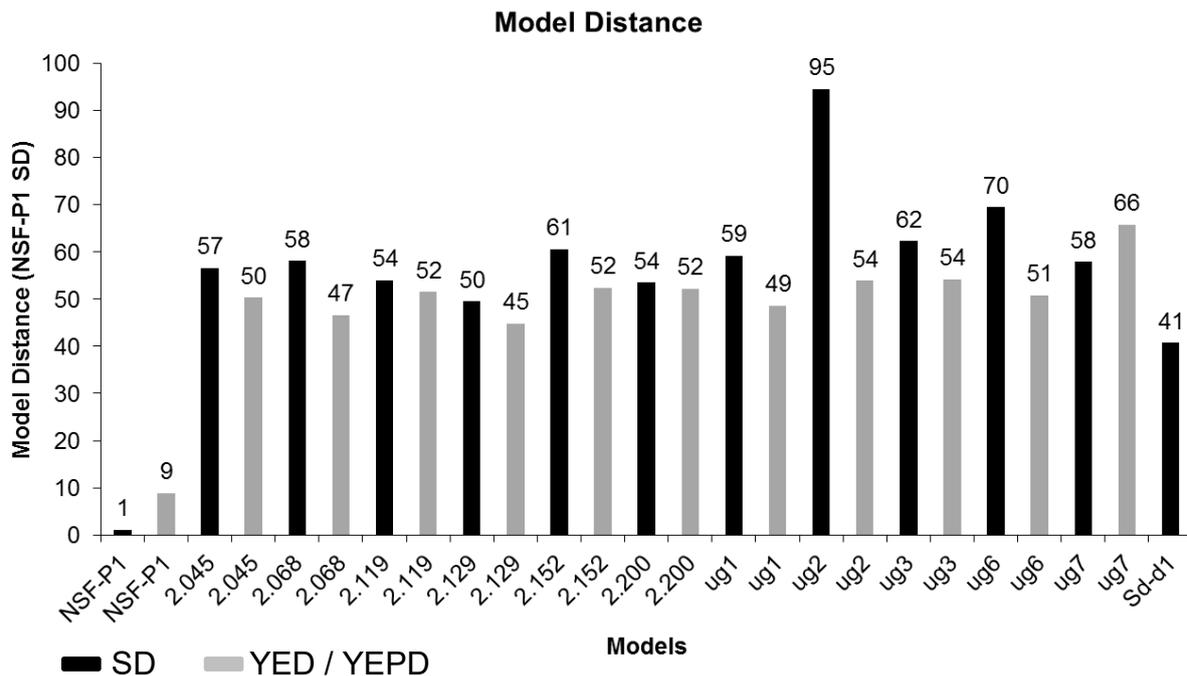


Abbildung 4-32: Modellabstand des Kalibriermodells der Nicht-*Saccharomyces*-Fremdhefe NSF-P1 gegen sich selbst und den Kalibriermodellen der unterschiedlichen Hefestämme, gewachsen im SD-Medium (schwarz) oder YED- bzw. YEPD-Medium (grau)

Der Modellabstand von NSF-P1 gewachsen im SD-Medium zu sich selbst NSF-P1 (schwarz) beträgt eins. Der Abstand zu dem NSF-P1 Modell gewachsen im YED-Medium (grau) beträgt 9. Hier ist bereits zu sehen, dass es auch innerhalb eines Stammes zu unterschiedlichen Modellen und Modellabständen kommt. Hier ist der Einfluss der unterschiedlichen Medien und der Wachstumsbedingungen einflussgebend. Auch Moothoo-Padayachie et al. (2013) zeigten in ihren Arbeiten, dass die Kultivierung von Hefen in unterschiedlichen Labornährmedien zu einer Veränderung der Massenspektren führen kann [133].

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Abstände zu den anderen 23 Kalibriermodellen ist größer 40. Damit ist eine deutliche Trennung der Nicht-*Saccharomyces*-Fremdhefe NSF-P1 von den obergärigen- und untergärigen Brau- und Backhefen möglich.

Zuordnung der Testdaten zu den S. cerevisiae Hefestämmen (SD-Medium)

Für die Etablierung der sechs obergärigen *S. cerevisiae* Hefestämme gewachsen im SD-Medium wurden 287 Testspektren verwendet (siehe Tabelle 4-15). In der Abbildung 4-33 ist die prozentuale Verteilung der „Richtigen Zuordnung“ (schwarz), „Falsche Zuordnung“ (hellgrau) und „Keine Zuordnung“ (dunkelgrau) des jeweiligen Hefestammes dargestellt.

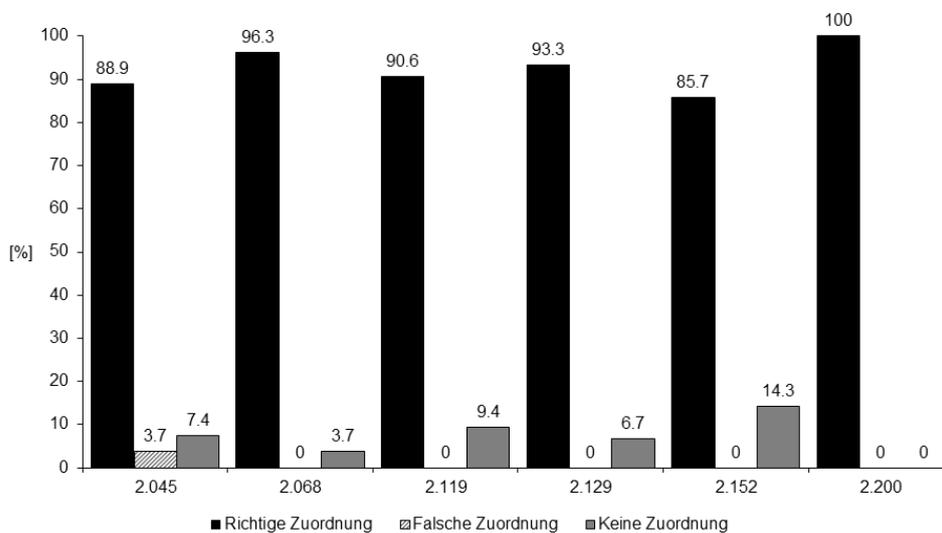


Abbildung 4-33: Ergebnisse der Etablierung der sechs *S. cerevisiae* Stämme gewachsen im SD-Medium

Für den Hefestamm 2.045 konnten von den 54 Testspektren 88,9 % richtig zugeordnet werden. 7,4 % der Spektren konnten keinem Kalibriermodell zugeordnet werden und 3,7 % der Spektren wurden falsch-positiv dem Hefestamm 2.129 zugeordnet. Für die anderen fünf Hefestämme 2.068 bis 2.200 konnten keine falsch-positiven Zuordnungen festgestellt werden. Jedoch konnten einige der Testdaten von 2.068, 2.119, 2.129 und 2.152 nicht zugeordnet werden. Lediglich die Testdaten von 2.200 wurden zu 100 % korrekt dem Hefestamm zugeordnet.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ergebnisse der Zuordnung von S. pastorianus (SD-Medium)

Wie für die sechs obergärigen *S. cerevisiae* Stämme wurden die Testdaten von den fünf *S. pastorianus* Stämmen (Abbildung 4-34) den Kalibriermodellen zugeordnet.

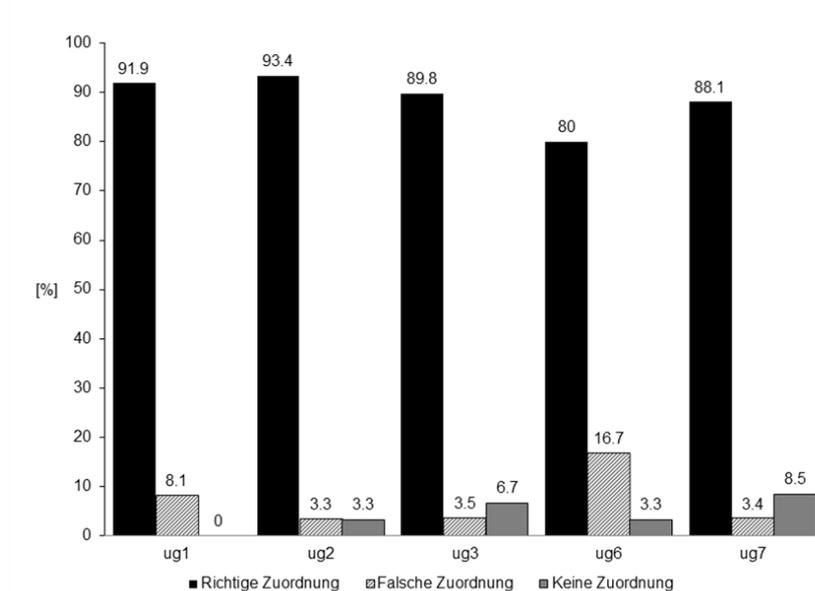


Abbildung 4-34: Ergebnisse der Etablierung der fünf *S. pastorianus* Stämme gewachsen im SD-Medium

Im Durchschnitt wurden 88,6 % der Testdaten von den *S. pastorianus* Stämmen richtig zugeordnet. Die richtige Zuordnung der Hefestämme ug1 und ug2 lag bei über 90 %. Bei allen analysierten *S. pastorianus* Stämmen wurden Testdaten falsch einem anderen *S. pastorianus* Stamm zugeordnet. Ein Teil der Testdaten konnte keinem der fünf Hefestamm-Modelle zugeordnet werden.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ergebnisse der Zuordnung von SF-d1 und NSF-P1 (SD-Medium)

In der Abbildung 4-35 ist die prozentuale Zuordnung der Testdaten von SF-d1 und NSF-P1 dargestellt.

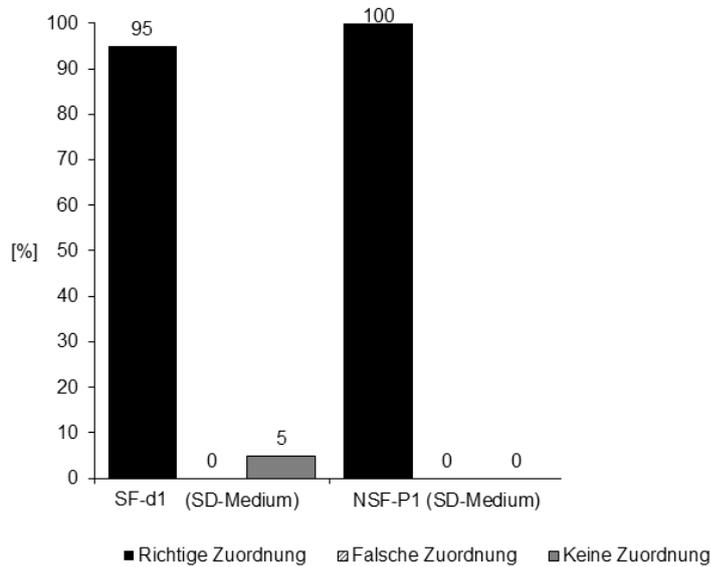


Abbildung 4-35: Ergebnisse der Etablierung von *S. diastaticus* SF-d1 und Nicht-S.-Fremdhefe NSF-P1 gewachsen im SD-Medium

Eine wichtige Herausforderung war es, die Fremdhefen *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* eindeutig von den Produktionshefen zu differenzieren. Die *Pichia membranifaciens* Testdaten konnten zu 100 % richtig zugeordnet werden. Die Testdaten von der *S. diastaticus* wurden zu 95 % richtig zugeordnet. 5 % der *S. diastaticus* Daten konnten keinem der Kalibriermodelle zugeordnet werden. Hier zeigt sich bereits, dass eine deutliche Differenzierung beziehungsweise korrekte Zuordnung zwischen Fremdhefen und Produktionshefen möglich ist.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Tabelle 4-15 ist eine Gesamtübersicht über die Anzahl der Testspektren und deren Zuordnung zu den verschiedenen Hefestämmen aufgelistet.

Tabelle 4-15: Anzahl der Testspektren und deren Zuordnung zu den verschiedenen Hefestamm-Modellen (SD-Medium)

Gattung	Art	Stämme	Anzahl an Testspektren	Richtige Zuordnung [%]	Falsche Zuordnung [%]	Keine Zuordnung [%]
		2.200	24	100	0	0
		2.152	42	85,7	0	14,3
		2.129	60	93,3	0	6,7
		2.119	53	90,6	0	9,4
		2.068	54	96,3	0	3,7
		2.045	54	88,9	3,7	7,4
S.	<i>cerevisiae</i>	6 Stämme	287			
		ug1	37	91,9	8,1	0
		ug2	30	93,4	3,3	3,3
		ug3	29	89,8	3,5	6,7
		ug6	30	80,0	16,7	3,3
		ug7	59	88,1	3,4	8,5
S.	<i>pastorianus</i>	5 Stämme	185			
		SF-d1	40	95,0	0	5,0
S.	<i>diastaticus</i>	1 Stamm	40			
		12 Stämme	512			
<i>Pichia</i>	<i>membranefaciens</i>	NSF-P1	68	100	0	0
		1 Stamm	68			

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ergebnisse der Zuordnung von S. cerevisiae (YEPD-Medium)

Die Testdaten der *S. cerevisiae* Stämme gewachsen im YEPD-Medium wurden wie oben beschrieben ebenfalls den entsprechenden Kalibriermodellen zugeordnet. Wie in Abbildung 4-36 dargestellt werden weniger Testdaten richtig zugeordnet und falsch-positive Zuordnungen nehmen zu.

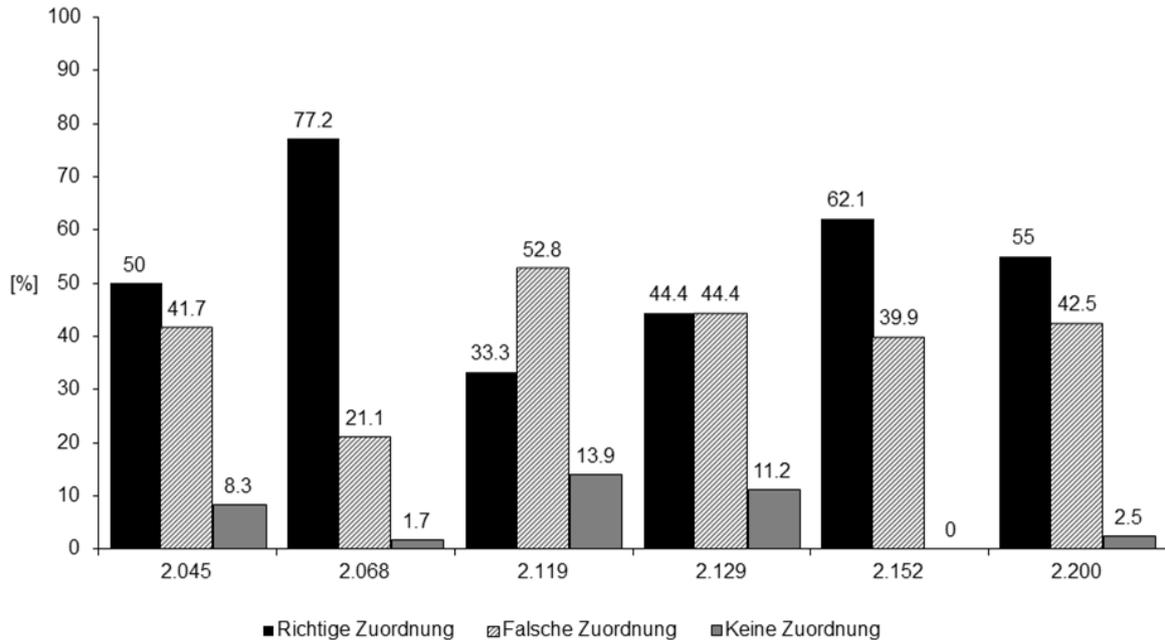


Abbildung 4-36: Ergebnisse der Etablierung der sechs *S. cerevisiae* Stämme gewachsen im YEPD-Medium

Mögliche Ursachen für diese schlechten Differenzierungsansätze können zum einem in der statistisch gesehen geringeren Probenanzahl liegen, mit der das jeweilige Kalibriermodell erstellt wurde. So kann die phänotypische Varianz dieser Stämme nicht charakteristisch abgebildet werden und eine Differenzierung wird erschwert. Zum anderen haben die unterschiedlichen Kulturmedien Einfluss auf die gemessenen spektralen Fingerprints der Hefestämme. Die detektierten Signale in dem YEPD-Medium sind in ihrer Ausprägung nicht divergent genug, um eine Differenzierung der unterschiedlichen *S. cerevisiae* Stämme zu erreichen.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ergebnisse der Zuordnung von S. pastorianus (YED-Medium)

Die Ergebnisse für die fünf *S. pastorianus* Stämme gewachsen im YED-Medium sind in der Abbildung 4-37 dargestellt.

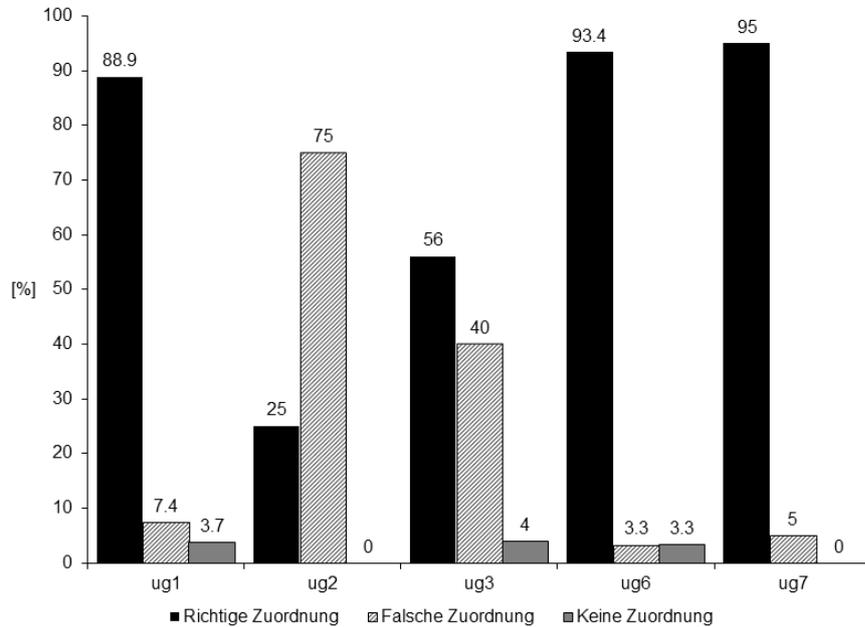


Abbildung 4-37: Ergebnisse der Etablierung der fünf *S. pastorianus* Stämme gewachsen im YED-Medium

Die Testdaten der beiden Stämme ug6 und ug7 konnten zu über 90 % richtig zugeordnet werden. Bei falsch-positiver Zuordnung wurden jeweils die Daten von ug6 falsch zu ug7 zugeordnet und umgekehrt. Diese beiden untergärigen Hefestämme sind beides Staubhefen und in ihrem Wachstumsverhalten sehr ähnlich.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ergebnisse der Zuordnung von SF-d1 und NSF-P1 (YED-Medium)

Die Testdaten von NSF-P1 gewachsen im YED-Medium konnten zu 96 % richtig zugeordnet werden. Es wurden keine Daten falsch-positiv zugeordnet. Die Fremdhefe *Pichia membranifaciens* konnte eindeutig von den Kulturhefen differenziert werden.

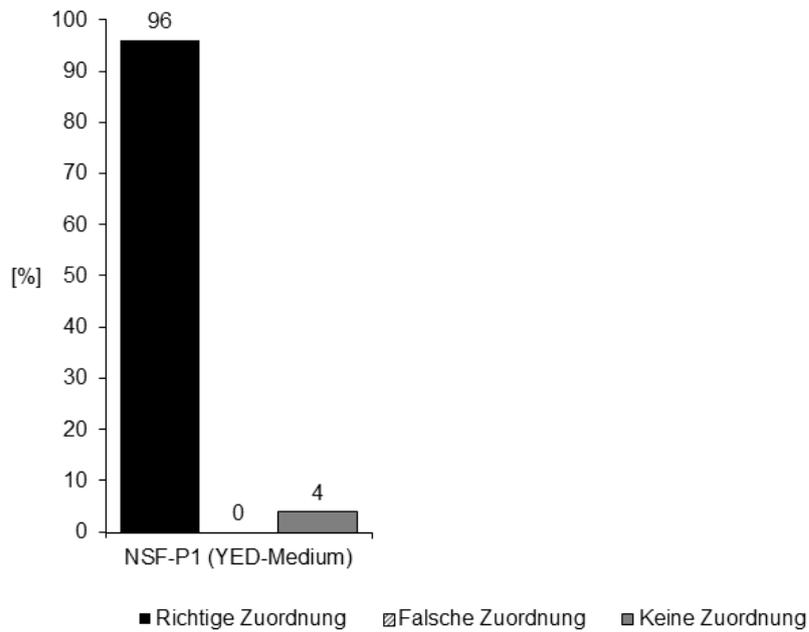


Abbildung 4-38: Ergebnisse der Etablierung von der Nicht-S.-Fremdhefe NSF-P1 gewachsen im YED-Medium

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Tabelle 4-16 ist die Ergebniszusammenfassung der 12 unterschiedlichen Hefestämme gewachsen im YED oder YEPD-Medium dargestellt.

Tabelle 4-16: Anzahl der Testspektren und deren Zuordnung zu den verschiedenen Hefestamm-Modellen (YED/YEPD-Medium)

Gattung	Art	Stämme	Anzahl an Testspektren	Richtige Zuordnung [%]	Falsche Zuordnung [%]	Keine Zuordnung [%]
		2.200	40	55	42,5	2,5
		2.152	29	62,1	39,9	0
		2.129	27	44,4	44,4	11,2
		2.119	36	33,3	52,8	13,9
		2.068	57	77,2	21,1	1,7
		2.045	36	50	41,7	8,3
S.	<i>cerevisiae</i>	6 Stämme	225			
		ug1	54	88,9	7,4	3,7
		ug2	24	25,0	75,0	0
		ug3	25	56,0	40,0	4,0
		ug6	30	93,4	3,3	3,3
		ug7	40	95,0	5,0	0
S.	<i>pastorianus</i>	5 Stämme	173			
		Sd-d1				
S.	<i>diastaticus</i>	1 Stamm				
		11 Stämme	398			
<i>Pichia</i>	<i>membranefaciens</i>	NSF-P1	25	96,0	0	4,0
		1 Stamm	25			

Fazit:

Bei der Differenzierung der unterschiedlichen Hefestämme zeigte sich, dass die obergärigen *S. cerevisiae* und untergärigen *S. pastorianus* Stämme sich unterscheiden lassen, wenn die Hefen im SD-Medium gewachsen sind. Durchschnittlich konnten 91 % der Testdaten richtig zugeordnet werden. 4 % der Daten wurden falsch und 5 % der Testspektren konnten keinem der 11 Hefestamm-Modelle zugeordnet werden. Die Differenzierung der Hefearten gewachsen in den Vollmedien YED und YEPD wiesen dagegen unterschiedliche Ergebnisse auf. Die *S. cerevisiae* Stämme gewachsen im YEPD-Medium zeigten schlechte Differenzierungsansätze. Durchschnittlich konnten nur 54 % der Testdaten richtig zugeordnet werden. 40 % der Daten wurden falsch-positiv einem der sechs *S. cerevisiae* Stämme zugeordnet. Für die *S. pastorianus* Stämme zeigte sich im Vergleich zu den *S. cerevisiae* Stämmen eine bessere Trennung auf der

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Stammebene. Die drei untergärigen Stämme ug1, ug6 und ug7 ließen sich im Vergleich zu ug2 und ug3 bis zu 95 % richtig zuordnen. Die beiden untergärigen Hefearten ug2 und ug3 ließen sich schlechter differenzieren. Die Fremdhefe NSF-P1 gewachsen im YED-Medium konnte zu 96 % richtig zugeordnet werden und ließ sich somit genauso gut differenzieren wie im SD-Medium.

Zuordnung auf Art-Ebene

Bei der Zuordnung der Testdaten auf Stammebene wurde ein Teil der Testspektren falsch beziehungsweise konnten keinem Hefestamm zugeordnet werden. Daher wurde in einem weiteren Schritt jeweils ein Modell für die vier Hefearten *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* erstellt. Das heißt, die sechs *S. cerevisiae* Hefestämme 2.200, 2.152, 2.129, 2.119, 2.068 und 2.045 wurden nicht mehr einzeln für sich betrachtet sondern als Gruppe der Art *S. cerevisiae*. Gegenübergestellt wurde das Modell der Art *S. pastorianus* mit den Stämmen ug1, ug2, ug3, ug6 und ug 7 sowie die beiden Modelle *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens*. Findet diese Differenzierung auf der übergeordneten Art-Ebene statt kann mit Hilfe der SIMCA-Klassifizierung eine deutlichere Zuordnung der Hefearten *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* bis zu durchschnittlich 98 % erreicht werden (Abbildung 4-39). Dabei zeigt sich, dass das eingesetzte Medium SD, YED oder YEPD keinerlei Einfluss auf die korrekte Zuordnung zur jeweiligen Hefeart bewirkt.

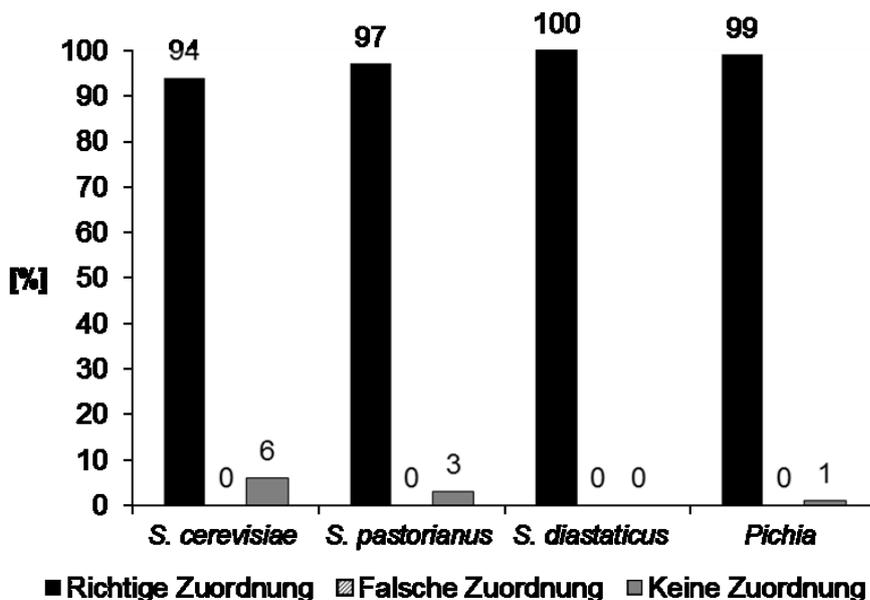


Abbildung 4-39: Zuordnung der Testspektren auf Art-Ebene zu den Hefearten *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* gewachsen im SD-, YED- oder YEPD-Medium

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.4.2 Validierung

Für die Bewertung der erstellten Modelle muss mit unabhängigen Spektrendatensätzen, bekannter Hefestämme, eine Validierung des Systems durchgeführt werden. Für die interne Kreuzvalidierung wurden insgesamt 494 unabhängige Spektren verwendet (Tabelle 4-17). Diese Daten wurden weder für die Erstellung der Kalibriermodelle noch für die Etablierung der Modelle genutzt. Sie sind in unabhängigen Hefeanzuchten und Messungen generiert worden.

Tabelle 4-17: Ergebniszusammenfassung der Validierung

Gattung	Art	Stämme	Anzahl Validierungs-spektren		Richtige Zuordnung [%]		Falsche Zuordnung [%]		Keine Zuordnung [%]	
			SD	YED/ YEPD	SD	YED/ YEPD	SD	YED/ YEPD	SD	YED/ YEPD
		2.200	13	22	92,3	45,6	0	54,4	7,7	0
		2.152	24	20	54,2	30	20,8	70	25	0
		2.129	26	16	80,8	37,5	0	56,3	19,2	6,3
		2.119	27	24	63	8,4	0	83,3	37	8,3
		2.068	23	35	95,7	60	4,3	40	0	0
		2.045	24	20	83,3	35	0	60	16,7	5
S.	<i>cerevisiae</i>	6 Stämme	137	137						
		ug1	27	20	66,7	100	22,2	0	11,1	0
		ug2	14	22	78,6	59,1	7,1	40,9	14,3	0
		ug3	10	15	100	60	0	40	0	0
		ug6	16	12	62,5	85,4	37,5	8,3	0	8,3
		ug7	28	15	92,9	76,7	7,1	33,3	0	0
S.	<i>pastorianus</i>	5 Stämme	95	84						
		SF-d1	16		100		0		0	
S.	<i>diastaticus</i>	1 Stamm	16							
		12 Stämme	248	221						
<i>Pichia</i>	<i>membrane-faciens</i>	NSF-P1	13	12	87	91,7	0	0	23	8,3
		1 Stamm	13	12						

Bei der Validierung zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie bei der Unterscheidung der Testdaten für die Etablierung. Die Ergebnisse der Validierung sind in der Tabelle 4-17 zusammengefasst. Auf der Stammebene konnten die Spektren der Fremdhefen *S. diastaticus*, *Pichia membranifaciens*, *S. cerevisiae* und *S. pastorianus* in gleich hoher

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Quote wie bei der Etablierung zugeordnet werden (siehe Tabelle 4-15 bis 4-16 und Abbildungen 4-33 bis 4-39).

In den Abbildungen 4-40 und 4-41 ist die prozentuale Zuordnung der obergärigen Backhefestämme 2.200 bis 2.045 gewachsen im SD- oder YEPD-Medium dargestellt.

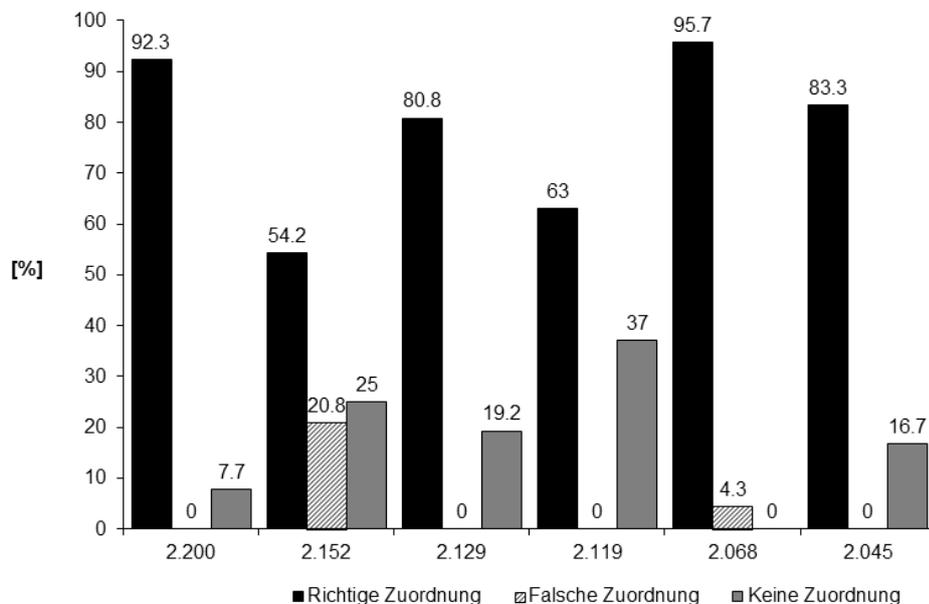


Abbildung 4-40: Ergebnisse der Zuordnung der Validierungsdaten der sechs *S. cerevisiae* Stämme gewachsen im SD-Medium

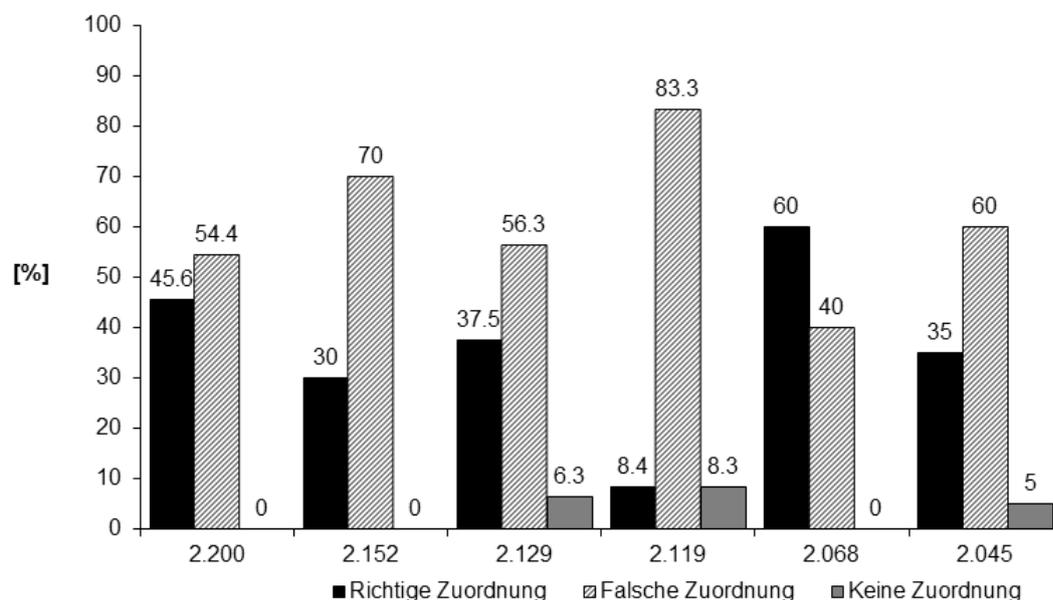


Abbildung 4-41: Ergebnisse der Zuordnung der Validierungsdaten der sechs *S. cerevisiae* Stämme gewachsen im YEPD-Medium

Mit Hilfe der Grafiken ist erkennbar, dass eine richtige Zuordnung der Hefestämme im SD-Medium besser möglich ist als in dem Vollmedium YEPD.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei einer falschen Zuordnung der Spektren, erfolgte wie bei der Etablierung die Zuordnung zu einem anderen Backhefestamm. Genetisch sind sich diese sechs Stämme ähnlich. Bei der Betrachtung dieser Stämme wurden Protein-Fingerprints mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die Differenzierung auf Proteinebene ist mit dieser Methode derzeit nicht sensitiv und selektiv genug, um eine eindeutige Stammunterscheidung im Vollmedium durchzuführen. Durchschnittlich 50 % der Spektren wurden falsch-positiv auf Stammebene zugeordnet.

Die Auswertung der fünf untergärigen Brauhefen zeigte ein ähnliches Bild wie bei den Backhefestämmen. In der Abbildung 4-42 sind die Zuordnungen der Validierungsspektren im SD-Medium dargestellt und in der Abbildung 4-43 die Zuordnung der Daten gewonnen aus den YED-Anzuchten.

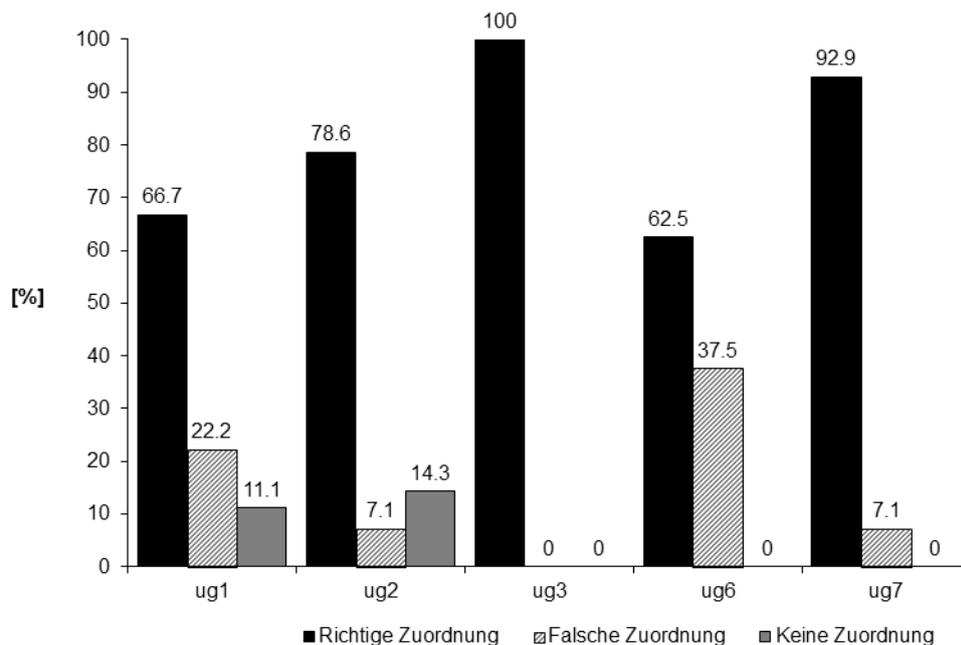


Abbildung 4-42: Ergebnisse der Zuordnung der Validierungsdaten der fünf *S. pastorianus* Stämme gewachsen im SD-Medium

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

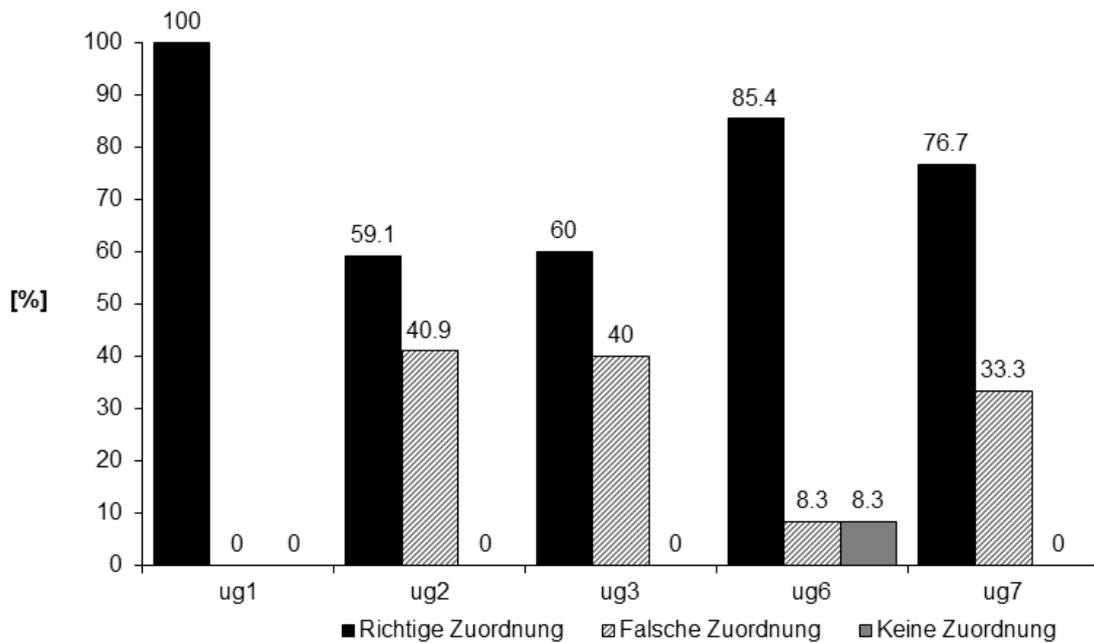


Abbildung 4-43: Ergebnisse der Zuordnung der Validierungsdaten der fünf *S. pastorianus* Stämme gewachsen im YED-Medium

Die richtige Zuordnung der Daten aus dem SD-Medium ist hier ebenfalls erfolgreicher als die Zuordnung der Daten aus dem Vollmedium YED. Die beiden Hefestämme ug6 und ug7 bilden innerhalb der fünf *S. pastorianus*-Stämme ein Paar. Wenn eine der beiden Stämme falsch zugeordnet wurde, dann immer zu dem jeweiligen Hefestamm ug6 und ug7.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Fremdhefen *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* lassen sich im Vergleich eindeutig „richtig“ zuordnen. Die Spektren die nicht zugeordnet werden konnten, wurden keinem der Brau- oder Backhefestämme falsch-positiv zugeordnet (Abbildung 4-44).

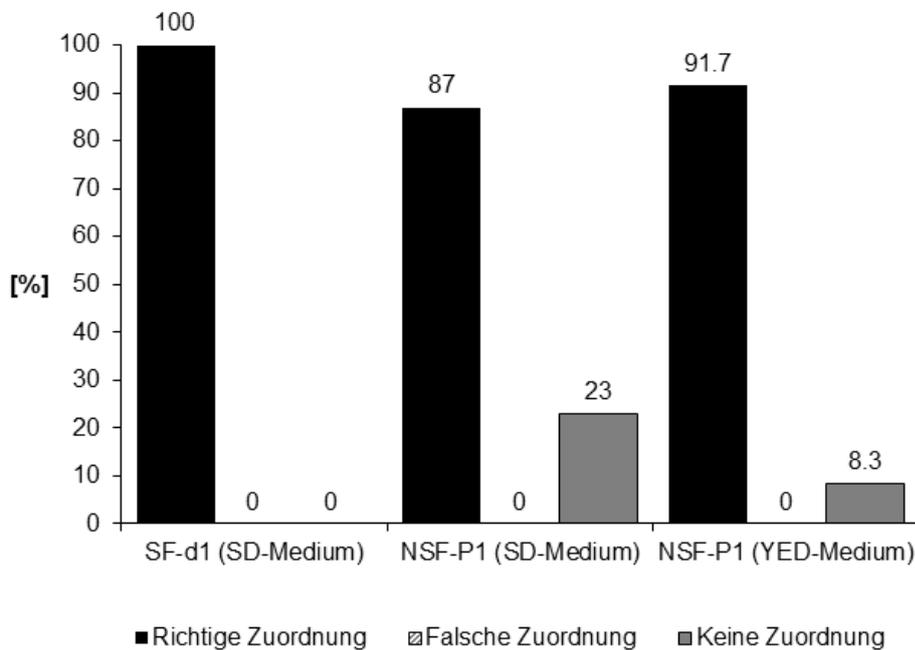


Abbildung 4-44: Ergebnisse der Zuordnung der Validierungsdaten der Stämme *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* gewachsen im SD- und YED-Medium

Auch bei der Auswertung der Validierungsdaten ist die Zuordnung auf der Art-Ebene durchgeführt worden. Die unbekanntes Spektren wurden nicht jedem einzelnen Hefestamm zugeordnet sondern den erstellten Gruppen-Modellen der vier Hefearten *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens*. Die Ergebnisse der Differenzierung beziehungsweise richtigen Zuordnung auf der Art-Ebene zu den entsprechenden vier Hefe-Modellen ist im Vergleich zur Stammebene effektiver.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

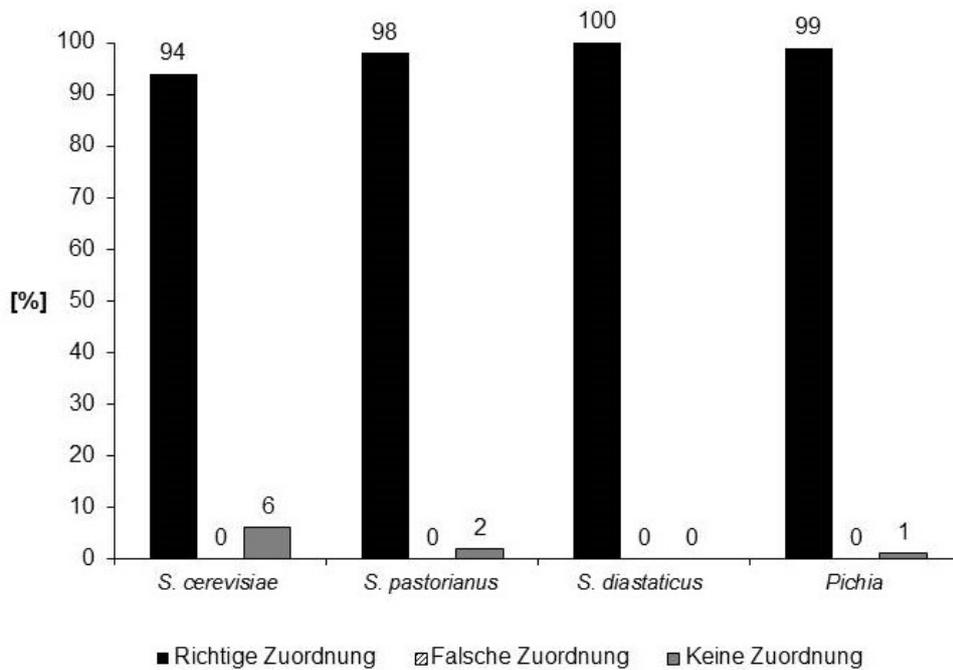


Abbildung 4-45: Zuordnung der Validierungsdaten auf Art-Ebene zu den Hefearten *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* gewachsen im SD-, YED- oder YEPD-Medium

Wie in der Abbildung 4-45 dargestellt, können die Validierungsdaten der sechs Hefestämme *S. cerevisiae* 2.200, 2.152, 2.129, 2.119, 2.068 und 2.045 zu 94 % richtig dem Gruppen-Modell der Art *S. cerevisiae* zugeordnet werden. 6 % der Daten können keinem Modell zugeordnet werden. Die fünf Hefestämme ug1, ug2, ug3, ug6 und ug 7 der Art *S. pastorianus* werden zu 98 % richtig dem Gruppen-Modell zugeordnet. 2 % der Validierungsdaten sind ebenfalls keinem Modell zugeordnet. Für die Fremdhefen *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* können 100 % beziehungsweise 99 % der Spektren richtig zugeordnet werden.

Bei diesem Gruppen-Modell sind keine Validierungsdaten falsch-positiv einem der vier Modelle zugeordnet worden. Durch die Betrachtung der SIMCA-Modelle auf der Art-Ebene kann das Differenzierungspotential somit deutlich erhöht werden.

4.4.3 Referenzanalytik

Wichtig für die erfolgreiche Entwicklung einer MALDI-TOF-MS-Methode zur Differenzierung verschiedener Hefestämme, war die zuverlässige Klassifizierung der eingesetzten Hefeisolate, die mittels molekularbiologischer Methoden durchgeführt wurden.

Amplifikation der ITS- und 5.8S rDNA-Regionen aus Hefe-DNA

Die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Hefearten *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* sollten mit einem standardisierten molekularbiologischen Verfahren als Referenzanalytik zur MALDI-TOF-MS identifiziert und miteinander verglichen werden.

Mikroorganismen können anhand ihrer ribosomalen RNA taxonomisch eingeordnet und phylogenetisch charakterisiert werden. Die rRNA kodierende DNA der Hefen ist stark konserviert, daher wird zur Untersuchung oft die ITS-Region (internal transcribed spacer) mit einbezogen. Aufgrund eines geringen evolutionären Drucks weisen diese Regionen eine hohe Variabilität auf und die Hefen können somit differenziert werden. Zur Untersuchung dient die Polymerase Kettenreaktion mit einer anschließenden Nukleotidsequenzierung. Diese Methode ermöglicht im Gegensatz zur MALDI-TOF-MS eine Identifizierung der Hefen, unabhängig von den Kultivierungsbedingungen und dem physiologischen Zustand der zu untersuchenden Hefe. Verwendet wurden die Primer ITS1 und ITS4 (Tabelle 4-18) nach White et al. 1990 [106], die am Ende der 18S-rDNA beziehungsweise am Anfang der 26S-rDNA binden und somit die zwei ITS-Regionen und die 5.8S-rDNA einschließen (Abbildung 4-46).

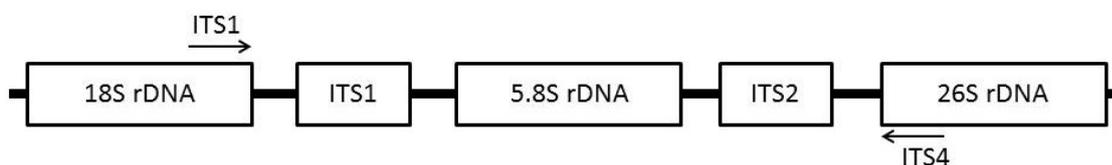


Abbildung 4-46: Chromosomale Anordnung der rRNA-Gene mit den dazwischen liegenden ITS1- und ITS2-Regionen (nach [180])

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 4-18: Verwendete Forward und Reverse Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)	Guanin und Cytosin-Gehalt (%)	Schmelzpunkt (°C)
ITS1 (for)	TCCGTAGGTGAACCGCGG	19	63	61
ITS4 (rev)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	45	55

Die Sequenzierung erfolgte bei der Igc-genomics GmbH. Anhand der Sequenzierungsdaten (BioEdit Sequence Alignment Editor) wurden die verschiedenen Sequenzen verglichen und ausgewertet. In den Abbildungen 4-47 und 4-48 ist ein solcher Sequenzvergleich für die *S. cerevisiae* 2.200 (violetter Rahmen), *S. pastorianus* ug3, ug2 und ug1 (roter Rahmen) sowie der Nicht-*Saccharomyces*-Fremdhefe (grüner Rahmen) dargestellt.

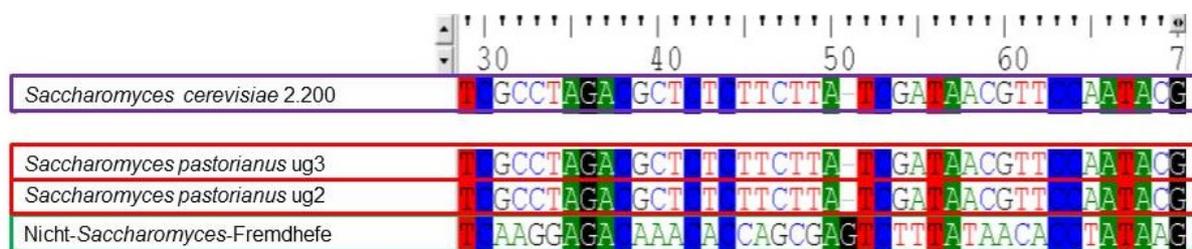


Abbildung 4-47: Sequenzvergleich (ITS1) von *S. cerevisiae* 2.200 (violetter Rahmen), *S. pastorianus* ug3 und ug2 (roter Rahmen), Nicht-*Saccharomyces*-Fremdhefe (grüner Rahmen) mittels BioEdit Sequence Alignment Editor [181]

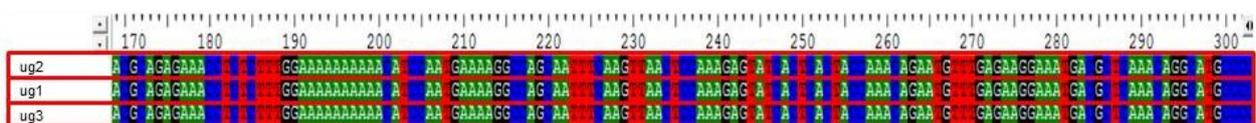


Abbildung 4-48: Sequenzvergleich (ITS4) von *S. pastorianus* ug2, ug1 und ug3 (roter Rahmen) mittels BioEdit Sequence Alignment Editor [181]

Anhand der spezifischen Abfolge der vier Nukleinbasen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) war eine Differenzierung der Nicht-*Saccharomyces*-Fremdhefe zu den verschiedenen *Saccharomyces*-Hefen möglich. Jedoch konnte keine ausreichende Unterscheidung auf Artebene, zwischen *S. cerevisiae* und *S. pastorianus*, sowie auf Stammebene erreicht werden [181]. Bereits in anderen Arbeiten [182] wurde beschrieben, dass die Untersuchung der ITS1-5.8S-ITS2-Region mit Restriktionsenzymen keine Polymorphismen (Aufreten mehrerer Genvarianten innerhalb einer Population) zwischen diesen Stämmen aufweist. Damit ist die rRNA codierende DNA für eine Differenzierung auf Stammebene nicht ausreichend.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Interdelta PCR - δ 12/ δ 21 primer

Als weitere molekularbiologische Methode wurde die δ -PCR nach Ness [138] eingesetzt. Mit Hilfe der spezifischen δ 12/ δ 21-Primern wurden die verwendeten Hefestämme untersucht. Bei dieser klassischen PCR-Methode zur Stammdifferenzierung werden kurze, direkt wiederholte DNA-Sequenzen amplifiziert [138].

In der Abbildung 4-49 sind die Fragmentmuster der fünf *S. cerevisiae* Stämme dargestellt.

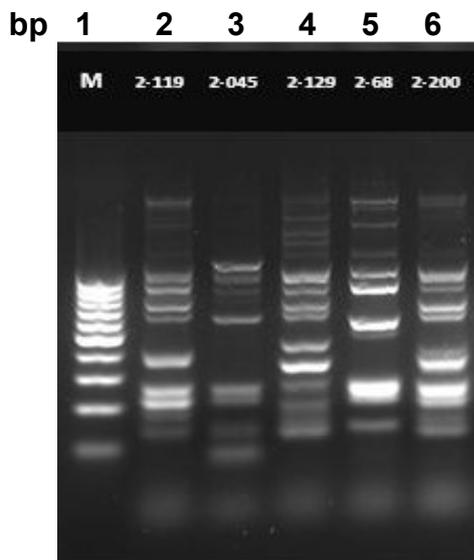


Abbildung 4-49: Fragmentprofil der δ -PCR der untersuchten *S. cerevisiae* Stämme: Spur 2 = 2.119; Spur 3 = 2.045; Spur 4 = 2.129; Spur 5 = 2.068, Spur 6 = 2.200; Spur 1 M = Größenmarker bp-Leiter.

Mit Hilfe der spezifischen δ -Elemente, die eine Basenpaar-Größe von circa 300 bp besitzen, können die *S. cerevisiae* Stämme voneinander differenziert werden. Das Genom der *S. cerevisiae* enthält etwa 100 Kopien der δ -Elemente. Die Verteilung und Anzahl dieser Kopien ist für jeden Stamm spezifisch und kann mit Hilfe der aufgenommenen Fragmentprofile untersucht werden. Die Spuren zwei bis sechs der *S. cerevisiae* Stämme weisen unterschiedliche Fragmentmuster auf. Eine Differenzierung der verwendeten sechs *S. cerevisiae* Stämme mit spezifischen δ 12/ δ 21-Primern war möglich.

Die Untersuchung der fünf *S. pastorianus* (*ssp.* *S. carlsbergensis*) Stämme dagegen führte zu keiner eindeutigen Differenzierung.

In der Abbildung 4-50 sind die Fragmentmuster der fünf *S. pastorianus* (*ssp.* *S. carlsbergensis*) Stämme dargestellt.

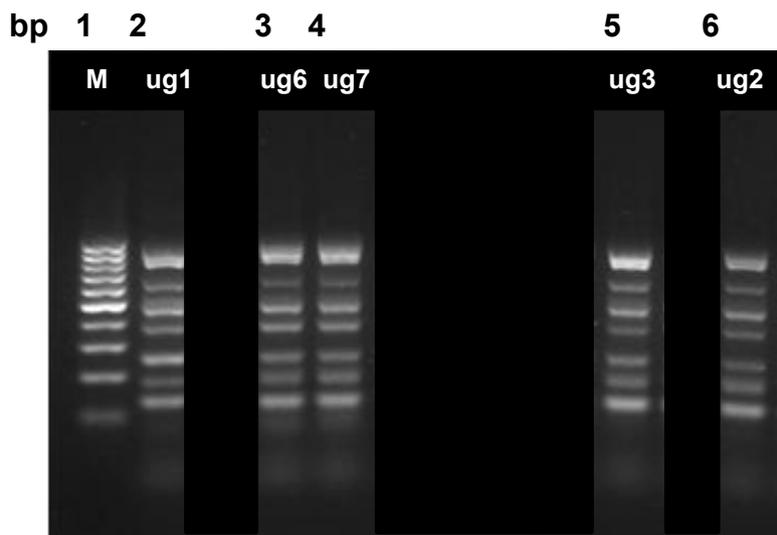


Abbildung 4-50: Fragmentprofil der δ -PCR der *S. pastorianus* (*ssp. S. carlsbergensis*) Stämme: Spur 2 = ug1; Spur 3 = ug6; Spur 4 = ug7; Spur 5 = ug3; Spur 6 = ug2; Spur 1 M = Größenmarker bp-Leiter.

Die *S. pastorianus* (*ssp. S. carlsbergensis*) Stämme bildeten aufgrund der gleichen Fragmentprofile eine einheitliche Gruppe und konnten somit auf Stammebene nicht differenziert werden.

Anhand der Ergebnisse der beiden molekularbiologischen Methoden *Amplifikation der ITS- und 5.8S rDNA-Regionen* und *Interdelta PCR - $\delta 12/\delta 21$ primer* zeigt sich, dass eine Kombination unterschiedlicher Stammtypisierungsmethoden sinnvoll ist, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen [183, 184]. Weitere Methoden wie beispielsweise der Einsatz von Mikrosatelliten-Primern [102-105] oder die PCR - RFLP [117-119] sollten getestet werden.

Fazit:

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten SIMCA-Modelle zur Klassifizierung der Hefearten *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* (*ssp. S. carlsbergensis*), *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* bieten die Möglichkeit einer raschen und verlässlichen Identifizierung. Auf Art-Ebene ließen sich die unabhängigen MS-Daten mit durchschnittlich 98 % richtig den vier Gruppen-Modellen zuordnen. Wurden die Testdaten zu den erstellten Modellen der 13 Hefestämme zugeordnet, zeigte sich kein zuverlässiges Ergebnis. Die Zuordnung der Hefestämme gewachsen im SD-Medium war mit durchschnittlich >90 % besser als die der Hefestämme gewachsen in den Vollmedien YED oder YEPD.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Ziel der eindeutigen Differenzierung der Nicht-*Saccharomyces*-Fremdhefe *Pichia membranifaciens* und der *S. diastaticus* auf Stammebene konnte erreicht werden. Somit ist eine zuverlässige Differenzierung von Fremd- und Kulturhefen der Backhefe- und Brauindustrie realisiert.

Die molekularbiologische PCR-Methode mittels spezifischer $\delta 12/\delta 21$ -Primer, die hier als Referenzmethode eingesetzt wurde, stellt eine mögliche Alternativmethode zur Identifizierung von Hefen dar. Die in dieser Arbeit verwendeten untergärigen Brauhefestämme *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) konnten im Vergleich zur MALDI-TOF-MS nicht auf Stammebene differenziert werden, da sie aufgrund der gleichen Fragmentprofile eine einheitliche Gruppe bildeten. Die untersuchten *S. cerevisiae* Stämme konnten dagegen eindeutig differenziert werden.

Im Vergleich zu der zeitaufwändigeren Probenaufbereitung und kostenintensiven Analyse, die bei der PCR-Methode auftreten, ist die MALDI-TOF-MS-Methode kostengünstiger und die Identifizierung ist mit einer Stunde Gesamtanalysenzeit schneller.

Einer der bedeutendsten Vorteile der MALDI-TOF-MS im Vergleich zur PCR ist, dass aufgrund der veränderlichen Proteinzusammensetzung während des Wachstums der Hefen ein Status quo der Hefen ermittelt werden kann. Es kann ermittelt werden in welcher Wachstumsphase sich die Hefe befindet. Dies ist mit der entwickelten Methode innerhalb von 30 Minuten möglich. Die PCR kann eine zuverlässigere Identifizierung gewährleisten, aber keinen Status quo ermitteln.

4.5 Praxisproben

Neben den Laborversuchen wurden erste Hefeproben aus Fermentationsanlagen der VH-Berlin und einer deutschen Brauerei untersucht. Im Gegensatz zu den optimierten Laborbedingungen war hier mit größeren Schwankungen in der Rohstoffzusammensetzung sowie bei den Prozessbedingungen zu rechnen.

4.5.1 Backhefermentation

Wie bereits in Kapitel 3.3.3 Stell- und Versandhefermentation beschrieben wurden in zwei Reinzuchtschritten (Labormaßstab) die sechs unterschiedlichen Backhefestämme *S. cerevisiae* 2.200, 2.152, 2.129, 2.119, 2.068 und 2.045 angezogen. Der zweite

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Reinzuchtschritt dient zum Start der Stellhefefermentation. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine reine Batch-Fermentation in 25 L Fermentern (Abbildung 4-51).



Abbildung 4-51: Pilotanlage der VH-Berlin mit vier Fermentern

Die Fermentationen starteten bei einem pH-Wert von 4,6 der Melasselösung bei 30 °C. Während des Prozesses steigt der pH-Wert an und wurde mit Salzsäure reguliert. Die Temperatur und die Belüftung wurden nach Bedarf gesteuert. Am Ende des Fermentationsverlaufs lag der pH-Wert bei rund 4,7. Der enthaltene Zucker (Saccharose) im Medium war verbraucht und die Hefetrockensubstanz lag bei 10-15 g HTS/L. Die jeweilige Stellhefe wurde geerntet, gewaschen und zentrifugiert und anschließend in die Versandhefefermentation gegeben. Der Proteingehalte lag bei 55-60 %. Nach der Zugabe der Stellhefe zu frischer Melasse ist unter kontrollierten Bedingungen eine maximale Hefeaussbeute von 100 g HTS/L erreicht worden. Bei diesem 16 h Verfahren wurde zunächst nur eine geringe Menge an Melasse vorgelegt und der Rest unter Ethanolkontrolliertem Melasse-Feed zugegeben. Gestartet wurde der Prozess bei einem pH-Wert von 4,7. Auch bei diesem Fermentationsverlauf wird der pH-Wert mittels Salzsäure reguliert. Der Temperaturbereich lag bei 32 °C. Zum Ende des Prozesses wurde die Salzsäuregabe gestoppt (pH-Wert 6,0). Die Belüftung wurde ebenfalls hochgeregelt. Das Endvolumen der Versandhefefermentationen betrug circa 10,5 L. Der Proteingehalt der Versandhefen lag bei den eingesetzten Hefestämmen im Bereich von 41–43 %.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Aus den verschiedenen Prozessstufen der Stell- und Versandhefe-Fermentation wurden steril mindestens 100 mL Hefesuspension entnommen (Tabelle 4-19).

Tabelle 4-19: Auswahl und Anzahl der Backhefestämme

Gattung	Art	Stämme	Anzahl an Fermentationsproben
		2.045	210
		2.068	221
S.	<i>cerevisiae</i>	2.119	132
		2.129	89
		2.152	152
		2.200	235

Wie in Kapitel 3.5.2 *Proteinextraktion aus Praxisproben* ausführlich beschrieben wurde die Gesamtzellzahl mittels NucleoCounter®YC-100™ ermittelt und die Hefesuspension auf eine definierte Zellzahl von 1×10^8 Zellen/mL eingestellt. Die Hefesuspensionen waren stark mit Melasse kontaminiert. Die zuvor etablierte Aufarbeitung der Hefen für das SD- oder die Vollmedien YED beziehungsweise YEPD konnte hier nicht vollständig übernommen werden. Wie bereits in Kapitel 2.4.1 *Melasse* beschrieben, kann es während der Hefegärung zu einer Nachausscheidung von eingelagerten kolloiden Farbstoffen aus der Melasse kommen. Diese Farbpigmente legen sich auf die Zellwände der Hefen und sind nur schwer abwaschbar. Die aus den Fermentern geernteten Hefezellen waren alle braun gefärbt. Es mussten zwei zusätzliche Waschschriffe mit Leitungswasser vorangestellt werden.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Abbildung 4-52 ist der Spektrenverlauf des Hefestammes *S. cerevisiae* 2.200 während der Stell- und Versandhefefermentation dargestellt.

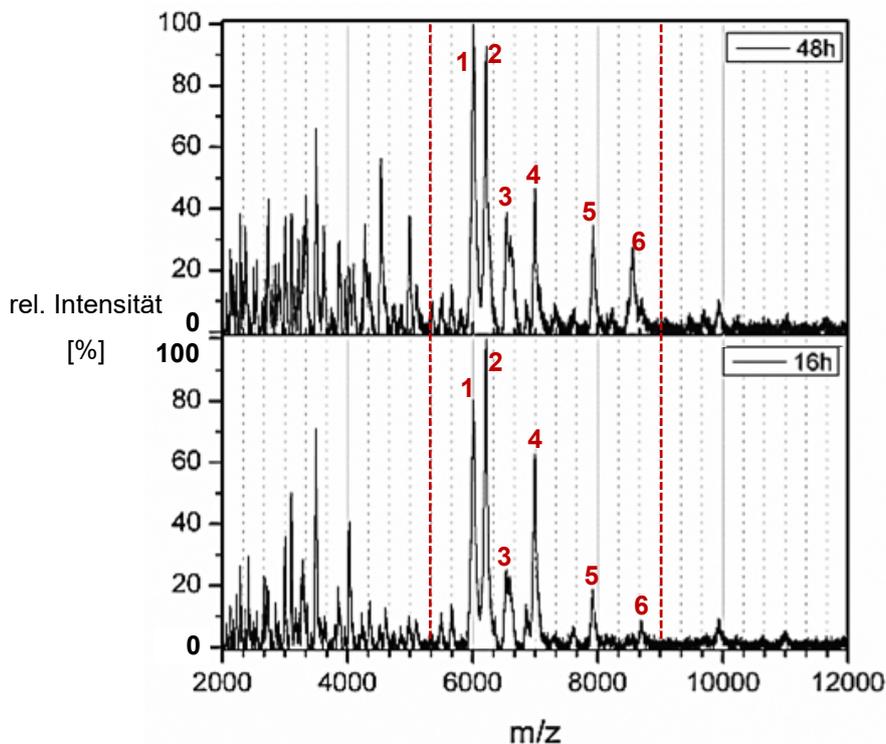


Abbildung 4-52: Veränderung des Protein-Fingerprints des Hefestammes *S. cerevisiae* 2.200 während der Fermentation (16 h Stellhefe 2.200; 48 h Versandhefe 2.200)

In der Abbildung 4-52 sind die zwei Massenspektren der obergärigen Backhefe 2.200 zu unterschiedlichen Propagationsschritten gegenübergestellt. Das untere Spektrum ist der Protein-Fingerprint des Hefestammes 2.200 zum Zeitpunkt der Stellhefefermentation nach 16 h. Das obere Spektrum zeigt den Protein-Fingerprint zum Zeitpunkt der Versandhefefermentation nach 48 h. In den Massenbereichen von 6000-9000 Da sind sechs charakteristische Peaks mittels MALDI-TOF-MS detektierbar, die sich während des gesamten Fermentationsprozesses nur gering in ihrer Intensität verändern. Die Intensitäten von Peak eins im Verhältnis zu Peak zwei verändert sich während der zwei Prozessschritte. Die Signalintensitäten der Peaks drei, fünf und sechs nehmen um circa 10 % zu. Hier ist bereits anhand der unterschiedlichen Massenspektren ein Unterschied in den Protein-Fingerprints zu sehen.

Wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben wurden die MS-Daten nach dem Savitzky-Golay-Verfahren geglättet und eine Flächennormierung durchgeführt. Die bearbeiteten Massenspektren der unterschiedlichen Fermentationsstufen wurden von jedem Hefestamm zu einem Datensatz zusammengeführt und eine

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. In den Abbildungen 4-58 bis 4-63 sind die Score-Plots der Hefestämme *S. cerevisiae* 2.045, 2.068, 2.119, 2.129, 2.152 und 2.200 abgebildet.

In der Abbildung 4-53 ist der Score-Plot des Hefestammes 2.200 dargestellt.

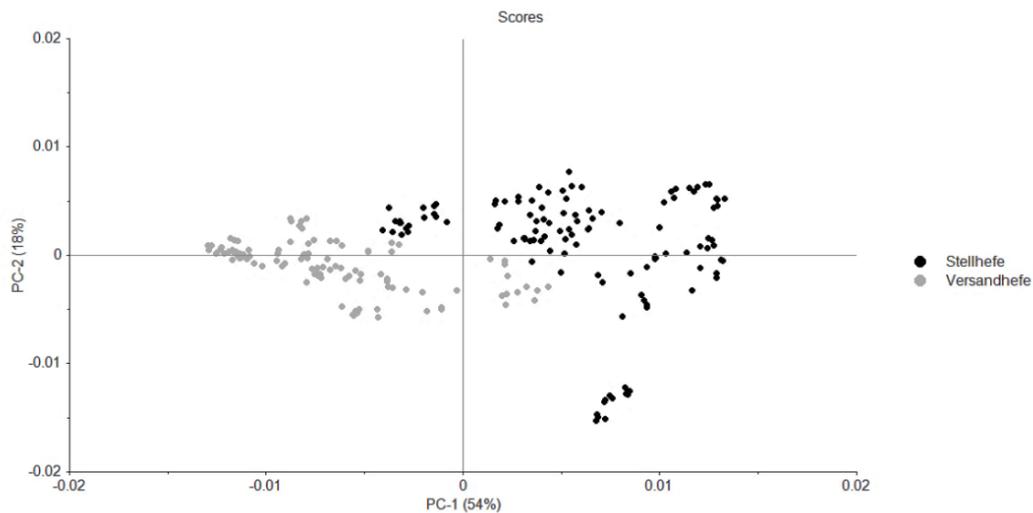


Abbildung 4-53: PCA Score-Plot der 2.200–Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell- (schwarz) und Versandhefe (grau)

In dem PC-1-PC-2-Scoreplot sind die Datenpunkte der Stellhefe 2.200 schwarz, die der Versandhefe 2.200 grau im Plot dargestellt. Es wird eine Gesamtvarianz der Daten von 72 % erklärt. Die Datenpunkte der Klasse Stellhefe (schwarz) befinden sich auf der positiven PC-1 Achse. Ein kleiner Teil der Daten streut in Richtung der negativen PC-1 Achse. Gegenübergestellt ist die Klasse Versandhefe (grau) deren Datenpunkte sich auf der negativen PC-1 Achsen befinden. Auch hier streuen die Daten Richtung positiver PC-1 Achse.

In der Abbildung 4-54 ist der Scoreplot der Stell- und Versandhefe 2.068 dargestellt. Auch hier zeigt sich eine ähnliche Verteilung der Datenpunkte im PC1-PC-2-Scoreplot wie bei der *S. cerevisiae* 2.200. Die MS-Daten der Stellhefe (schwarz) befinden sich auf der positiven PC-1 Achse und streuen in Richtung negativer PC-1 Achse. Dagegen befinden sich die Datenpunkte der Versandhefe (grau) auf der negativen PC-1 Achse. Die Streuung innerhalb der Datenmenge Versandhefe ist geringer. Die erklärte Varianz der Daten liegt bei 66 %.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

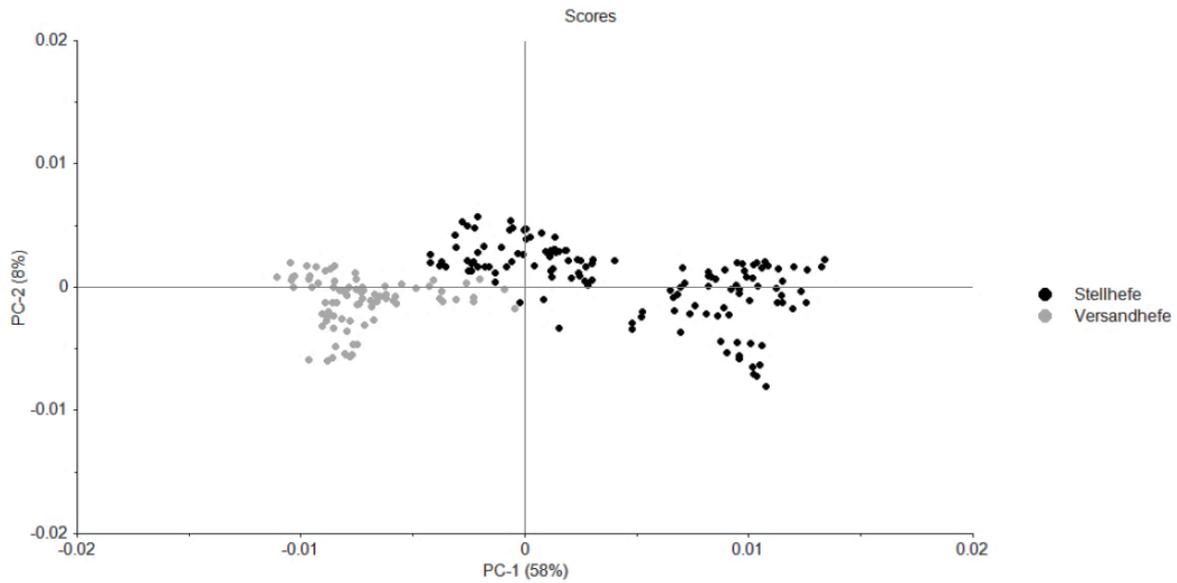


Abbildung 4-54: PCA Score-Plot der 2.068 – Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell- (schwarz) und Versandhefe (grau)

In den nachfolgenden Abbildungen 4-55 bis 4-58 sind die PC-1-PC-2-Scoreplots der *S. cerevisiae* 2.045, 2.119, 2.129 und 2.152 dargestellt. Es wurden hier ebenfalls die mittels MALDI-TOF-MS gemessenen Protein-Fingerprints der jeweiligen Stell- und Versandhefen im Hauptkomponentenmodell ausgewertet.

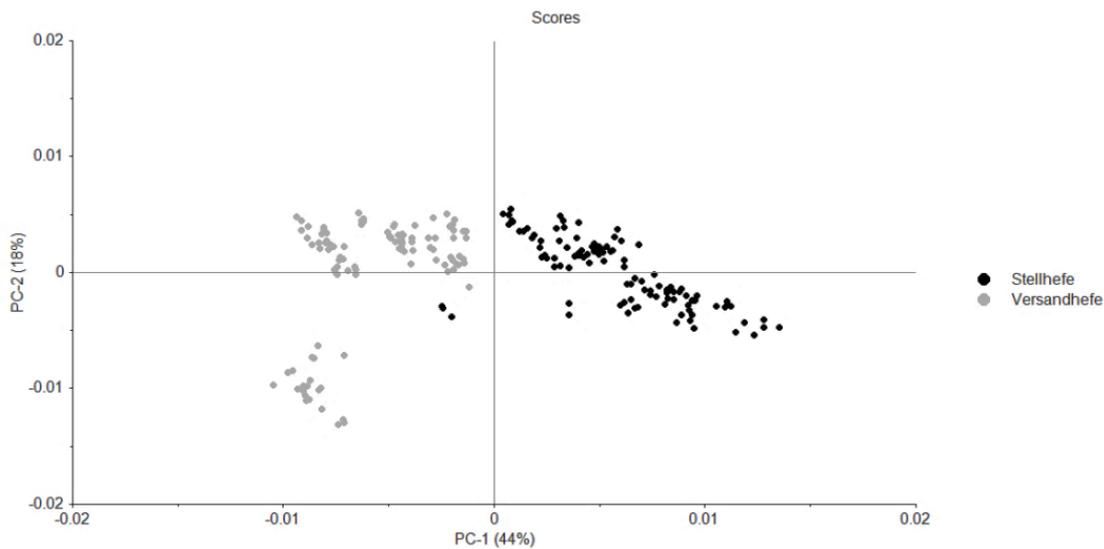


Abbildung 4-55: PCA Score-Plot der 2.045 – Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell- (schwarz)- und Versandhefe (grau)

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

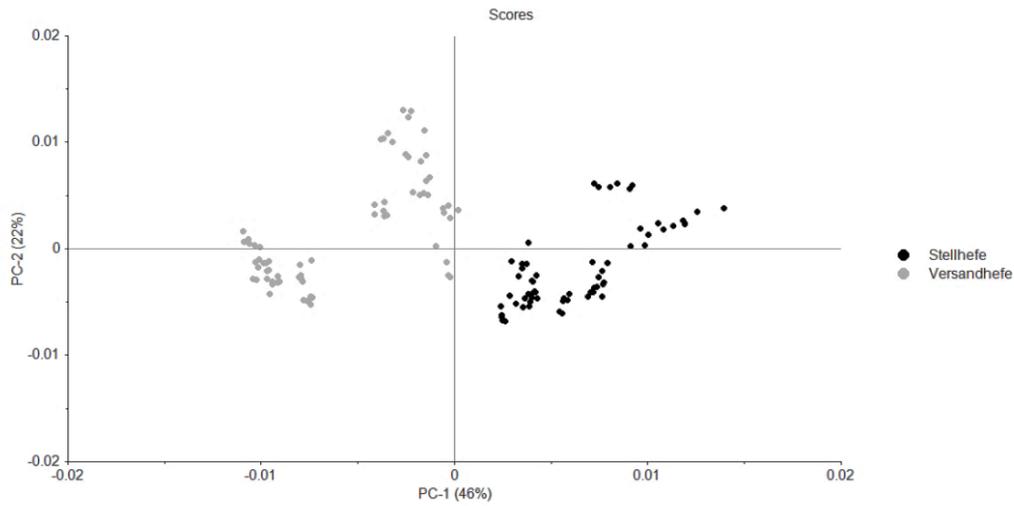


Abbildung 4-56: PCA Score-Plot der 2.119 – Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell- (schwarz) und Versandhefe (grau)

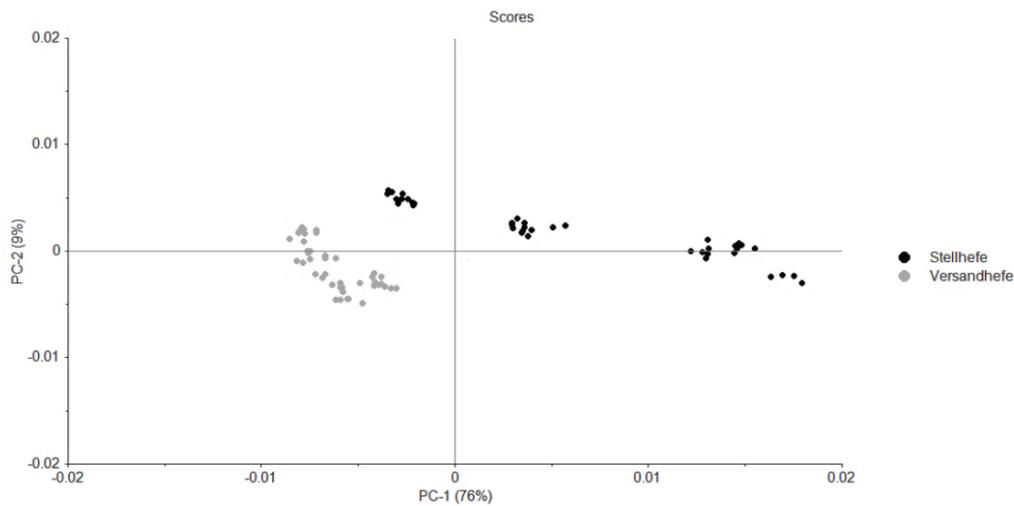


Abbildung 4-57: PCA Score-Plot der 2.129 – Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell- (schwarz)- und Versandhefe (grau)

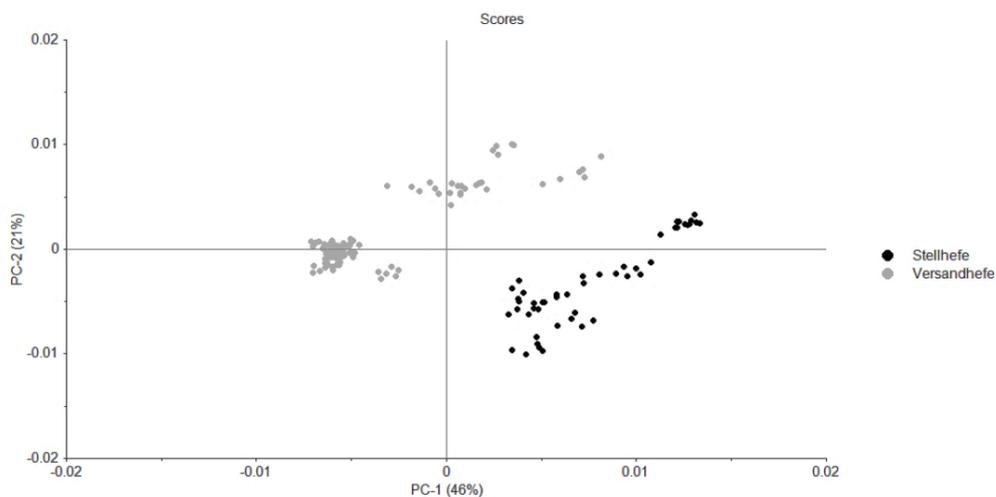


Abbildung 4-58: PCA Score-Plot der 2.152 – Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell- (schwarz) und Versandhefe (grau)

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie bei der Untersuchung der verschiedenen Hefestämme gewachsen in den Labormedien SD, YED und YEPD wurden auch diese MS-Daten der Stell- und Versandhefen den bereits erstellten SIMCA-Modellen zugeordnet. Es konnte keine richtige Zuordnung der Hefen erreicht werden.

Daher wurde für den Prozess der Batch-Fermentation ein eigenes SIMCA-Modell erstellt. Insgesamt wurden 1039 Proben untersucht.

Wie in Kapitel 4.4.1 *Zuordnung von Testdaten zum SIMCA-Modell* beschrieben, wurden zunächst Kalibriermodelle erstellt und der Modellabstand zu den jeweiligen Kalibriermodellen untersucht.

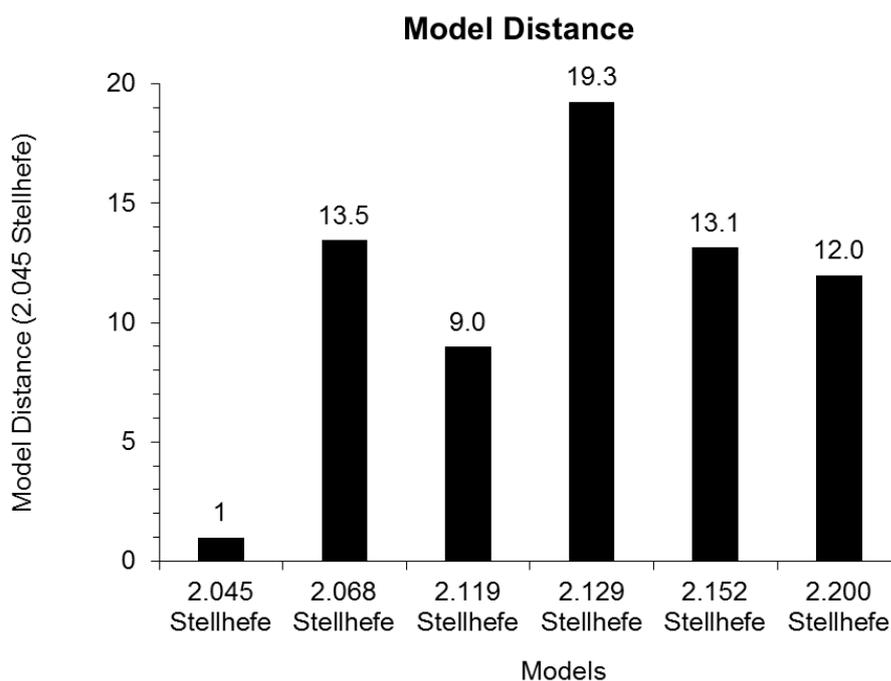


Abbildung 4-59: Modellabstand des Kalibriermodells der Stellhefe *S. cerevisiae* 2.045 gegen sich selbst und den Kalibriermodellen der unterschiedlichen Stellhefen 2.068, 2.119, 2.152 und 2.200

In der Abbildung 4-59 ist der Modellabstand des Kalibriermodells der Stellhefe *S. cerevisiae* 2.045 gegen sich selbst und den restlichen Kalibriermodellen der unterschiedlichen Stellhefen 2.068, 2.119, 2.152 und 2.200 abgebildet. Der Modellabstand von Stellhefe *S. cerevisiae* 2.045 zu sich selbst beträgt eins. Der Abstand zu den fünf anderen Stellhefen ist größer neun. Ab einem Modellabstand von größer drei kann von einer Trennung gesprochen werden. In der Tabelle 4-20 und 4-21 sind die Modellabstände der unterschiedlichen Stell- und Versandhefen zusammengefasst.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 4-20: Modellabstände der Kalibriermodelle der sechs Stellhefen

Distance between models	Stellhefe					
	2.045	2.068	2.119	2.129	2.152	2.200
2.045 Stellhefe	1	13.5	9.0	19.3	13.1	12.0
2.068 Stellhefe	13.5	1	12.7	16.3	7.1	18.1
2.119 Stellhefe	9.0	12.7	1	9.8	11.5	10.9
2.129 Stellhefe	19.3	16.3	9.8	1	12.3	19.6
2.152 Stellhefe	13.1	7.1	11.5	12.3	1	15.8
2.200 Stellhefe	12.0	18.1	10.9	19.6	15.8	1

Tabelle 4-21: Modellabstände der Kalibriermodelle der sechs Versandhefen

Distance between models	Versandhefe					
	2.045	2.068	2.119	2.129	2.152	2.200
2.045 Versandhefe	1	6.9	10.3	10.4	9.0	12.4
2.068 Versandhefe	6.9	1	12.7	5.5	8.2	17.8
2.119 Versandhefe	10.3	12.7	1	12.7	8.7	26.7
2.129 Versandhefe	10.4	5.5	12.7	1	7.2	22.6
2.152 Versandhefe	9.0	8.2	8.7	7.2	1	20.1
2.200 Versandhefe	12.4	17.8	26.7	22.6	20.1	1

Die Modellabstände der Kalibriermodelle zu sich selbst betragen eins. Der Abstand zu den jeweils anderen Modellen ist größer drei. Damit ist eine gute Trennung der unterschiedlichen Kalibriermodelle erreicht.

In ersten Versuchsansätzen wurden 120 unabhängige Testdaten den Modellen zugeordnet (Abbildung 4-60 und 4-61). Diese Testdaten wurden nicht zur Modellbildung genutzt.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In den Abbildung 4-60 und 4-61 sind die prozentualen Verteilungen der „Richtigen Zuordnung“ (schwarz), „Falsche Zuordnung“ (hellgrau) und „Keine Zuordnung“ (dunkelgrau) des jeweiligen Hefestammes dargestellt.

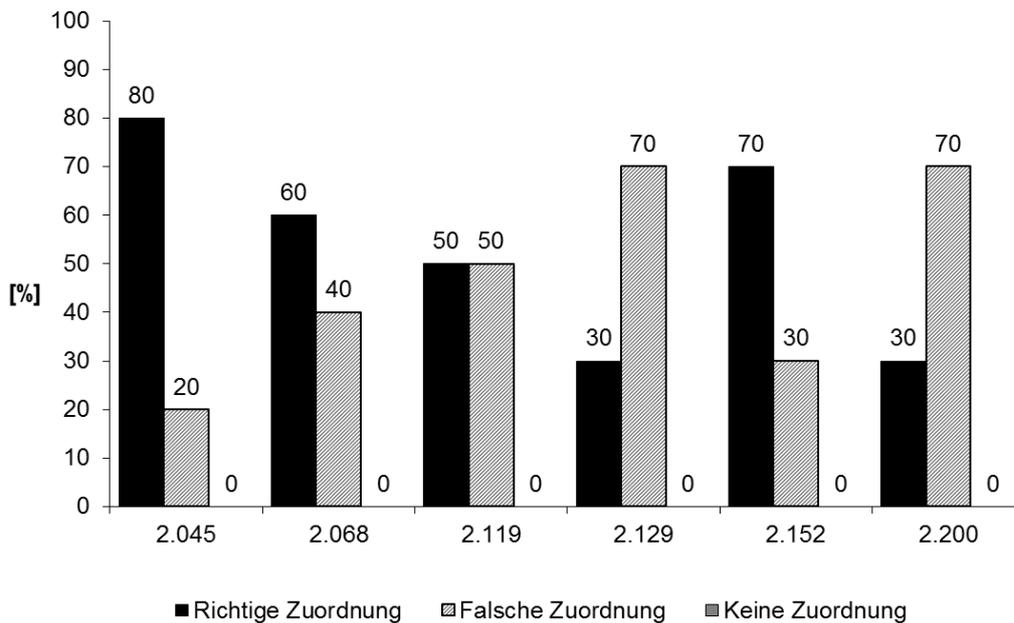


Abbildung 4-60: Ergebnisse der Zuordnung von Testdaten zu den Kalibriermodellen der sechs Stellhefen *S. cerevisiae* 2.045 bis 2.200

Für die Stellhefe 2.045 konnten 80 % der Testdaten richtig zugeordnet werden. 20 % der Spektren wurden falsch-positiv zugeordnet. Die richtige Zuordnung der Testdaten der anderen fünf Hefestämme 2.068 bis 2.200 schwankt zwischen 30-70 %. Auch hier wurden Daten falsch-positiv einem der anderen *S. cerevisiae* Stämme zugeordnet.

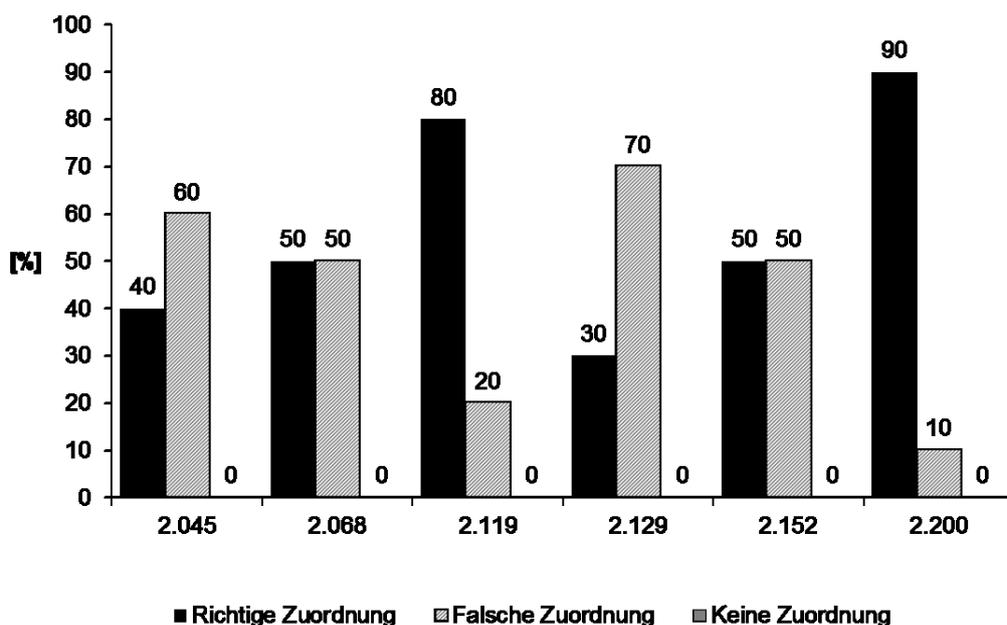


Abbildung 4-61: Ergebnisse der Zuordnung von Testdaten zu den Kalibriermodellen der sechs Versandhefen *S. cerevisiae* 2.045 bis 2.200

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Auswertung der Zuordnung von Testdaten zu den Kalibriermodellen der Versandhefen zeigte ein vergleichbares Ergebnis. Zwischen 30 % und 90 % der Daten konnten richtig zugeordnet werden. Die Ergebnisse für eine falsch-positiv Zuordnung lagen bei 10 % bis 70 %.

In einem ersten Versuch wurde eine unbekannte Backhefe *S. cerevisiae* F1 von der Deutschen Hefewerk GmbH (DHW) untersucht. Proben dieses Hefestammes F1 wurden ebenfalls aus den Prozessstufen der Stell- und Versandhefefermentation entnommen und aufgearbeitet. Anschließend wurden die extrahierten Proteine am MALDI-TOF-MS gemessen und die Protein-Fingerprints ausgewertet. In der Abbildung 4-62 ist die prozentuale Verteilung der „Richtigen Zuordnung“ (schwarz), „Falsche Zuordnung“ (hellgrau) und „Keine Zuordnung“ (dunkelgrau) des jeweiligen Hefestammes zur unbekanntem Backhefe *S. cerevisiae* F1 dargestellt.

Die *S. cerevisiae* F1 konnte keinem der Stellhefemodelle 2.045 bis 2.200 zugeordnet werden. Bei der Zuordnung der Testdaten der Versandhefen wurde zu 2 % die *S. cerevisiae* F1 falsch-positiv der Versandhefe 2.119 zugeordnet.

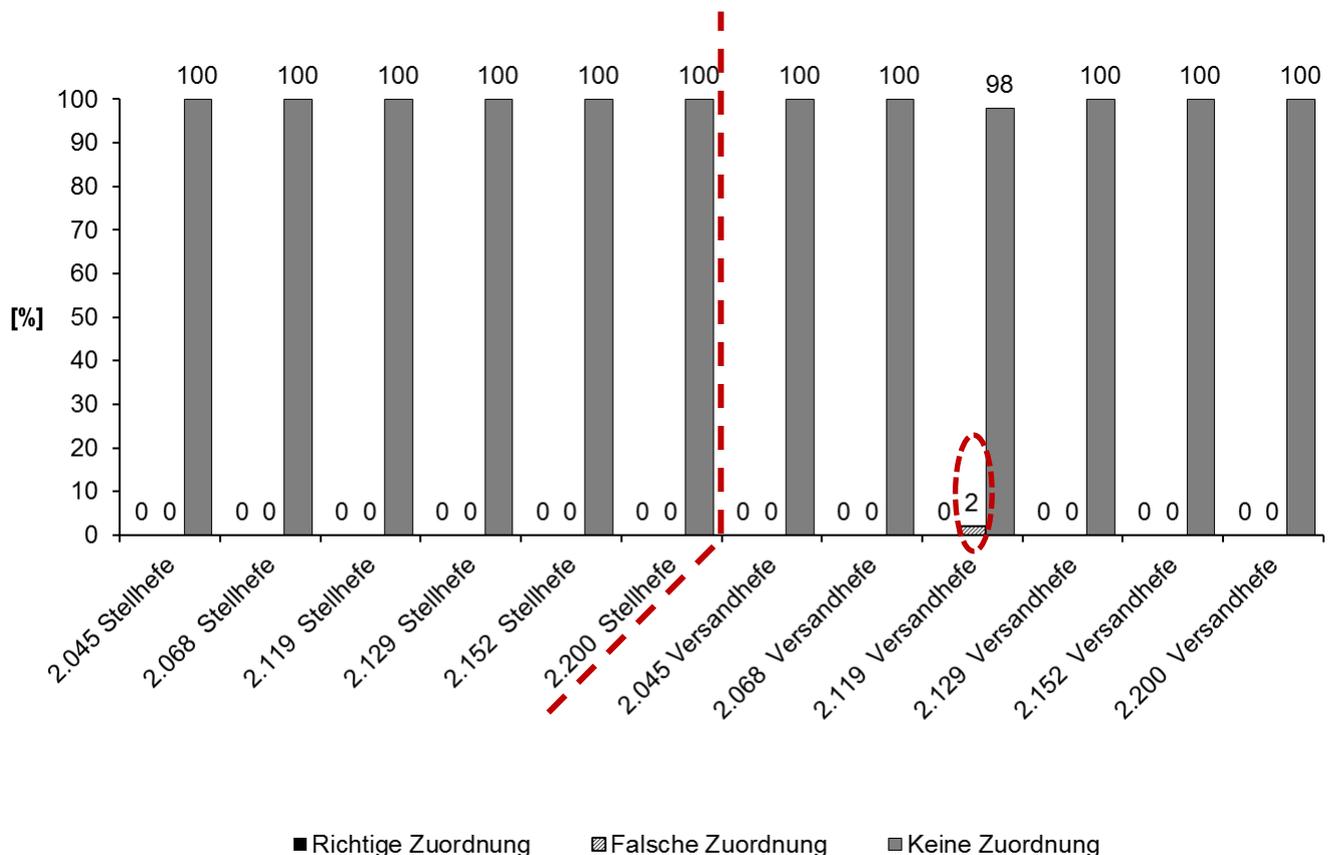


Abbildung 4-62: Ergebnisse der Zuordnung von *S. cerevisiae* F1 zu den Kalibriermodellen der sechs Stell- und Versandhefen *S. cerevisiae* 2.045 bis 2.200

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Anhand der Ergebnisse zeigte sich, dass mit den erstellten Kalibriermodellen der Stell- und Versandhefen *S. cerevisiae* 2.045 bis 2.200 eine erste unbekannte *S. cerevisiae* F1 als nicht zum Modell zugehörig identifiziert werden konnte.

Mittels der spezifischen $\delta 12/\delta 21$ -Primer konnten alle verwendeten Backhefestämme identifiziert werden. Jedoch war keine Unterscheidung der Prozessstufen Stell- und Versandhefefermentation möglich.

Fazit:

Für die Extraktion und Analyse von Hefeproteinen der sechs verschiedenen Stell- und Versandhefen aus den Prozessstufen der Stell- und Versandhefefermentation musste ein zusätzlicher Waschschrift in der Aufarbeitung der Proben mit Leitungswasser durchgeführt werden. Melassereste und eingelagerte Farbpigmente führten zur Störung der MALDI-TOF-MS Messungen. Aufgrund der angepassten Probenaufarbeitung konnten erste reproduzierbare Messungen durchgeführt werden. Insgesamt wurden 1039 Kalibrierproben und 120 Testdaten untersucht und ausgewertet. Die Protein-Fingerprints der Backhefen aus den verschiedenen Prozessstufen konnten nicht dem etablierten SIMCA-Modell aus den Laborversuchen zugeordnet werden. Die Propagation der Backhefen im Labormaßstab erfolgt nach einem anderen Propagationsprozess als die Batch-Fermentation. Hieraus resultieren andere Protein-Fingerprints als im etablierten SIMCA-Modell. Um eine Prozesskontrolle durchführen zu können, musste ein neues SIMCA-Modell erstellt werden.

Anhand der Protein-Fingerprints wurden im Praxisversuch sechs Backhefestämme der Art *S. cerevisiae* aus den Prozessstufen der Stell- und Versandhefefermentation differenziert. Die erstellten Kalibriermodelle zeigen eine erste gute Trennung. Jedoch konnte mit den bisherigen Testdaten keine zufriedenstellende Zuordnung erreicht werden.

Insgesamt liegen noch zu wenige Messdaten vor, um eine gesicherte Etablierung der Stell- und Versandhefemodelle zu ermöglichen.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.5.2 Erntehefe nach Bierfermentation

Die Erntehefen-Proben stammten aus einer deutschen Großbrauerei, die nach einem standardisiertem Fermentationsverfahren, nach Stand der Technik der Brauindustrie, Bier produziert.

Nach Herführung der Reinzuchthefen im Brauereilabor erfolgt eine geschlossene Propagation in zylindrokonischen Reinzuchtanks. Die daraus gewonnene Hefe wird verwendet um Bierwürze zu vergären. Am Ende der Gärung setzt sich die Hefe im Konus des Gärtanks ab und kann geerntet werden, um erneut für eine Fermentation eingesetzt zu werden. Die Wiederverwendung der Erntehefe wird als Führung bezeichnet. Jede Führung beschreibt ein Fermentationszyklus.

Es wurden zwei untergärige Brauhestämme A und B der Art *S. pastorianus* (ssp. *carlsbergensis*) untersucht. Die Erntehefe-Proben wiesen eine Hefekonzentration von 10^9 Zellen/mL auf und wurden aus verschiedenen Führungen entnommen (siehe Tabelle 4-22). Der Fermentationsprozess war bei allen Führungen gleich.

Tabelle 4-22: Übersicht der Hefeernte von *S. pastorianus* (ssp. *carlsbergensis*) A und B

Hefestamm	Führung	Zellzahl (10^9 Zellen/mL)	geerntet	neuer Anstelltag
B	3	1.78	11.01.2014	14.01.2014
B	4	1.71	21.01.2014	-
B	2	1.95	27.01.2014	28./29.01.14
A	5	1.39	26.01.2014	30.01.2014
A	4	1.59	16.03.2014	17.03.2014
B	3	1.54	16.03.2014	18.03.2014
B	3	1.70	17.03.2014	18/19.03.14
A	4	1.63	19.03.2014	20.03.2014
A	5	1.58	24.03.2014	26.03.2014
B	4	1.60	24.03.2014	25./26.03.14
B	4	1.70	25.03.2014	-
A	5	1.51	25.03.2014	-
B	3	1.69	07.04.2014	09.04.14
B	3	1.69	07.04.2014	09.04.14
B	1	1.61	13.04.2014	15.04.2014
A	3	1.75	13.04.2014	14.04.2014
B	4	1.53	17.04.2014	22.04.2014
A	1	1.80	20.04.2014	22.04.2014
B	5	1.70	22.04.2014	24.04.2014
A	4	1.60	23.04.2014	29.04.2014

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Analog der Aufarbeitung der Fermentationsproben der Backhefen wurde die Gesamtzellzahl ermittelt und die Hefesuspension auf eine definierte Zellzahl von 1×10^8 Zellen/mL eingestellt. Um Bierreste von der Erntehefe zu entfernen mussten zwei zusätzliche Waschschriffe mit Leitungswasser vorangestellt werden. Insgesamt wurden 96 Massenspektren der A-Hefe und 101 Massenspektren der B-Hefe ausgewertet. In den Abbildungen 4-63 und 4-64 sind die Score-Plots der Erntehefen *S. pastorianus* (ssp. *carlsbergensis*) A und B aus den unterschiedlichen Fermentationszyklen (Führungen 1 bis 5) abgebildet.

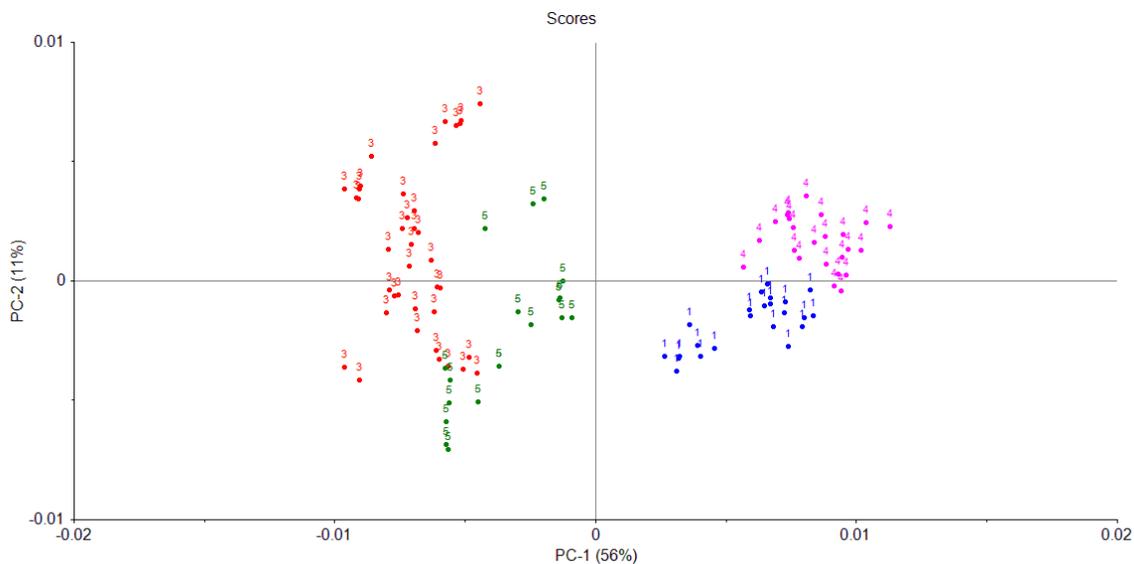


Abbildung 4-63: Score-Plot der A-Hefe; Differenzierung der Führungen 1 (blau), 3 (rot), 4 (rosa) und 5 (grün)

In der Abbildung 4-63 sind die vier Klassen (Führungen) 1 (blau), 3 (rot), 4 (rosa) und 5 (grün) der Erntehefe A dargestellt. Eine Differenzierung der Fermentationszyklen ist erkennbar. Es zeigt sich, dass die Daten der Führungen 3 und 5 stärker innerhalb der eigenen Klasse streuen als bei den Führungen 1 und 4. Die Daten der Praxisproben konnten wie die der Backhefefermentation nicht den validierten SIMCA-Modellen der Laborversuche zugeordnet werden. Auch hier scheint der Einfluss der unterschiedlichen Prozessschritte zur Hefeherführung und Hefeernte den Protein-Fingerprint zu beeinflussen. Auch die verwendete Würze der Brauerei kann zu einem veränderten Proteinmuster führen und somit eine Zuordnung zu den gleichbleibenden Laboransätzen hemmt.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Abbildung 4-64 ist der Score-Plot der Erntehefe B dargestellt. Es wurden wie bei dem untergärigen A-Hefestamm die verschiedenen Klassen (Führungen) 1 (blau), 2 (rot), 3 (grün) und 4 (schwarz) ausgewertet.

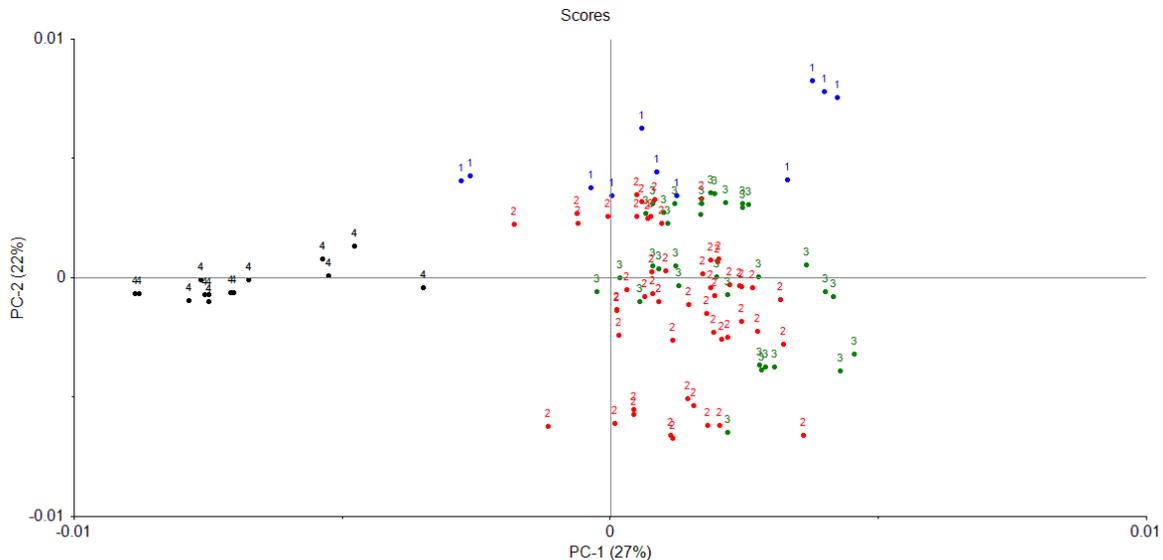


Abbildung 4-64: Score-Plot der B-Hefe ; Differenzierung der Führungen 1 (blau), 2 (rot), 3 (grün), 4 (schwarz)

Im Gegensatz zur A-Hefe ist bei diesem Hefestamm B keine Differenzierung der Führungen möglich. Die Datenpunkte innerhalb einer Klasse (Führung) schwanken zu stark.

Mit Hilfe der PCR-Referenzanalytik konnten die Brauereihefen A und B eindeutig der Gruppe der fünf untergärigen Hefestämmen *S. pastorianus* (ssp. *carlsbergensis*) ug1, ug2, ug3, ug6 und ug7 zugeordnet werden. Wie in Kapitel 4.4.3 *Referenzanalytik* beschrieben, ist die eindeutige Identifizierung innerhalb dieser Gruppe nicht möglich. So konnte nur durch die Brauerei bestätigt werden, um welche Hefestämme es sich bei den beiden Brauereihefen A und B handelte.

Fazit:

Anhand von Protein-Fingerprints zweier untergäriger Hefestämme A und B der Art *S. pastorianus* (ssp. *carlsbergensis*) einer deutschen Brauerei erfolgte der Ansatz einer Differenzierung verschiedener Führungen. Die verschiedenen Führungen der A-Hefe konnten differenziert werden. Im Vergleich zeigte sich, dass die verschiedenen Führungen des B-Hefestammes nicht voneinander getrennt werden konnten. Die gemessenen Protein-Fingerprints der verschiedenen Führungen konnten wie bei den

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Backhefefermentationen zu diesem Forschungszeitpunkt nicht dem validierten SIMCA-Modell aus den Laborversuchen zugeordnet werden. Die Propagation der Brauhefen im Labormaßstab ist ein anderer Prozess als die Fermentation in der Brauerei. Hieraus resultieren andere Protein-Fingerprints als im validierten SIMCA-Modell. Auch hier liegen noch zu wenige Daten vor, um ein gesichertes Kalibriermodell für die beiden Produktionshefen A und B zu etablieren. Aufgrund der unterschiedlichen Prozesse in der Brauerei und den Laboransätzen muss ein für die Brauerei abgestimmtes SIMCA-Modell etabliert werden, um eine gesicherte Prozesskontrolle zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Für die Brau- und Backwarenindustrie sind die Hefen der Gattungen *S. cerevisiae* und *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) essentielle Mikroorganismen für die Herstellung von Bier- und Backwaren. Durch kontrollierte, biologische Stoffwechselprozesse der Hefen werden wertgebende Produkteigenschaften erlangt. Aufgrund verschiedener Geno- und Phänotypen kann die Qualität und Charakteristika eines Produktes durch unterschiedliche Stoffwechselleistungen und den daraus resultierenden Stoffwechselprodukten beeinflusst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 11 verschiedene Kulturhefestämme der Art *S. cerevisiae* und *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) untersucht, die zur Bier- oder Backwarenherstellung eingesetzt werden. Als Fremdhefen wurden *Pichia membranifaciens* und *S. diastaticus* betrachtet. Die Abgrenzung der untergärigen und obergärigen Reinzuchthefer *S. cerevisiae* zu der *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) sowie der Fremdhefen *Pichia membranifaciens* und *S. diastaticus* ist für die Anwendung in der Industrie praxisrelevant.

Durch die Entwicklung einer schnellen chemischen Probenaufarbeitungsmethode sollten anhand der extrahierten spezifischer Protein-Fingerprints, gemessen mit dem MALDI-TOF-MS, eine Differenzierung der unterschiedlichen Hefen auf Art- und Stammebene erreicht werden.

Im Rahmen der Methodenentwicklung sind die Target-Materialien „MTP 384 polierter Stahl“ und „MTP 384 geschliffener Stahl“ (Bruker Daltonics GmbH) sowie die Target-Präparationsverfahren dried droplet, thin layer, double layer und reverse thin layer untersucht worden.

Ein wichtiger Aspekt war das Löslichkeitsverhalten der Proteine und der Matrix. Nur durch ein optimal abgestimmtes Analyt-Matrix-Verhältnis konnte eine gute Ionisierung der Proteine erfolgen und somit eine Differenzierung der verschiedenen Hefestämme erreicht werden. Wichtig hierfür war die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels wie Acetonitril, welches in Verbindung mit den getesteten Matrices (α -Cyano-4-hydroxymizsäure, 2,6-Dihydroxyacetophenon, Sinapinsäure, Bernsteinsäure, Dihydroxybenzoesäure und Nicotinsäure) beziehungsweise mit den Hefeproteinen gleichmäßig verdunstet und eine gute Homogenität bei der Kristallisierung des Analyt-Matrixsystems erreicht. Die Matrix α -Cyano-4-hydroxymizsäure (HCCA) ließ sich gut in dem organischen Lösungsmittel Acetonitril lösen und wies eine homogene

5. ZUSAMMENFASSUNG

Kristallstruktur auf dem polierten Stahltarget auf. Aufgrund der hohen Oberflächenaffinität konnten sich so die Hefeproteine binden.

Ein weiter Aspekt der Arbeit war es eine schnelle und robuste Probenaufbereitung zu entwickeln die eine Etablierung in der Schnellanalytik erlaubt.

Bei einem Zellaufschluss mussten die Zellwände der Hefen mechanisch oder biochemisch zerstört oder permeabilisiert werden. Die freigesetzten Enzyme oder Strukturproteine durften nicht denaturiert werden und die eingesetzten Detergenzien die massenspektrometrischen Untersuchungen nicht beeinflussen. Der Einsatz von gesundheitsgefährdenden Agenzien sollte auf ein Minimum reduziert werden und die Gesamtkosten beziehungsweise der Zeitaufwand möglichst gering sein. Der chemische Aufschluss erwies sich als einfach und reproduzierbar.

Extrahiert werden ribosomale Proteine der Hefen, die als signifikante Protein-Fingerprints im Massenspektrum detektiert werden konnten. Die Hefeproteine können durch einen chemischen Aufschluss in 25 Minuten extrahiert werden.

Dafür wird 1 mL Zellsuspension mit 1 mL 99,9 % EtOH versetzt und gemischt. Anschließend wird für 5 min bei 20 °C mit 6000 rpm (2822.4 x G) zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig mittels Pipette abgenommen und verworfen. In einem weiteren Waschschrift wird das Zellpellet mit 1 mL 75 % EtOH resuspendiert. Danach wird erneut bei 20 °C mit 6000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet 1 min lang mit 13000 rpm (13249.6 x G) zentrifugiert. Der klare Überstand wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Zellpellet unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Im nächsten Schritt erfolgt der Zellaufschluss im sauren Milieu. Das Zellpellet wird mit 100 µL einer Mischung aus 70 % Ameisensäure und 99,9 % Acetonitril (1:1) versetzt, resuspendiert und für 1 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend wird für 8 min bei 20 °C mit 13000 rpm zentrifugiert. Das Lysat mit den darin extrahierten Hefeproteinen wird in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend kann das Lysat auf das Stahltarget aufgetragen werden.

Im Verlauf der Methodenentwicklung wurden das verwendete organische Lösungsmittelgemisch, welches die kristalline Matrix HCCA in Lösung bringt, sowie das Targetpräparationsverfahren angepasst. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit sowohl bei den manuellen wie automatischen MALDI-TOF-MS-Messungen wurde die Zusammensetzung der Matrix und des Lösungsmittels wie folgt gewählt:

2,7 mg HCCA (Fluka) gelöst in OS III (700 µL ACN + 285 µL H₂O_{Reinst} + 15 µL TFA).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In Kombination mit der entwickelten Probenaufarbeitungsmethode und der verwendeten Matrix HCCA wurde das reverse thin layer Verfahren zur Targetpräparation eingesetzt. Dabei wird 1 µL der extrahierten Proteinlösung auf ein Spot des hochpolierten Stahltargets (Bruker Daltonics GmbH) aufgetragen und bei 20 °C ± 1 °C für circa 30 s getrocknet. Anschließend wird 1,5 µL der organischen Matrixlösung HCCA auf den präparierten Spot aufgetragen.

Die Messungen an dem MALDI-TOF-MS sind im positiven linearen Modus mit einem Nd/YAG Laser im Massenbereich von 2000,36-12999,34 Da durchgeführt worden. Die Target Spots wurden mit jeweils 10 mal 100 Laserschüssen (1000 Einzelspektren pro Spot) beschossen und gemessen. Mit der entwickelten Methode konnten die Hefeproteine mittels MALDI-TOF-MS gemessen werden.

Aufgrund der hohen und komplexen Datenmenge wurden die Hauptkomponentenanalyse und die Klassifizierungsmethode SIMCA verwendet, um die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, genetisch eng verwandten, Brau- und Backhefestämme auf Art- und Stammebene differenzieren zu können.

Zunächst wurde mit der Hauptkomponentenanalyse für jeden Hefestamm ein Modell erstellt, das als Kalibrierdatensatz die gesamte Varianz der jeweiligen Hefestämme repräsentiert. In einem standardisierten Labor-Hefeanzuchtverfahren sind jeweils 1×10^8 Zellen/mL aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase geerntet worden. Um die Komplexität der Datenmenge zu verringern, wurde auf die MS-Daten der letalen Wachstumsphase verzichtet. Diese haben keine Relevanz für die Hefepropagation in der Praxis der Brau- und Backhefeindustrie.

Ein weiteres Ziel war es, anhand der gemessenen MS-Daten beziehungsweise Protein-Fingerprints, eine Differenzierung der verschiedenen Wachstumsstadien mittels der Hauptkomponentenanalyse durchzuführen. Nach der Entfernung von Ausreißern sowie der Datensätze Latenz-, und letale Phase war eine Differenzierung der Wachstumsstadien innerhalb der Hefestämme möglich.

Aufbauend auf der Hauptkomponentenanalyse sollte die Klassifizierung der unterschiedlichen Hefestämme erreichen werden. Für jeden Hefestamm wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und ein SIMCA-Modell für die 13 Hefestämme erstellt. Das Modell-System mit den enthaltenen Kalibrierdaten wurde mit unabhängigen Testdatensätzen auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit getestet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Zuordnung der Hefestämme gewachsen in unterschiedlichen Nährmedien SD, YED und YEPD zeigte sich, dass eine Klassifizierung der Stämme abhängig von dem eingesetzten Nährmedium und der Hefegattung ist. Eine richtige Zuordnung unbekannter Teststämme der *S. cerevisiae* war mit durchschnittlich 93 % möglich, wenn die Hefen im SD-Medium gewachsen waren. Bei der *S. pastorianus* konnte eine richtige Zuordnung von 89 % erreicht werden. Dagegen zeigte sich, dass die Zuordnung von Teststämmen gewachsen in unterschiedlichen Vollmedien unterschiedliche Ergebnisse aufwies. Die untergärigen *S. pastorianus* (ssp. *carlsbergensis*) Stämme ug1, ug6 und ug7 konnten zu durchschnittlich 95 % richtig zugeordnet werden. Die verschiedenen *S. cerevisiae* Arten nur zu 54 %.

Eine erfolgreiche Differenzierung auf Stammebene ließ sich bei der Nicht-*Saccharomyces*-Fremdhefe *Pichia membranifaciens* und der *S. diastaticus* mit der entwickelten Aufarbeitungsmethode und den erstellten SIMCA-Modellen erreichen. Die Testdaten der *S. diastaticus* wurden zu 100 % richtig zugeordnet.

Bei der *Pichia membranifaciens* wurden die Daten, ermittelt aus der Hefeanzucht im YEPD-Medium, zu 91 % „richtig“ zugeordnet die im SD-Medium zu 87%.

Ein weiterer Aspekt war die Zuordnung der Hefen *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*), *S. diastaticus* und *Pichia membranifaciens* auf der Art-Ebene. Mit durchschnittlich 98 % können die in der Arbeit eingesetzten Hefen auf Art-Ebene richtig zugeordnet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass die entwickelte Schnellmethode geeignet ist, um die verwendeten Hefen der Art *S. pastorianus* (ssp. *carlsbergensis*), *S. cerevisiae*, *Pichia membranifaciens* und *S. diastaticus* auf der Art-Ebene zu differenzieren. Die Zuordnung auf Stammebene bedarf einer noch umfangreicheren Datenanzahl für die Kalibriermodelle, um eine genauere Differenzierungen zwischen den unterschiedlichen Stämmen zu erzielen.

Anhand der Protein-Fingerprints wurden in weiteren Versuchen Backhefestämme der Art *S. cerevisiae* aus den Prozessstufen der Stell- und Versandhefefermentation differenziert. Die beiden Propagationsschritte konnten mit der Hauptkomponentenanalyse voneinander getrennt dargestellt werden. Die Massenspektren konnten jedoch nicht dem etablierten SIMCA-Modell aus den Laborversuchen zugeordnet werden. Um eine Prozesskontrolle für die Batch-Fermentation durchführen zu können musste ein neues SIMCA-Modell erstellt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für zwei untergärige Hefestämme A und B der Art *S. pastorianus* (ssp. *carlsbergensis*) wurden unterschiedliche Führungen einer deutschen Brauerei untersucht. Die verschiedenen Führungen 1-5 der A-Hefe konnten differenziert werden. Im Vergleich zeigte sich, dass die verschiedenen Führungen des B-Hefestammes nicht voneinander getrennt werden konnten.

Die gemessenen Massenspektren der verschiedenen Führungen konnten wie bei den Backhefefermentationen nicht dem etablierten SIMCA-Modell aus den Laborversuchen zugeordnet werden. Die Propagation der Brauhefen im Labormaßstab ist ein anderer Prozess als die Fermentation in der Brauerei. Hieraus resultieren andere Protein-Fingerprints als die im etablierten SIMCA-Modell. Um eine Prozesskontrolle zu ermöglichen, ist es notwendig ein SIMCA-Modell zu erstellen, welches auf diese Art der Fermentation etabliert wird.

Zur Überprüfung der Forschungsergebnisse wurde die etablierte molekularbiologische PCR-Methode mit spezifischen δ^{12}/δ^{21} -Primern angewendet. Im Vergleich zur klassischen PCR-Analytik konnten die untersuchten fünf untergärigen Brauhefen mit der MALDI-TOF-MS besser differenziert werden. Die *S. pastorianus* (ssp. *S. carlsbergensis*) Stämme bildeten aufgrund der gleichen Fragmentprofile eine einheitliche Gruppe und konnten mittels δ^{12}/δ^{21} -Primern nicht differenziert werden. Es zeigte sich, dass die untersuchten sechs *S. cerevisiae* Stämme mit der PCR-Methode eindeutig voneinander identifiziert werden konnten unabhängig im welchem Medium die Hefen angezogen wurden.

6. Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] Back, W. (2008). Mikrobiologie der Lebensmittel: Getränke. ©B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, 3. Aufl., ISBN 978-3-89947-360-5.
- [2] La Scola, B; Raoult, D. (2009). Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*, 4(11), e8041.
- [3] L. Ferreira et al. (2010). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 48(6), 2110-2115.
- [4] Kern, C. C., Vogel, R. F., Behr, J. (2014). Differentiation of *Lactobacillus brevis* strains using Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry with respect to their beer spoilage potential. *Food Microbiology*, 40, 18-24.
- [5] Kern, C. C., Usbeck, J. C., Vogel, R. F., Behr, J. (2013). Optimization of matrix-assisted-laser-desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometry for the identification of bacterial contaminants in beverages. *Journal of Clinical Microbiology*, 93(3), 185-191.
- [6] Usbeck, J. C., Wilde, C., Bertrand, D., Behr, J., Vogel, R. F. (2014). Wine yeast typing by MALDI-TOF MS. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 3737–3752.
- [7] Kántor, A., Kačániová, M. (2015). Isolation and Identification of Spoilage Yeasts in Wine Samples by MALDI-TOF MS Biotyper. *Animal Science and Biotechnologies*, 48(1), 156-161.
- [8] Hillenkamp, F., Karas, M. (2000). Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. *International Journal of Mass Spectrometry*, 200(1-3), 71-77.
- [9] Barber, M., Bordoli, R. S., Sedgwick, R. D., Tyler, A. N. (1981). Fast atom bombardment mass spectrometry of cobalamines. *Biological Mass Spectrometry*, 8(10), 492-495.
- [10] Hsu, B. H., Xie, Y.-X., Busch, K. L., Cooks, R. G. (1983). Enhanced ionization of organic salts in secondary-ion mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 51 (2-3), 225-233.
- [11] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8), 151–153.
- [12] Jonsson, G. P., Hedin, A. B., Hakansson P. L., Sundqvist, B. U. R., Saeve, B. G. S., Nielsen, P. F., Roepstorff, P., Johansson, K. E., Kamensky, I., Lindberg, M. S. L. (1986). Plasma desorption mass spectrometry of peptides and proteins adsorbed on nitrocellulose. *Analytical Chemistry*, 58(6), 1084–1087.

6. VERZEICHNISSE

- [13] Zakett, D., Schoen, A. E., Cooks, R. G., Hemberger, P. H. (1981). Laser-Desorption Mass Spectrometry/Mass Spectrometry and the Mechanism of Desorption Ionization. *Journal of the American Chemical Society*, 103(5), 1295-1297.
- [14] Wright, L. G., Cooks, R. G., Wood, K. V. (1985). Matrix enhanced laser desorption in mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, 12(4), 159–162.
- [15] Karas, M., Bahr, U., Hillenkamp, F. (1989). UV laser matrix desorption/ionization mass spectrometry of proteins in the 100 000 dalton range. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 92, 231 – 242.
- [16] Karas, M., Hillenkamp, F. (1988). *International Mass Spectrometry Conference*, Bordeaux.
- [17] Cramer, R., Gobom, J., Nordhoff, E. (2005). High-throughput proteomics using matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry. *Expert Review of Proteomics*, 2, 407–420.
- [18] Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometrybased proteomics. *Nature*, 422, 198–207.
- [19] Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of nonvolatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 78, 53-68.
- [20] Vorm, O., Roepstorff, P., Mann, M. (1994). Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Analytical Chemistry*, 66, 3281-3287.
- [21] Westman, A., Demirev, P., Huth-Fehre, T., Bielawski, J., Sundqvist, B. U. R. (1994). Ion Processes. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 130, 107-115.
- [22] Spengler, B., Kaufmann, R. (1992). Gentle probe for tough molecules - Matrix-Assisted Laser Desorption Mass-Spectrometry. *Analysis*, 20, 91-101.
- [23] Karas, M., Glückmann, M., Schäfer, J. (2000). Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry*, 35(1), 1–12.
- [24] Karas, M., Krüger, R. (2003). Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chemical Reviews*, 103(2), 427–439.
- [25] Jaskolla, T. W., Karas, M. (2008). Using fluorescence dyes as a tool for analyzing the MALDI process. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(8), 1054-1061.
- [26] Jaskolla, T. W., Lehmann, W. D., Karas, M. (2008). 4-Chloro-alpha-cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A*, 105(34), 12200-12205.
- [27] Beavis, R. C., Chait, B. T. (1996). Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins. *High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules Part A: Fundamentals*, 270, 519–551.

6. VERZEICHNISSE

- [28] Suckau, D., Kräuter, K. O., Rapp, U., Mann, M., Jensen, O. (1997). Automation of Maldi-tof MS. *Analytical Chemistry*, 69, 1706–1714.
- [29] Gross, J., Strupat, K. (1998). Matrix-assisted laser desorption/ionisation–mass spectrometry applied to biological macromolecules. *Trends in Analytical Chemistry*, 17(8-9), 470–484.
- [30] Grishko, V. P., Grishko, V. I., Glick, B. R. (1999). Molecular laser biotechnology. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 341–362.
- [31] Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V., Gordon, D. B. (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 14(11), 1584-1586.
- [32] Krishnamurthy, T., Ross, P. L. (1996). Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(15), 1992-1996.
- [33] Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543-551.
- [34] Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., Hain, T. (2008). Rapid Identification and Typing of *Listeria* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (17), 5402–5407.
- [35] Bernardo, K., Pakulat, N., Macht, M., Krut, O., Seifert, H., Fleer, S., Hüniger, F., Krönke, M. (2002). Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics*, 2(6), 747-753.
- [36] Moura, H., Woolfitt, A. R., Carvalho, M. G., Pavlopoulos, A., Teixeira, L. M., Satten, G. A., Barr, J. R. (2008). MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* isolates. *FEMS immunology med microbiology journal*, 53(3), 333–342.
- [37] Conway, G. C., Smole, S. C., Sarracino, D. A., Arbeit, R. D., Leopold, P. E. (2001). Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(1), 103-112.
- [38] Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., LaSala, P., Kostrzewa, M., Harmsen, D. (2008). Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1946–1954.
- [39] Degand, N., Carbonnelle, E., Dauphin, B., Beretti, J.-L., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Segonds, C., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A. (2008). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3361–3367.

6. VERZEICHNISSE

- [40] Pignone, M., Greth, K. M., Cooper, J., Emerson, D., Tang, J. (2006). Identification of Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 1963–1970.
- [41] Grosse-Herrenthey, A., Maier, T., Gessler, F., Schaumann, R., Böhnel, H., Kostrzewa, M., Krüger, M. (2008). Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe*, 14(4), 242-249.
- [42] Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Müller, E., Horre, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A., Sahl, H.-G. (2009). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(9), 2912–2917.
- [43] Qian, J., Cutler, J. E., Cole, R. B., Cai, Y. (2008). MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(3), 439-449.
- [44] Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D. (2000). Yeast: characteristics and identification. 3rd ed. *Cambridge University Press*, U.K.
- [45] Fuchs, G., Schlegel, H. G. (2007). Allgemeine Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag*. 8. Aufl.
- [46] Müller, G., Weber, H. (1996). Mikrobiologie der Lebensmittel. Grundlagen. ©B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, 8. Aufl.
- [47] Boekhout, T., Robert, V., Phaff, H. J. (2003). Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects. ©B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, 1. Aufl.
- [48] Kreger-van Rij, N. J. W., Veenhuis, M. (1971). A comparative study of the cell wall structure of basidiomycetous and related yeasts. *Journal of General Microbiology*, 68, 87-95.
- [49] Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546, 563-567.
- [50] Boulton, C., Quain, D. (2001). Brewing Yeast & Fermentation. *Blackwell Science Ltd*, UK, 1. Aufl.
- [51] Meaden, P. G. (1996). DNA fingerprinting of Brewer's yeast. *Ferment*, 9, 267–272.
- [52] Lodder, J. (1970). The Yeasts: A taxonomic study. *North-Holland Publishing Company*, Amsterdam, 2. Aufl.
- [53] Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (1998). The yeast, a taxonomic study, 4th ed. *Elsevier*, Amsterdam.
- [54] Vaughan-Martini, A., Martini, A. (1998). Saccharomyces Meyen ex. Reess In: The Yeasts – A Taxonomic Study. *Elsevier*, Amsterdam, 4. Aufl.

6. VERZEICHNISSE

- [55] Montrocher, R., Verner, M. C., Briolay, J., Gautier, C., Marmeisse, R. (1998). Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 295-303.
- [56] Annemüller, G., Manger, H. -J., Lietz, P. (2008). Die Hefe in der Brauerei- Hefemanagement - Kulturhefe / Hefereinzucht - Hefepropagation im Brauprozess. *VLB Berlin*.
- [57] Giudici, P., Caggia, C., Pulvirenti, A., Rainieri, S. (1998). Karyotyping of *Saccharomyces* strains with different temperature profiles. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 811-819.
- [58] Walsh, R. M., Martin, P. A. (1977). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator. *Journal of the Institute of Brewing*, 83(3), 169–172.
- [59] Nout, M.J.R.: Traditional fermented products from Africa, Latin America and Asia. In [47]
- [60] Jählig, A., Schade, W. (1993). Mikrobiologie der Gärungs- und Getränkeindustrie. *CENA-Verlag*, Meckenheim, 1. Aufl.
- [61] Gröser, J., Bruch, F.-C. (1842). Amtlicher Bericht über die 20. Versammlung der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte. *Mainz. Druck 1843*
- [62] De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: A regulatory system in yeast. *Journal of Microbiology*, 44(2), 149-156.
- [63] Gélinas, P. (2014). Fermentation Control in Baker's Yeast Production: Mapping Patents. *Food Science and Food Safety*, 13(6), 1141-1164.
- [64] Reiff, F., Kautzmann, R., Lüers, H., Lindemann, M. (1962). Die Hefen. Band II. Technologie der Hefen. *Verlag Hans Carl*, Nürnberg.
- [65] Marquardt, F. W. (1880). Peptone extract from grain or oilseeds by-products (to be mixed with sugar and aerated); clarified and aerated. Patentnr. DE 6622; DE 9534 (GB 187903706).
- [66] Wohl, A., Scherdel, S. (1915). Deutsches Reichspatent 310580.
- [67] Verein der Spiritusfabrikanten in Deutschland: Deutsches Reichspatent 300662, 303221, 1915.
- [68] Heiss, R. (2004). Lebensmitteltechnologie - Biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung. *Springer-Verlag*, Berlin, 6. Aufl., XXIII, 595.
- [69] Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- [70] Bunke, O., Droge, B., Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics*, 33, 197-240.
- [71] Oura, E., Suomalainen, H. (1987). Biotin and the Metabolism of Baker's Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 84(5), 283–287.
- [72] Danzer, K., Hobert, H., Fischbacher, C., Jagemann, K.-U. (2001). Chemometrik: Grundlagen und Anwendungen. *Springer-Verlag*, Berlin.

6. VERZEICHNISSE

- [73] Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W., Weiber, R. (2000). *Multivariate Analysemethoden : Eine anwendungsorientierte Einführung*. Springer-Verlag, Aufl. 9.
- [74] Kessler, W. (2007). *Multivariate Datenanalyse: für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Aufl. 1.
- [75] McLafferty, F. W., Turecek, F. (1995). *Interpretation von Massenspektren*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 1.
- [76] Meyer, F. (1979). *Cytologie quantitative et morphologie mathématiques*. PhD thesis, Ecole des Mines de Paris.
- [77] Fisher, R., MacKenzie, W. (1923). Studies in crop variation. II. The manurial response of different potato varieties. *Journal of Agricultural Science*, 13, 311-320.
- [78] Savitzky, A., Golay, M. J. E. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8), 1627–1639.
- [79] Montgomery D. C. (2005). *Introduction to statistical quality control*. 5th ed., John Wiley & Sons Inc., USA.
- [80] Pearson, K. (1901). On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*, 2(6), 559-572.
- [81] Hotelling, H. (1933). Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, 24(6), 417-441.
- [82] Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2(1-3), 37–52.
- [83] Wold, H. (1966). Nonlinear estimation by iterative least squares procedures. in: David F., *Research Papers in Statistics*, Wiley, New York, 411-444.
- [84] Wold, H. (1975). Path models with latent variables: The NIPALS approach. In *Quantitative Sociology: International perspectives on mathematical and statistical model building* (Ed.s, Blalock, H. M. et al.). Academic Press, New York, 307-357.
- [85] Wold, S. (1976). Pattern recognition by means of disjoint principal components models. *Pattern Recognition*, 8(3), 127-139.
- [86] Wold, S., Albano, C., Dunn, W. J., Esbensen, K., Hellberg, S., Johansson, E., Sjöström, M. (1983). Pattern recognition: finding and using regularities in multivariate data. In Martens, H., Russwurm, H., *Food research and data analysis*, Appl. Science Publ, London, 147-188.
- [87] Loss D. (2002). Data Mining: Klassifikations- und Clusteringverfahren. *Ausarbeitung im Rahmen des Projektseminars „CRM für Finanzdienstleister“*, 7-14.
- [88] Caprino, S., Acree, T. E., Barbano, D. M., Licitra, G., Siebert, K. J. (2002). Chemometric Analysis of Ragusano Cheese Flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1143-1149.
- [89] Blanco-Gomis, D., Mangas, A. J. J., Margoles, G. I., Arias, A. P. (2002). Characterization of Cider Apples on the Basis of Their Fatty Acid Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1097-1100.

6. VERZEICHNISSE

- [90] Mangas, J. J., Moreno, J., Picinelli, A., Blanco, D. (1998). Characterization of Cider Apple Fruits According to Their Degree of Ripening. A Chemometric Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4174–4178.
- [91] Downey, G., McIntyre, P., Davies, A. N. (2002). Detecting and Quantifying Sunflower Oil Adulteration in Extra Virgin Olive Oils from the Eastern Mediterranean by Visible and Near-Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5520–5525.
- [92] Danzer, K., Hobert, H., Fischbacher, C., Jagemann, K.-U. (2001). Chemometrik: Grundlagen und Anwendungen. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, Aufl. 1.
- [93] Gilliland, R. B. (1951). The flocculation characteristics of brewing yeast during fermentation. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, Brighton, 35 - 55.
- [94] Deak, T. (1993). Simplified techniques for identifying foodborne yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 15-26.
- [95] Kurlanzka, A., Rytka, J., Rozalska, B., Wysocka, M. (1999). Saccharomyces cerevisiae IRR1 protein is indirectly involved in colony formation. *Yeast*, 15, 23-33.
- [96] Praphailong, W., Van Gestel, M., Fleet, G. H., Heard, G. M. (1997). Evaluation of the Biolog system for the identification of food and beverage yeasts. *Applied Microbiology*, 24, 455-459.
- [97] Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-6535.
- [98] Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1351-1371.
- [99] Marsh, T. L. (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current opinion in microbiology*, 2(3), 323–327.
- [100] Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414.
- [101] Mitterdorfer, G., Mayer, H. K., Kneifel, W., Viernstein, H. (2002). Clustering of Saccharomyces boulardii strains within the species S. cerevisiae using molecular typing techniques. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 521–530.
- [102] Vergnaud, G., Denoeud, F. (2000). Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Research*, 10(7), 899–907.
- [103] Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barrès, B., Carlier, J., Tharreau, D., Giraud, T. (2007). Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 933-949.

6. VERZEICHNISSE

- [104] Held, C., Leese, F. (2007). The utility of fast evolving molecular markers for studying speciation in the Antarctic benthos. *Polar Biology*, 30(4), 513-521.
- [105] Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G. F., Lecointre, G., Nguyen, H. V., Gaillardin, C., Dujon, B. (2001). Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 551-559.
- [106] White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press*, New York, USA, 315-322.
- [107] 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(4), 331-371.
- [108] Egger, K.N., Osmond, G., Goodier, J.L. (1995). Sequence and putative secondary structure of group I introns in the nuclear-encoded ribosomal RNA genes of the fungus *Humenoscyphys ericae*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1261, 275-278
- [109] Gardes, M., Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113-118.
- [110] Martin, K. J., Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BioMedCentral Microbiology*, 5, 28.
- [111] Helmut, G., Gremlich. H.-U. (2003). IR-Spektroskopie: Eine Einführung. *Wiley-VCH, Weinheim*, Aufl. 4.
- [112] Timmins, E. M., Quain, D. E., Goodacre, R. (1998). Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Yeast*, 14(10), 885-893.
- [113] Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H. (1991). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*, 351, 81-82.
- [114] Kümmerle, M., Scherer, S., Seiler, H. (1998). Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Applied Environ Microbiology*, 64, 2207-2214.
- [115] Hopkinson, J. H., Newbury, J. E., Spencer, D. M., Spencer, J. E. (1988). Differentiation between some industrially significant yeasts through the use of Fourier Transform-Infrared spectroscopy. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10, 118-123.
- [116] Hutzler, M. (2009). Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen. *Doktorarbeit*, TU-München.
- [117] Guillamon, J.M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 387–392.

6. VERZEICHNISSE

- [118] Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., Vincenzini, M. (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 949-956.
- [119] Wang, C., Liu, Y. (2013). Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. *Food Microbiology*, 33(2), 172-177.
- [120] Agustini, B. C., Silva, L. P., Bloch, C. Jr., Bonfim, T. M. B., da Silva, G. A. (2014). Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. *Applied Microbial Biotechnology*, 98, 5645-5654.
- [121] Pincus, D. H., Orenga, S., Chatellier, S. (2007). Yeast identification – past, present, and future methods. *Medical Mycology*, 45, 97-121.
- [122] Du, Z., Yang, R., Guo, Z., Song, Y., Wang, J. (2002). Identification of *Staphylococcus aureus* and Determination of Its Methicillin Resistance by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(21), 5487–5491.
- [123] Malakhova, M. V., Vereshchagin, V. A., Il'ina, E. N., Govorun, V. M., Filimonova, O., Grudinina, S. A., Sidorenko, S. V. (2007). MALDI-ToF mass-spectrometry in analysis of genetically determined resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones. *Antibiot Khimioter*, 52(1-2), 10–17 (In Russian).
- [124] Marinach, C., Alanio, A., Palous, M., Kwasek, S., Fekkar, A., Brossas, J. Y., Brun, S., Snounou, G., Hennequin, C., Sanglard, D., Datry, A., Golmard, J. L., Mazier, D. (2009). MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics*, 9, 4627–4631.
- [125] Murray P. R. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 1626–1630.
- [126] Burckhardt, I., Zimmermann, S. (2011). Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry To Detect Carbapenem Resistance within 1 to 2.5 Hours. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9), 3321–3324.
- [127] van Veen, S. Q., Claas, E. C., Kuijper, E. J. (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 900-907.
- [128] Stevenson, L. G., Drake, S. K., Murray, P. R. (2010). Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 444-447.
- [129] van Kampen, J. J., Burgers, P. C., de Groot, R., Luiders, T. M. (2006). Qualitative and quantitative analysis of pharmaceutical compounds by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(15), 5403-11.

6. VERZEICHNISSE

- [130] Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbial Biotechnology*, 93(3), 965-74.
- [131] Sherburn, R. E., Jenkins, R. O. (2003). A novel and rapid approach to yeast differentiation using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Spectroscopy*, 17, 31-38.
- [132] Trimpin, S. (2002). Methodische Entwicklung der MALDI-TOF Massenspektrometrie für Grenzbereiche der Makromolekülanalytik. Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [133] Moothoo-Padayachie, A., Kandappa, H. R., Naidu Krishna, S. B., Maier, T., Govender, P. (2013). Biotyping *Saccharomyces cerevisiae* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *European Food Research and Technology*, 236(2), 351-364.
- [134] Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Muller, E., Horre, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A., Sahl, H.-G. (2009). Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(9), 2912–2917.
- [135] Olson, B. H., Johnson, M. J. (1948). Factors producing high yeast yields in synthetic media. *Journal of Bacteriology*, 57, 235-246.
- [136] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem.* Bd. 72, 248-254.
- [137] Boeke, J. D., Xu, H., Fink, G. R. (1988). A general method for the chromosomal amplification of genes in yeast. *Science*, 239(4837), 280–282.
- [138] Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., Dulau, L. (1993). Identification of Yeasts Strains Using the Polymerase Chain Reaction. *J Sci Food Agric*, 62, 89-94.
- [139] Bolbach, G., Riaki, K., Spiro, M., Brunot, A, Breton, F., Blais, J.C. (1993). Influence of target preparation and laser irradiance in matrix-assisted UV laser-desorption of proteins. *Analisis*, 21, 383–387.
- [140] Lin, S. H., Cotter, R. J., Woods, A. S. (1998). *Proteins* (Suppl 2), 12-21.
- [141] Jensen, C., Haebel, S., Andersen, S. O., Roepstorff, P. (1997). Int. J. Mass Spectrom. *Ion Processes*, 160, 339-356.
- [142] Tang, X. D., Dreifuss, P. A., Vertes, A. (1995). New matrices and accelerating voltage effects in matrix-assisted laser-desorption ionization of synthetic-polymers. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 9, 1141-1147.
- [143] Hoberg, A. M., Haddleton, D. M., Derrick, P. J., Jackson, A. T., Scrivens, J. H. (1998). The Effect of Counter Ions in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization of Poly(Methyl Methacrylate). *European Mass Spectrom.*, 4, 435-440.
- [144] Bruker Daltonik GmbH (2012). Bruker Guide to MALDI Sample Preparation – MALDI Preparation Protocols. Revision 2

6. VERZEICHNISSE

- [145] Horneffer, V., Dreisewerd, K., Lüdemann, H. C., Hillenkamp, F., Lage, M., Strupat, K. (1999). Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid 2. *International Journal of Mass Spectrometry*, 185-187, 859-870.
- [146] Gabriel, S. J. (2015). Entmischungsphänomene in lösemittelbasierenden MALDI-TOF MS Probenpräparationen. Dissertation. *BAM*, Band 126.
- [147] Stimson, E., Truong, O., Richter, W. J., Waterfield, M. D., Burlingame, A. L. (1997). Enhancement of charge remote fragmentation in protonated peptides by high-energy CID MALDI-TOF-MS using 'cold' matrices. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 169/170, 231–240.
- [148] Beavis, R. C., Chaudhary, T., Chait, B. T. (1992). α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Org. Mass. Spectrom.*, 27(2), 156-158.
- [149] Beavis, R. C., Chait, B. T., Fales, H. M. (1989). Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 3(12): 432-5.
- [150] Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F. (1991). 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 111, 89-102.
- [151] Back, W. (2008). Mikrobiologie der Lebensmittel: Getränke. ©B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, 3. Aufl., ISBN 978-3-89947-360-5.
- [152] Karas, M., Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60, 2299-2301.
- [153] Schuerenberg, M., Luebbert, C., Eickhoff, H., Kalkum, M., Lehrach, H., Nordhoff, E. (2001). α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Affinity Sample Preparation. A Protocol for MALDI-MS Peptide Analysis in Proteomics, in: *Anal. Chem.*, 73, 434–448.
- [154] Vorm, O., Roepstorff, P., Mann, M. (1994). Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Analytical Chemistry*, 66, 3281-3287.
- [155] Nishikaze, T., Amano, J. (2009). Reverse thin layer method for enhanced ion yield of oligosaccharides in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(23), 3787-3794.
- [156] Gobom, J., Schuerenberg, M., Mueller, M., Theiss, D., Lehrach, H., Nordhoff, E. (2001). Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal. Chem.*, 73(3), 434-8.
- [157] Nierengarten, H., Felder, D., Leize, E., Nierengarten, J.-F., Gisselbrecht, J.-P., Van Dorselaer, A. (2000). in *Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Long Beach, Canada.

6. VERZEICHNISSE

- [158] DE19755960C1 26.11.1998
Verfahren zum Aufschluß von biologischem Material
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE
Erfinder: Müllner, Stefan, Dr., 65239 Hochheim, DE;
Neumann, Thomas, Dr., 65929 Frankfurt, DE
DE-Aktenzeichen19755960
- [159] Pingoud, A. (1997) Arbeitsmethoden der Biochemie. *Walter de Gruyter*, ISBN 978-3-110-16513-5, 53–56.
- [160] Büschelberger, H. G. (1987). Untersuchungen zum mechanischen Aufschluss von Mikroorganismen in Hochdruckhomogenisatoren. Technische Hochschule Fridericiana Karlsruhe, Schnelldruck Ernst Grässer, Karlsruhe
- [161] Fraude-Schulz, U. (2000). Umbau einer Hefereinzuchtanlage. *Bericht vor dem TWA der VLB - FA für Gärung, Lagerung und Abfüllung*, Berlin.
- [162] Deegan, R. D., Bakajin, O., Dupont, T. F., Huber, G., Nagel, S. R., Witten, T. A. (1997). Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops.
- [163] Wold, S., Sjöström, M. (1977). SIMCA: a method for analyzing chemical data in terms of similarity and analogy. *ACS Symposium*, Series 52, 243-282. *Nature*, 389, 827-829.
- [164] Beavis, R.C., Chait, B.T. (1996). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Proteins. *Methods in Enzymology*, 270, Chap. 22, 519-551.
- [165] Cohen, S.L., Chait, B.T. (1996). Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins. *Anal Chem.*, 68, 31.
- [166] Cotter, R. J. (1992). Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. In: *Anal Chem.*, 64, 21, 1027A-1039A.
- [167] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8), 151–153.
- [168] O'Connor, P. B., Hillenkamp, F. (2007). MALDI Mass Spectrometry Instrumentation. In: MALDI MS - A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim.
- [169] Gross, J. H. (2004). Mass Spectrometry - A Textbook. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [170] Zenobi, R., Knochenmuss, R. (1998). Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 17, 337 - 366.
- [171] Mamyrin, B. A. (1994). Laser-Assisted Reflectron Time-Of-Flight Mass-Spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 131, 1 - 19.
- [172] Ryzhov, V., Fenselau, C. (2001). Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. In: *Anal Chem.*, 73, 4, 746-750.

6. VERZEICHNISSE

- [173] Burak, S., Gehrt, A. (2010). Verkürzte Analysenzeit bei höherer Genauigkeit. In: Wiener klinisches Magazin. 6/2010, 22-26.
- [174] Usbeck, J.C., Kern, C., Vogel, R.F. und Behr, J. (2013). Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted- Laser-Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI–TOF MS) in response to varying growth conditions. *Food Microbiol*, 36(2), 379-87.
- [175] Pavlovic, M., Mewes, A., Maggipinto, M., Schmidt, W., Messelhäuser, U., Balsliemke, J., Hörmansdorfer, S., Busch, U. und Huber, I. (2014). MALDI-TOF MS based identification of food-borne yeast isolates. *J Microbiol Meth*, 106, 123-28.
- [176] Kretzschmar, H. (1955). Hefe und Alkohol sowie andere Gärungsprodukte. *Springer-Verlag*, 1ed, 161.
- [177] Schleifer, K. H., Kandler, O. (1967). *Arch. Mikrobiol.*, 61, 292.
- [178] Richter, Gerhard (2003). Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, 26 ff.
- [179] Schubert, S., Wieser, A. (2010). Molekulare Speziesdifferenzierung - MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. In: *BIOspektrum*, 16, 07.10, 760-762.
- [180] Röder, C (2007). Entwicklung von molekularen Sonden für die sichere Identifizierung von Hefen der Gattung *Brettanomyces*, *Dekkera*. *Doktorarbeit*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- [181] „Entwicklung eines Präparationskits in Kombination eines innovativen Verfahrens zur Hefecharakterisierung mit Hilfe der MALDI-TOF-MS zur Sicherstellung optimaler Produktionsabläufe in Betrieben der Brau- und Backhefeindustrie“ (KF2132320 SK1).
- [182] Pramateftaki, P. V., Lanaridis, P., Typas, M. A. (2000). Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J Appl Microbiol*, 89(2), 236-48.
- [183] Andrade, M. J., Rodriguez, M., Sanchez, B., Aranda, E., Cordoba, J. J. (2006). DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 107(1), 48–58.
- [184] Baleiras Couto, M. M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J. H. J., van der Vossen, J. M. B. M. (1996). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(1), 41–46.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Spektrum der β -D-Galactosidase; Matrix Nikotinsäure; 100 Laserschüsse [8, 15, 16].....	3
Abbildung 2-2: Schematischer Ablauf der MALDI-TOF-MS.....	4
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung eines linearen TOF-Analysator; Ionen mit größerer molekularer Masse (m_1) benötigen eine längere Zeit zum Durchqueren der feldfreien Driftstrecke als Kleinere (m_3).....	7
Abbildung 2-4: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-MS mit Reflektor; zwei Ionen (m_1 , m_2) mit gleicher Masse, aber unterschiedlicher kinetischer Energie (E_{kin}) werden durch den Reflektor auf den Detektor fokussiert.....	7
Abbildung 2-5: Taxonomische Einteilung der Mikroorganismen und Nomenklatur der Pilze (nach [46]).....	9
Abbildung 2-6: Redoxsystem Glutathion.....	19
Abbildung 2-7: N Objekte im zweidimensionalen $x_1 \times x_2$ -Raum, Gerade (rot) zeigt in Richtung maximaler Varianz und weist eine gute Trennung der beiden Gruppen auf (nach [74])	22
Abbildung 2-8: Bildung des neuen Koordinatensystems	23
Abbildung 2-9: Schematischer Ablauf einer SIMCA-Klassifizierung	25
Abbildung 2-10: SIMCA-Klassifizierung: Trainingsdatensätze A und B mit ihren Datenmittelpunkten x ; Modelle werden durch eine Kreislinie (B) bzw. eine Gerade (A) begrenzt.....	26
Abbildung 2-11: Schematische Darstellung der rRNA-Gene und der ITS- und IGS-Regionen bei Pilzen; ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 White et al. [106]; ITS8mun, ITS9mun, ITS10mun K. N. Egger [108];.....	28
Abbildung 3-1: Schematischer Verlauf der Probenpräparation.....	43
Abbildung 3-2: Hexagonales Abtastmuster (weiß nach rot) auf Target MTP 384 polierter Stahl mit extrahierter Proteinprobe und HCCA-Matrix	45
Abbildung 4-1: Strukturen der Matrices a) HCCA, b) SA, c) DHB.....	51
Abbildung 4-2: Unterschiedliche Matrices auf poliertem Stahltarget; Mikroskop (600 fach)	52
Abbildung 4-3: HCCA-Matrix auf geschliffenem Stahltarget mit unterschiedlichen Lösungsmittelkonzentrationen; Mikroskop (600 fach).....	53
Abbildung 4-4: Kristallisationsverhalten der unterschiedlichen Matrices auf poliertem Stahltarget	56

6. VERZEICHNISSE

Abbildung 4-5: Kristallisationsverhalten von HCCA und Sinapinsäure auf geschliffenem Stahltarget, Mikroskop (600 fach).....	57
Abbildung 4-6: MS-Spektrum (Protein-Fingerprint) der Hefe <i>S. cerevisiae</i> 2.200 a) dried droplet b) single layer, c) reverse thin layer	58
Abbildung 4-7: a) Massenspektrum des untergärigen Hefestammes ug3; b) Targetspot: Aufarbeitung mit der Direkt-Transfermethode	62
Abbildung 4-8: Massenspektren von <i>S. cerevisiae</i> 2.200 nach Proteinfällung mit TCA– Konzentrationen von oben nach unten 5 % (schwarz), 10 % (rot), 20 % (blau)	63
Abbildung 4-9: Protein-Fingerprint der Hefe <i>S. cerevisiae</i> 2.045 mit reverse thin layer Verfahren.....	65
Abbildung 4-10: <i>S. cerevisiae</i> 2.200: 1.) Phasenkontrast 2; Probe 1; gute Darstellung der Zellwände, Zellen sind weitgehend intakt; 2.) Phasenkontrast 1; Probe 2; Aggregation der Zellen erkennbar; 3.) Phasenkontrast 2; Probe 3 Aggregation der Zellen; 4.) Phasenkontrast 1; Probe 4; Zellwände sind deformiert und permeabel.....	68
Abbildung 4-11: A) 2,5 mg HCCA (Fluka) OS: 350 µL ACN + 15 µL TFA + 635 µL Wasser auf PS; B) 2,5 mg HCCA (Fluka) OS: 650 µL ACN + 15 µL TFA + 335 µL Wasser auf PS; C) OS: 750 µL ACN + 15 µL TFA + 235 µL Wasser auf PS; D) OS: 985 µL ACN + 15 µL TFA auf GS	70
Abbildung 4-12: Vergleich unterschiedlicher HCCA Matrixkonzentrationen; A) 1,5 mg HCCA in 700 µL ACN/ 15 TFA/ 285 µL Wasser (OS III); B) 4,5 mg HCCA in OS III; C) 6,5 mg HCCA in OS III.....	72
Abbildung 4-13: MS-Spektren a) der untergärigen Brauhefe ug1 und b) der obergärigen Backhefe <i>S. cerevisiae</i> 2.200 mit Matrixlösung 2,7 mg HCCA + OS III	73
Abbildung 4-14: Wachstumsverlauf von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämmen im chemisch definierten Medium. Die Schüttelkolben wurden zum Zeitpunkt t=0 mit einer definierten Zellzahl von 1×10^6 Zellen/mL der jeweiligen Vorkultur angeimpft. Die Probennahme wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt und die Zellzahlen mittels Nucleocounter ermittelt.	75
Abbildung 4-15: Wachstumsverlauf von <i>S. pastorianus</i> (<i>ssp. S. carlsbergensis</i>) Stämmen, <i>S. Fremdhefen</i> und Nicht- <i>S.-Fremdhefen</i> im chemisch definierten Medium. Die Schüttelkolben wurden zum Zeitpunkt t=0 mit einer definierten Zellzahl von 1×10^6 Zellen/mL der jeweiligen Vorkultur angeimpft. Die Probennahme wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt und die Zellzahlen mittels Nucleocounter ermittelt.....	76

6. VERZEICHNISSE

Abbildung 4-16: Wachstumsverlauf von <i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>) Stämmen, <i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> und <i>Pichia membranifaciens</i> im Yeast extract Dextrose Medium. Die Schüttelkolben wurden zum Zeitpunkt t=0 mit einer definierten Zellzahl von 10^6 Zellen/mL der jeweiligen Vorkultur angeimpft. Die Probennahme wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt und die Zellzahlen mittels Nucleocounter ermittelt.....	76
Abbildung 4-17: Wachstumsverlauf von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämmen im Komplexmedium Yeast extract Peptone Dextrose Medium. Die Schüttelkolben wurden zum Zeitpunkt t=0 mit einer definierten Zellzahl von 10^6 Zellen/mL der jeweiligen Vorkultur angeimpft. Die Probennahme wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt und die Zellzahlen mittels Nucleocounter ermittelt.	77
Abbildung 4-18: Wachstumsverlauf von <i>S. carlsbergensis</i> ug1 (links) und <i>S. cerevisiae</i> 2.200 (rechts)	73
Abbildung 4-19: Score-Plot der untergärigen Reinzuchtheife <i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>) ug1 im SD-Medium gewachsen (49 h) 10^8 Zellen/mL; jeder Punkt entspricht einem aufsummierten Massenspektrum; dargestellt sind die ersten zwei Hauptkomponenten (PC1-2), die zusammen 70 % der Gesamtvarianz erklären	84
Abbildung 4-20: Score-Plot der obergärigen Reinzuchtheife <i>S. cerevisiae</i> 2.200 in SD-Medium gewachsen (48 h) 10^8	85
Abbildung 4-21: Score-Plot der untergärigen Reinzuchtheife <i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>) ug1 in SD-Medium gewachsen (HK 7 h - 25 h) 10^8 Zellen/mL	87
Abbildung 4-22: Score-Plot für PC-3 und PC-4 der untergärigen Reinzuchtheife <i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>) ug1 in SD-Medium gewachsen (HK 7 h - 25 h) 10^8 Zellen/mL	88
Abbildung 4-23: Loadingsplot für PC-1 der mittels MALDI-TOF-MS ermittelten MS-Daten der untergärigen Reinzuchtheife <i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>) ug1 in SD-Medium gewachsen (HK 7 h - 25 h) 10^8 Zellen/mL	88
Abbildung 4-24: Loadingsplot für PC-2 der mittels MALDI-TOF-MS ermittelten MS-Daten der untergärigen Reinzuchtheife <i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>) ug1 in SD-Medium gewachsen (HK 7 h - 25 h) 10^8 Zellen/mL	89
Abbildung 4-25: Loadingsplot für PC-3 der mittels MALDI-TOF-MS ermittelten MS-Daten der untergärigen Reinzuchtheife <i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>) ug1 in SD-Medium gewachsen (HK 7 h - 25 h) 10^8 Zellen/mL	90

6. VERZEICHNISSE

Abbildung 4-26: Erklärte Varianz der X-Variablen; Kalibrierung (blau), Validierung (rot).....	91
Abbildung 4-27: Influence Plot des Hefestammes ug1	92
Abbildung 4-28: Score-Plot für PC-1 und PC-2 der untergärigen Reinzuchtheffe <i>S. pastorianus</i> (ssp. <i>S. carlsbergensis</i>) ug1 in YED-Medium gewachsen (HK 12 h - 25 h)	94
Abbildung 4-29: Erklärte Varianz der X-Variablen; Kalibrierung (blau), Validierung (rot).....	95
Abbildung 4-30: Coomans`Plot: Zuordnung der Testdaten des Brauhefestammes ug1 (grün) zu den Kalibrier-Modellen 2.068 (rot) und ug1 (blau).....	100
Abbildung 4-31: Coomans`Plot: Zuordnung der Testdaten des Brauhefestammes ug1 (grün) zu den Kalibrier-Modellen 2.068 (rot) und 2.152 (blau).....	101
Abbildung 4-32: Modellabstand des Kalibriermodells der Nicht- <i>Saccharomyces</i> - Fremdhefe NSF-P1 gegen sich selbst und den Kalibriermodeellen der unterschiedlichen Hefestämme, gewachsen im SD-Medium (schwarz) oder YED- bzw. YEPD-Medium (grau).....	102
Abbildung 4-33: Ergebnisse der Etablierung der sechs <i>S. cerevisiae</i> Stämme gewachsen im SD-Medium.....	103
Abbildung 4-34: Ergebnisse der Etablierung der fünf <i>S. pastorianus</i> Stämme gewachsen im SD-Medium.....	104
Abbildung 4-35: Ergebnisse der Etablierung von <i>S. diastaticus</i> SF-d1 und Nicht-S.- Fremdhefe NSF-P1 gewachsen im SD-Medium.....	105
Abbildung 4-36: Ergebnisse der Etablierung der sechs <i>S. cerevisiae</i> Stämme gewachsen im YEPD-Medium.....	107
Abbildung 4-37: Ergebnisse der Etablierung der fünf <i>S. pastorianus</i> Stämme gewachsen im YED-Medium	108
Abbildung 4-38: Ergebnisse der Etablierung von der Nicht-S.-Fremdhefe NSF-P1 gewachsen im YED-Medium	109
Abbildung 4-39: Zuordnung der Testspektren auf Art-Ebene zu den Hefearten <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>S. diastaticus</i> und <i>Pichia membranifaciens</i> gewachsen im SD-, YED- oder YEPD-Medium.....	111
Abbildung 4-40: Ergebnisse der Zuordnung der Validierungsdaten der sechs <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> Stämme gewachsen im SD-Medium	113

6. VERZEICHNISSE

Abbildung 4-41: Ergebnisse der Zuordnung der Validierungsdaten der sechs <i>S. cerevisiae</i> Stämme gewachsen im YEPD-Medium.....	113
Abbildung 4-42: Ergebnisse der Zuordnung der Validierungsdaten der fünf <i>S. pastorianus</i> Stämme gewachsen im SD-Medium.....	114
Abbildung 4-43: Ergebnisse der Zuordnung der Validierungsdaten der fünf <i>S. pastorianus</i> Stämme gewachsen im YED-Medium	115
Abbildung 4-44: Ergebnisse der Zuordnung der Validierungsdaten der Stämme <i>S. diastaticus</i> und <i>Pichia membranifaciens</i> gewachsen im SD- und YED-Medium.....	116
Abbildung 4-45: Zuordnung der Validierungsdaten auf Art-Ebene zu den Hefearten <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>S. diastaticus</i> und <i>Pichia membranifaciens</i> gewachsen im SD-, YED- oder YEPD-Medium.....	117
Abbildung 4-46: Chromosomale Anordnung der rRNA-Gene mit den dazwischen liegenden ITS1-.....	118
Abbildung 4-47: Sequenzvergleich (ITS1) von <i>S. cerevisiae</i> 2.200 (violetter Rahmen), <i>S. pastorianus</i> ug3 und ug2 (roter Rahmen), Nicht-Saccharomyces-Fremdhefe (grüner Rahmen) mittels BioEdit Sequence Alignment Editor [181].....	119
Abbildung 4-48: Sequenzvergleich (ITS4) von <i>S. pastorianus</i> ug2, ug1 und ug3 (roter Rahmen) mittels BioEdit Sequence Alignment Editor [181].....	119
Abbildung 4-49: Fragmentprofil der δ -PCR der untersuchten <i>S. cerevisiae</i> Stämme: Spur 2 = 2.119; Spur 3 = 2.045; Spur 4 = 2.129; Spur 5 = 2.068, Spur 6 = 2.200; Spur 1 M = Größenmarker bp-Leiter.....	120
Abbildung 4-50: Fragmentprofil der δ -PCR der <i>S. pastorianus</i> (<i>ssp. S. carlsbergensis</i>) Stämme: Spur 2 = ug1; Spur 3 = ug6; Spur 4 = ug7; Spur 5 = ug3; Spur 6 = ug2; Spur 1 M = Größenmarker bp-Leiter.....	121
Abbildung 4-51: Pilotanlage der VH-Berlin mit vier Fermentern	123
Abbildung 4-52: Veränderung des Protein-Fingerprints des Hefestammes <i>S. cerevisiae</i> 2.200 während der Fermentation (16 h Stellhefe 2.200; 48 h Versandhefe 2.200)	125
Abbildung 4-53: PCA Score-Plot der 2.200-Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell- (schwarz) und Versandhefe (grau)	126
Abbildung 4-54: PCA Score-Plot der 2.068 – Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell- (schwarz) und Versandhefe (grau)	127
Abbildung 4-55: PCA Score-Plot der 2.045 – Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell (schwarz)- und Versandhefe (grau)	127

6. VERZEICHNISSE

Abbildung 4-56: PCA Score-Plot der 2.119 – Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell- (schwarz) und Versandhefe (grau)	128
Abbildung 4-57: PCA Score-Plot der 2.129 – Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell- (schwarz)- und Versandhefe (grau)	128
Abbildung 4-58: PCA Score-Plot der 2.152 – Gruppierung nach Fermentationsprozessschritt Stell- (schwarz) und Versandhefe (grau)	128
Abbildung 4-59: Modellabstand des Kalibriermodells der Stellhefe <i>S. cerevisiae</i> 2.045 gegen sich selbst und den Kalibriermodellen der unterschiedlichen Stellhefen 2.068, 2.119, 2.152 und 2.200	129
Abbildung 4-60: Ergebnisse der Zuordnung von Testdaten zu den Kalibriermodellen der sechs Stellhefen <i>S. cerevisiae</i> 2.045 bis 2.200	131
Abbildung 4-61: Ergebnisse der Zuordnung von Testdaten zu den Kalibriermodellen der sechs Versandhefen <i>S. cerevisiae</i> 2.045 bis 2.200	131
Abbildung 4-62: Ergebnisse der Zuordnung von <i>S. cerevisiae</i> F1 zu den Kalibriermodellen der sechs Stell- und Versandhefen <i>S. cerevisiae</i> 2.045 bis 2.200 ..	132
Abbildung 4-63: Score-Plot der A-Hefe; Differenzierung der Führungen 1 (blau), 3 (rot), 4 (rosa) und 5 (grün).....	135
Abbildung 4-64: Score-Plot der B-Hefe ; Differenzierung der Führungen 1 (blau), 2 (rot), 3 (grün), 4 (schwarz)	136
Abbildung 7-1: 2.045.....	166
Abbildung 7-2:	
2.068.....	1656
Abbildung 7-3: 2.119.....	166
Abbildung 7-4:	
2.129.....	1656
Abbildung 7-5: 2.152	167
Abbildung 7-6: ug2.....	167
Abbildung 7-7: ug3.....	167
Abbildung 7-8: ug6.....	168
Abbildung 7-9:	
ug7.....	1678
Abbildung 7-10: NSF-P1.....	168
Abbildung 7-11: SF-	
d1.....	1678

6. VERZEICHNISSE

Abbildung 7-12: 2.045.....	169
Abbildung 7-13: 2.068.....	169
Abbildung 7-14: 2.119.....	169
Abbildung 7-15: 2.129.....	169
Abbildung 7-16: 2.152.....	170
Abbildung	7-17:
2.200.....	16970
Abbildung 7-18: ug2.....	170
Abbildung	7-19:
ug3.....	16970
Abbildung 7-20: ug6.....	171
Abbildung 7-21: ug7.....	171
Abbildung 7-22: <i>Pichia membranifaciens</i>	171

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Arten der Gattung <i>Saccharomyces</i> (nach [53, 54]).....	10
Tabelle 2-2: Gegenüberstellung der vier verschiedenen <i>Saccharomyces</i> Arten [50]....	11
Tabelle 2-3: Unterscheidung von unter- und obergärigen Hefen (nach [56]).....	12
Tabelle 2-4: Zusammensetzung der Hefetrockensubstanz (% HTS) von <i>Saccharomyces</i> -Hefen (nach [56])	18
Tabelle 3-1: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen.....	34
Tabelle 3-2: Rohstoffe für Hefepropagation	35
Tabelle 3-3: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	35
Tabelle 3-4: Kalibrierstandards	356
Tabelle 3-5: Verwendete Hefestämme	356
Tabelle 3-6: Zusammensetzung des SD-Mediums	357
Tabelle 3-7: Verwendete Forward und Reverse Pimer	47
Tabelle 4-1: Auflistung unterschiedlicher analytischer Methoden zur Untersuchung von Bakterien und klinischen Hefen mittels MALDI-TOF-MS zum Forschungsbeginn	50
Tabelle 4-2: Auflistung unterschiedlicher analytischer Methoden zur Untersuchung von Bakterien und klinischer Hefen mittels MALDI-TOF-MS im Forschungsverlauf.....	51
Tabelle 4-3: Matrices für die Untersuchung von Hefeproteinen	52
Tabelle 4-4: Verwendete Matrices und deren Auftragechniken	55

6. VERZEICHNISSE

Tabelle 4-5: Zellzahlbestimmung (OD ₆₀₀) von <i>S. pastorianus</i> ug1 und <i>S. cerevisiae</i> 2.045	64
Tabelle 4-6: Zwischenschritte der Proteinextraktion	67
Tabelle 4-7: Zusammensetzung der Matrixlösung	69
Tabelle 4-8: Relative Standardabweichung der untersuchten Wachstumsphasen der 13 Hefestämme	78
Tabelle 4-9: Anzahl der Kalibrierdaten bzw. -spektren der untersuchten Hefestämme im SD-Medium.....	83
Tabelle 4-10: Anzahl an PCs der untersuchten Hefestämme im SD-Medium	93
Tabelle 4-11: Anzahl der Kalibrierdaten bzw. -Spektren der untersuchten Hefestämme im YED- und YEPD-Medium.....	94
Tabelle 4-12: Anzahl an PCs der untersuchten Hefestämme im YED- bzw. YEPD-Medium.....	96
Tabelle 4-13: Anzahl an Kalibrierspektren der verschiedenen Hefearten <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>S. diastaticus</i> und <i>Pichia membranifaciens</i>	98
Tabelle 4-14: Anzahl der verwendeten Kalibrierspektren (Summenspektren)	99
Tabelle 4-15: Anzahl der Testspektren und deren Zuordnung zu den verschiedenen Hefestamm-Modellen (SD-Medium)	106
Tabelle 4-16: Anzahl der Testspektren und deren Zuordnung zu den verschiedenen Hefestamm-Modellen (YED/YEPD-Medium)	110
Tabelle 4-17: Ergebniszusammenfassung der Validierung	112
Tabelle 4-18: Verwendete Forward und Reverse Primer	119
Tabelle 4-19: Auswahl und Anzahl der Backhefestämme.....	124
Tabelle 4-20: Modellabstände der Kalibriermodelle der sechs Stellhefen	130
Tabelle 4-21: Modellabstände der Kalibriermodelle der sechs Versandhefen	130
Tabelle 4-22: Übersicht der Hefeernte von <i>S. pastorianus</i> (<i>ssp. carlsbergensis</i>) A und B	134
Tabelle 7-1: Kalibrierpunkte des Bakterienstandards mit einer Massentoleranz von ±500 ppm (nach [119])	164

7. Anhang

7.1 Durchführung der MALDI-TOF-Massenkalibrierung

Kalibrierstandard:	Bruker Bacterial Test Standard (BTS)
Artikelnummer:	255343
Proteine:	siehe Tabelle 7-
Peak Assignment Tolerance:	500 ppm
Mode:	quadratic

Hierfür wurde das Pellet mit 50 µL der Standardlösung (Acetonitril 50 %, Wasser 47,5 %, Trifluoressigsäure 2,5 %) gelöst und bei Raumtemperatur gemischt. Anschließend wurde die Lösung bei 13000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand in jeweils 5 µL Aliquoten in 0,5 mL Reaktionsgefäßen überführt. Für die Targetpräparation wurden je 1 µL des hergestellten Standards auf die Platte aufgetragen und bei Raumtemperatur kurz getrocknet. Anschließend wurde der Spot mit 1 µL der HCCA-Matrix (siehe 3.7.1) überschichtet und ebenfalls bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Kalibrierung erfolgte mit der Bruker Software im linearen positiven Modus. In der Tabelle 3-8 sind die Massen des Kalibrierstandards mit dessen Toleranzbereich dargestellt. Die gemessenen Proteine wurden mit den vorgegebenen Referenzdaten verglichen und wenn nötig korrigiert. Die Toleranz der Peakerkennung lag bei ±500 ppm.

Tabelle 7-1: Kalibrierpunkte des Bakterienstandards mit einer Massentoleranz von ±500 ppm (nach [119])

Protein	Referenzmasse	± 500 ppm Toleranzbereich
RL29[M+2H] ²⁺	3637,8 Da	3636,7 – 3638,8 Da
RS32[M+H] ⁺	5096,8 Da	5095,3 – 5098,3 Da
RS34[M+H] ⁺	5381,4 Da	5379,8 – 5383,0 Da
RS33meth[M+H] ⁺	6255,4 Da	6253,5 – 6257,3 Da
RL29[M+H] ⁺	7274,5 Da	7272,3 – 7276,7 Da
RS19[M+H] ⁺	10300,1 Da	10297,0 – 10303,2 Da
RNAse[M+H] ⁺	13683,2 Da	13679,1 – 13687,3 Da
Myoglobin[M+H] ⁺	16952,3 Da	16947,2 – 16957,4 Da

7.2 Reinigung Stahltarget

Ein fusselfreies Zellstofftuch wird in 2-Propanol getränkt und anschließend der Proben bzw. Matrixspot damit vorsichtig gereinigt. Anschließend wird das Target unter fließendem Wasser abgespült. Danach wird das Target für 10 Minuten in ein Edelstahlgefäß gelegt und mit 2-Propanol gefühlt. Die Platte muss vollständig mit

Propanol bedeckt sein. Nach den 10 Minuten wird die Platte mit Reinstwasser gespült und mit EtOH_{reinst} abgewischt.

7.3 Geräteeinstellungen am MALDI-TOF MS

Type:		Bruker autoflex speed™ LRF MALDI-TOF, Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Serial number:		264320.00323
Vacuum:		
Temperature:		23 °C
High Voltage:	Ion source 1	20.00 kV
	Ion source 2	17.50 kV
Polarity:		positive
Lens:		8.50 kV
Laser:		smartbeam™-II laser, Nd/YAG Laser 355 nm, 1 kHz
	Frequency	1 kHz
	Attenuator	Offset: 42% Range 40 %
	Focus	Offset: 0 % Range 100 % Value 68 %
	Pulsed Ion Extraction	200 ns
	Number of shots	500
Detector:	Mass Range	2000-20000 Da (Medium Range)
	Detector Gain	linear 4,1 x 2500 V
	Electronic Gain	enhanced 50,8 mV
	Sample Rate	0,25 GS/s
	Matrix suppression	off
	Realtime Smooth	off
Digitizer:	Typ	Acqiris U1084A
	Temperatur	36 °C
	Trigger Level	1000 mV
	Digital Offset	127 cnt (linear)
	Analog Offset	50.8 mV
	Sensitivity	100 mV/full scale

7.4 FlexControl 3.3.108 AutoXecute-Methodenparameter

Laser:	Fuzzy Control	MS/Parent mode 2.00 weight
	Initial Laser	from Laser Attenuator
	Matrix Blaster	6 shots with 40 % laser power
Evaluation:	Peak Selection	2000-20000 Da
	Smoothing	off
	Baseline Subtraction	off
	Peak Resolution	> 400
Accumulation:	Sum up	1000 in 100 shot steps
	Satisfactory shots	200
Movement:	Measuring raster	hexagon

7.5 Score-Plots SD-Medium

der Hefestämme 2.045, 2.068, 2.119, 2.129, 2.152 und ug2, ug3, ug6, ug7 und NSF-P1, SF-d1 gewachsen im SD-Medium

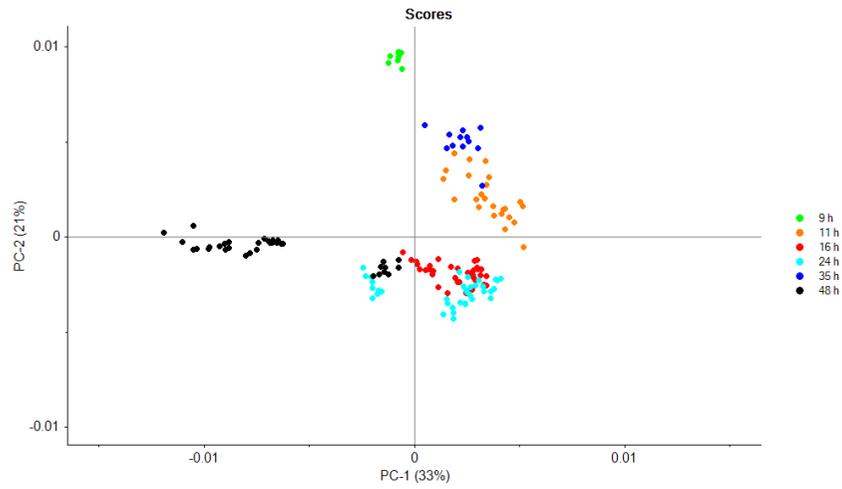


Abbildung 7-1: 2.045

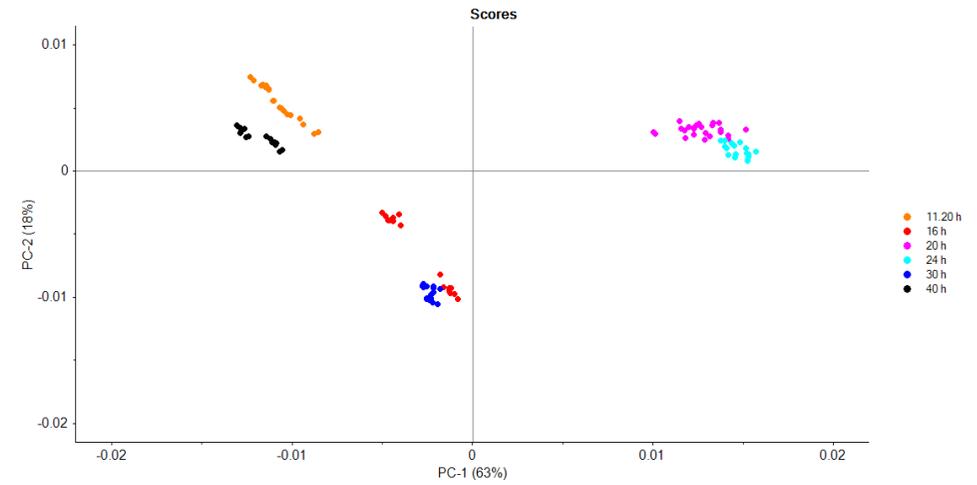


Abbildung 7-2: 2.068

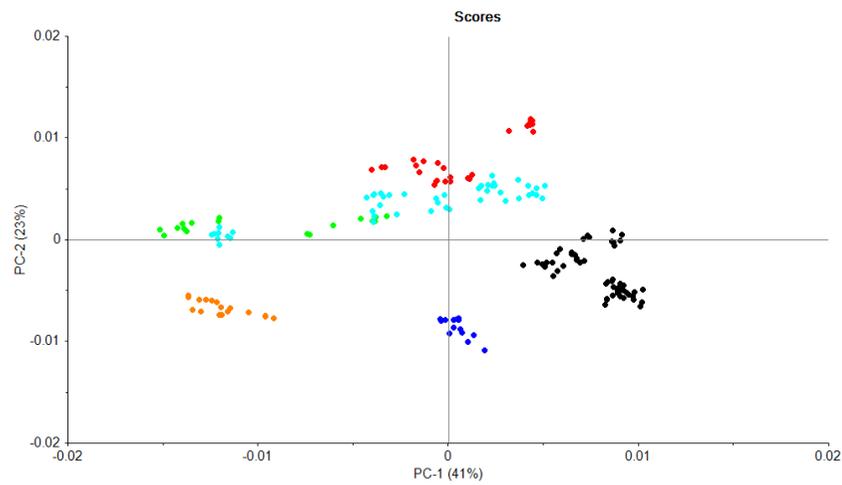


Abbildung 7-3: 2.119

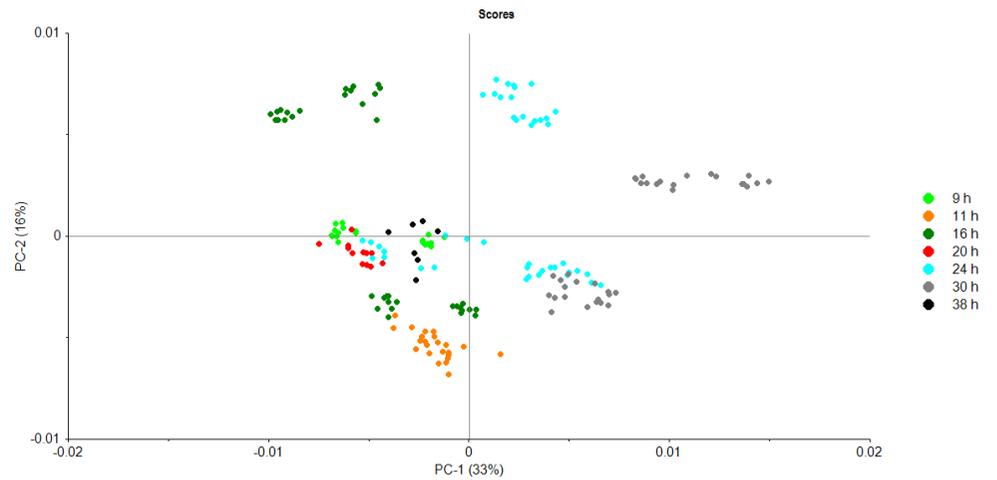


Abbildung 7-4: 2.129

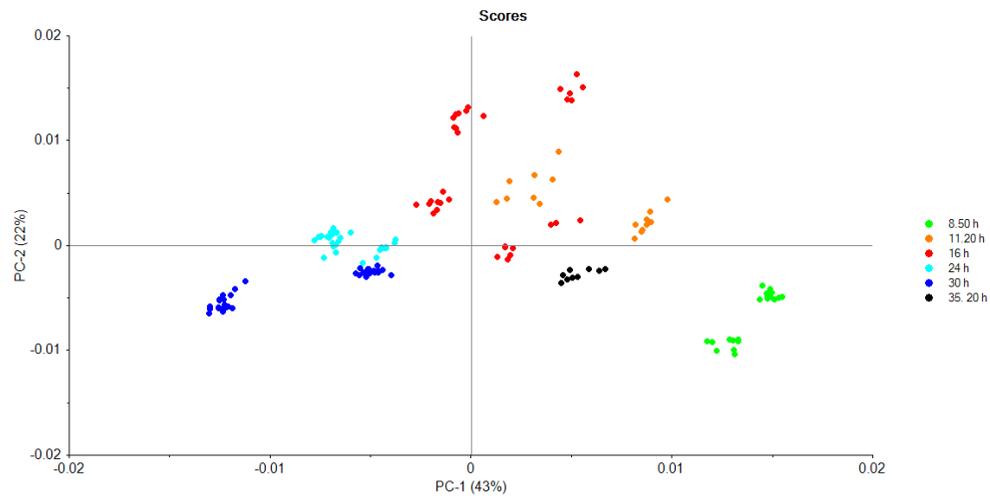


Abbildung 7-5: 2.152

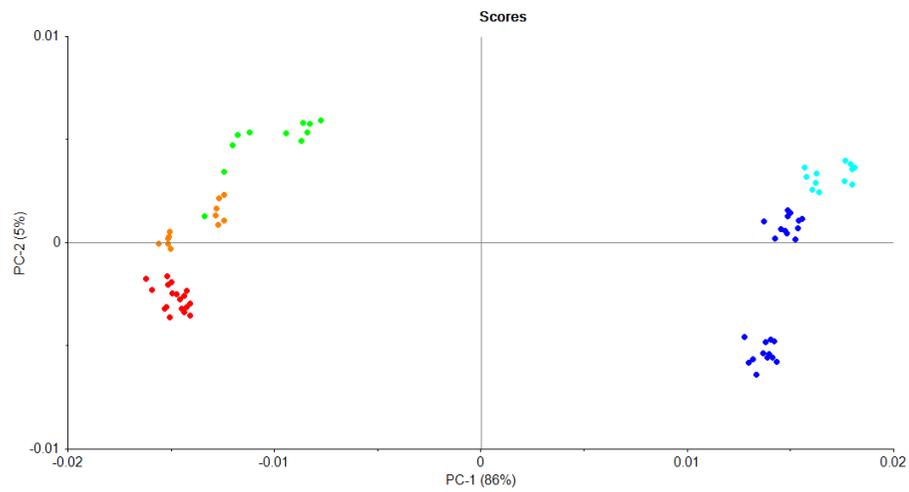


Abbildung 7-6: ug2

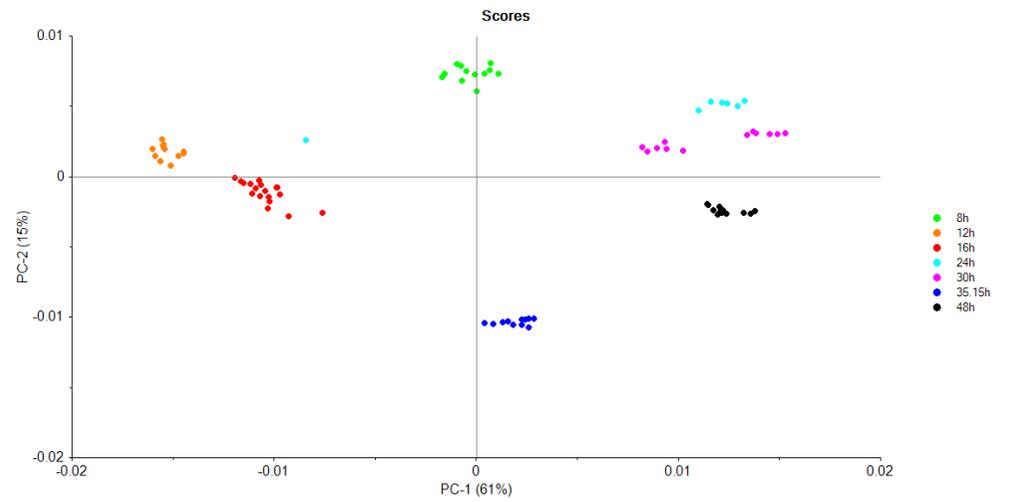


Abbildung 7-7: ug3

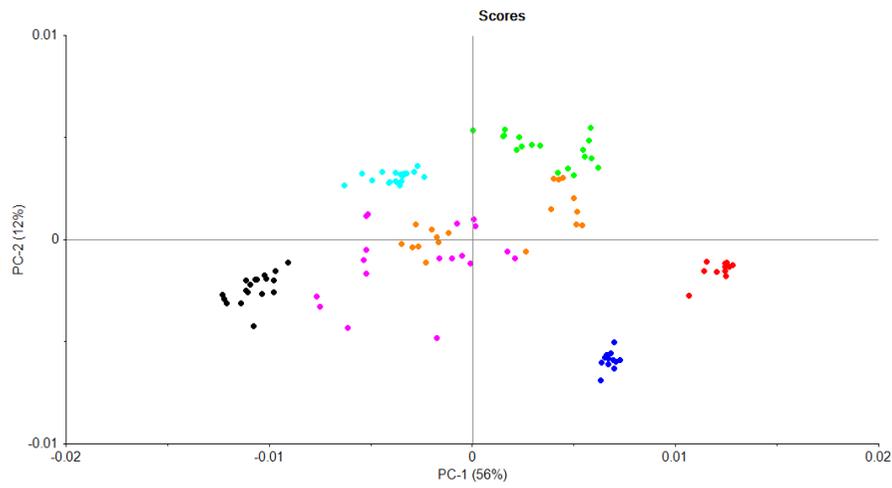


Abbildung 7-8: ug6

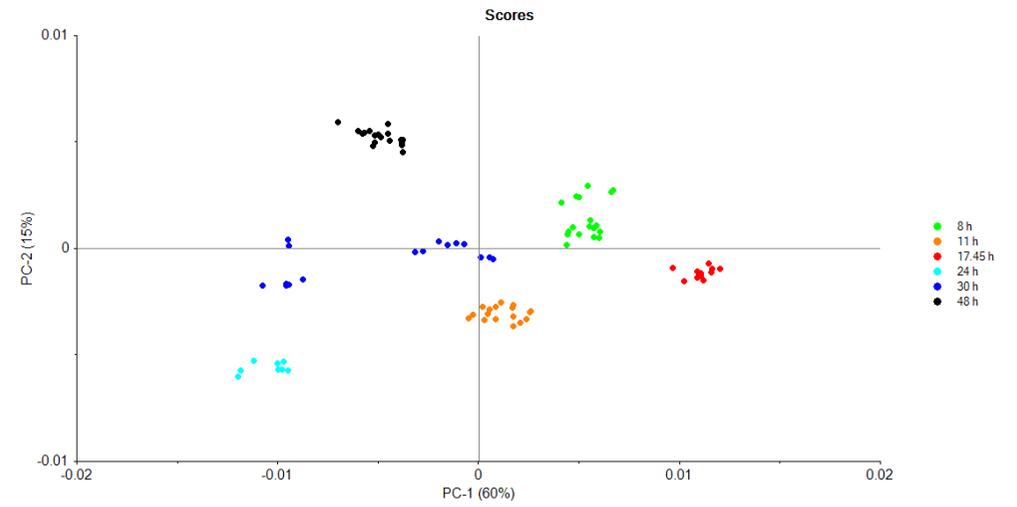


Abbildung 7-9: ug7

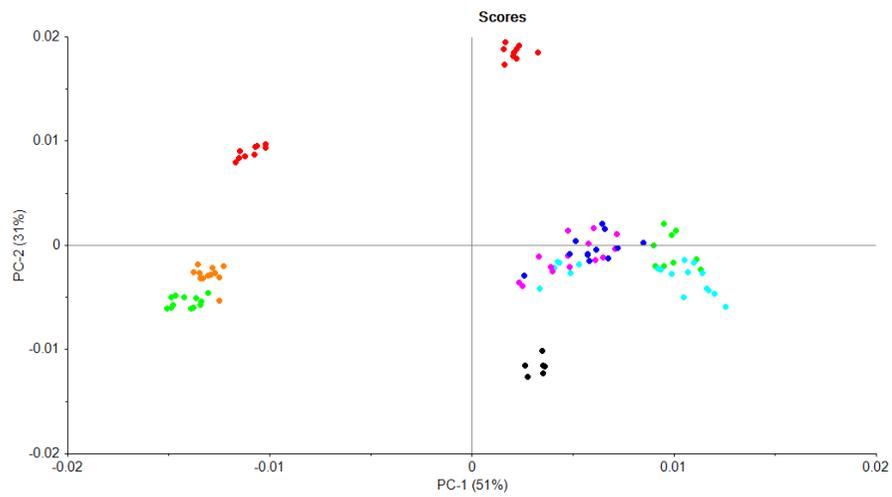


Abbildung 7-10: NSF-P1

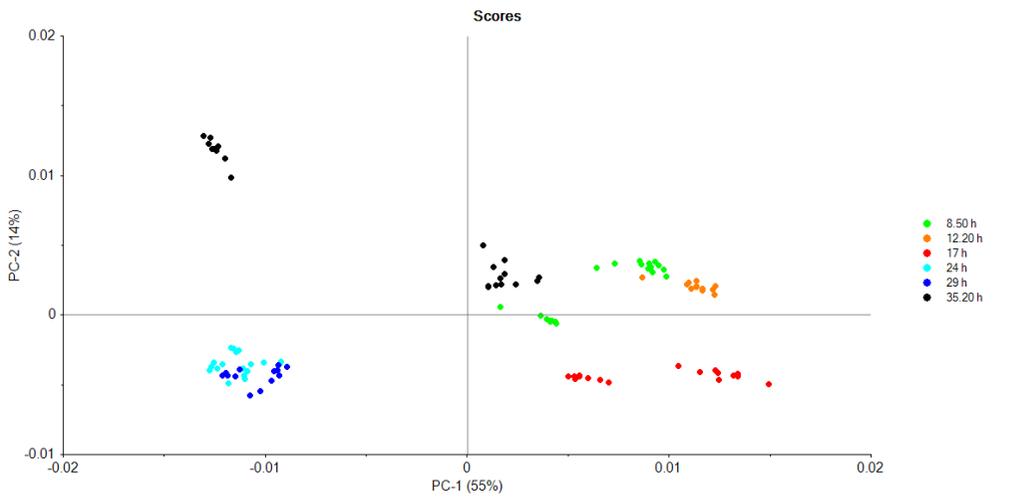


Abbildung 7-11: SF-d1

7.6 Score Plots YED und YEPD-Medium

der Hefestämme 2.045, 2.068, 2.119, 2.129, 2.152 und ug2, ug3, ug6, ug7 und NSF-P1, SF-d1 gewachsen im YED/YEPD-Medium

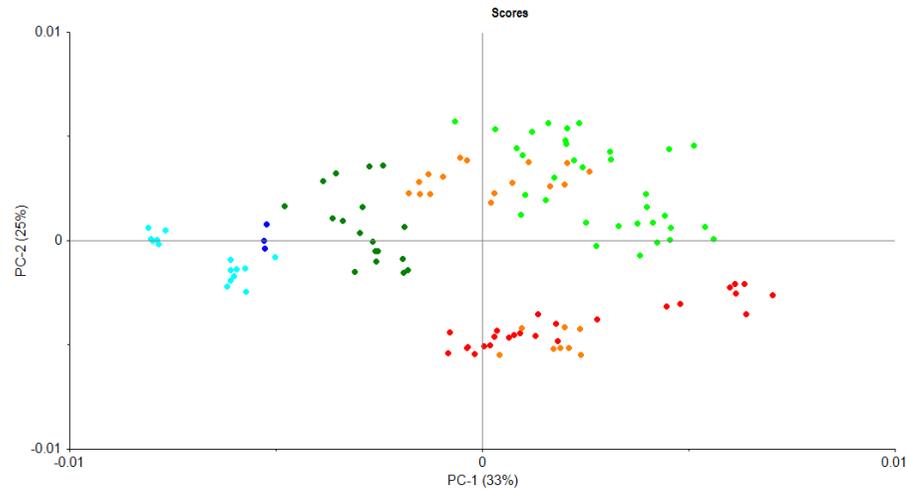


Abbildung 7-12: 2.045

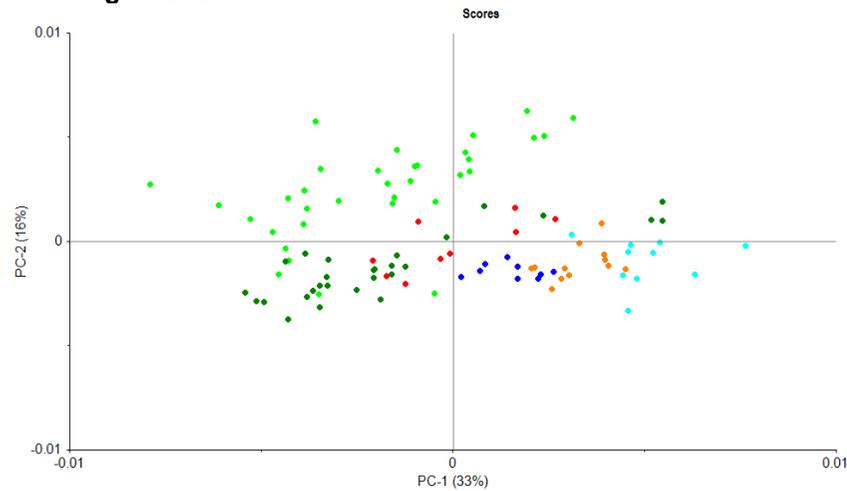


Abbildung 7-14: 2.119

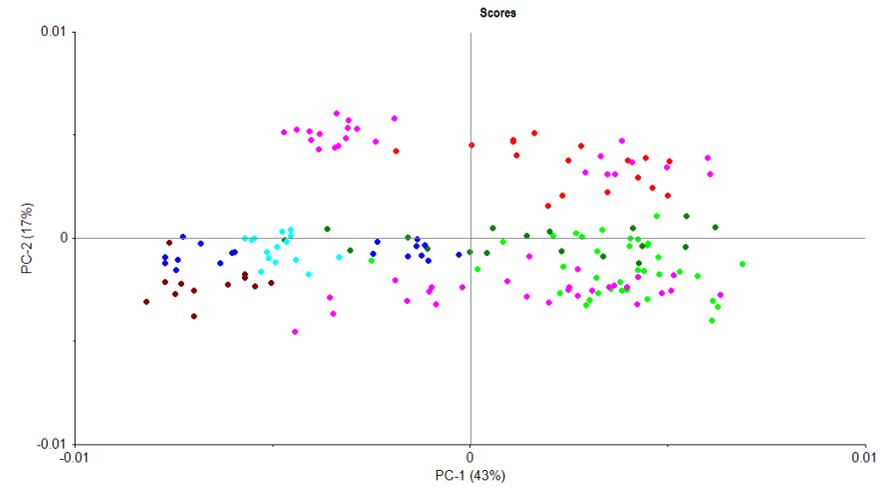


Abbildung 7-13: 2.068

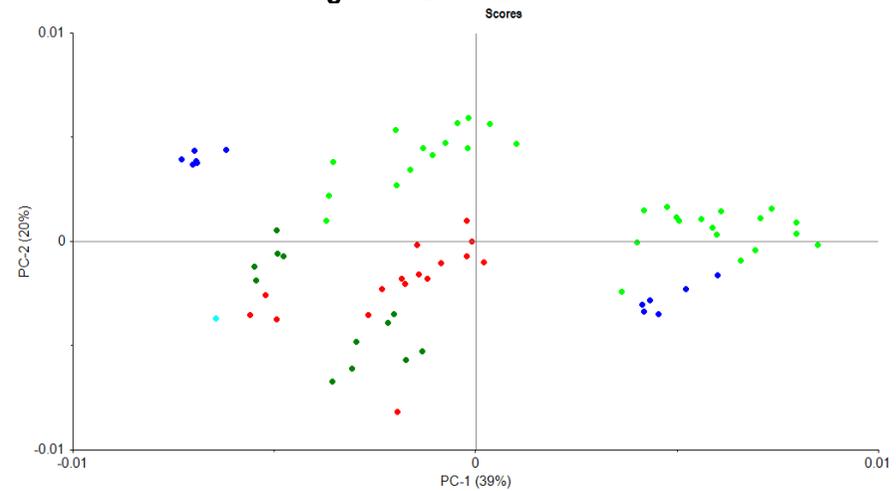


Abbildung 7-15: 2.129

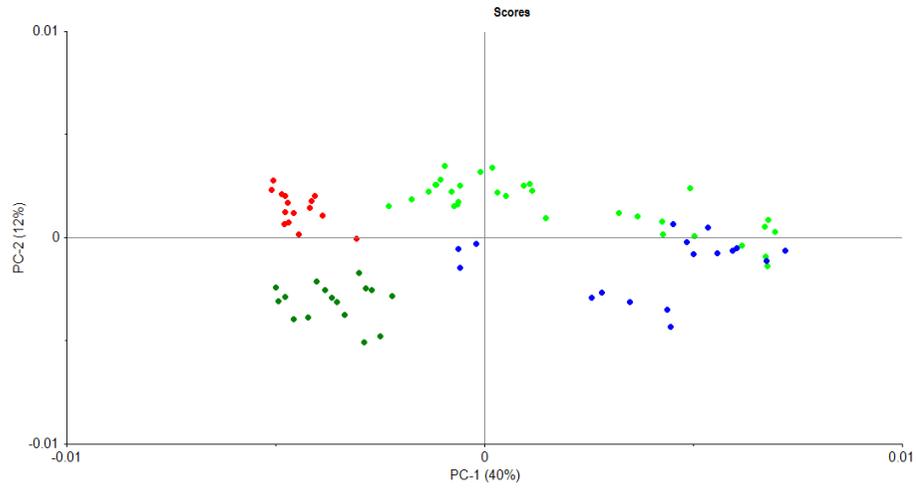


Abbildung 7-16: 2.152

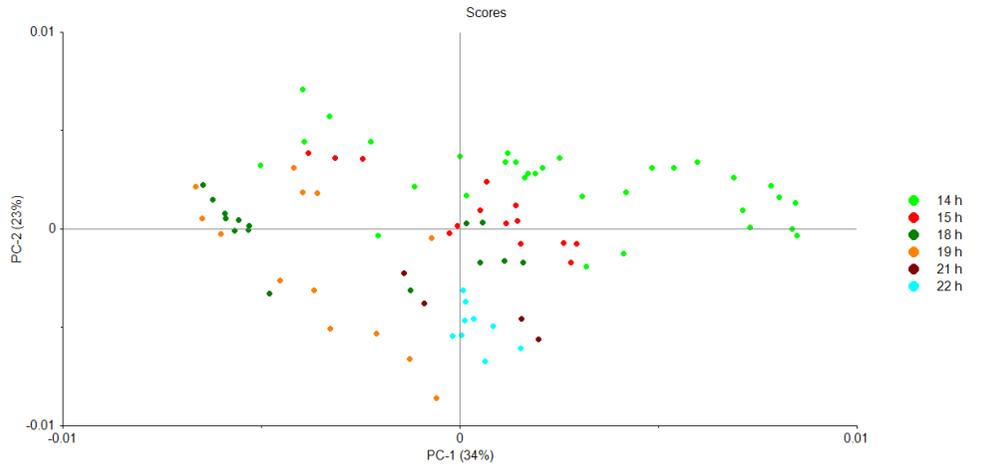


Abbildung 7-17: 2.200

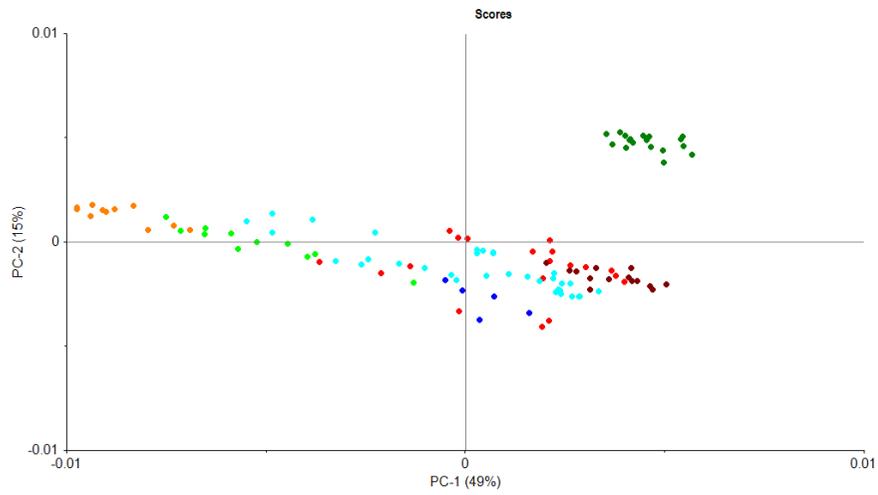


Abbildung 7-18: ug2

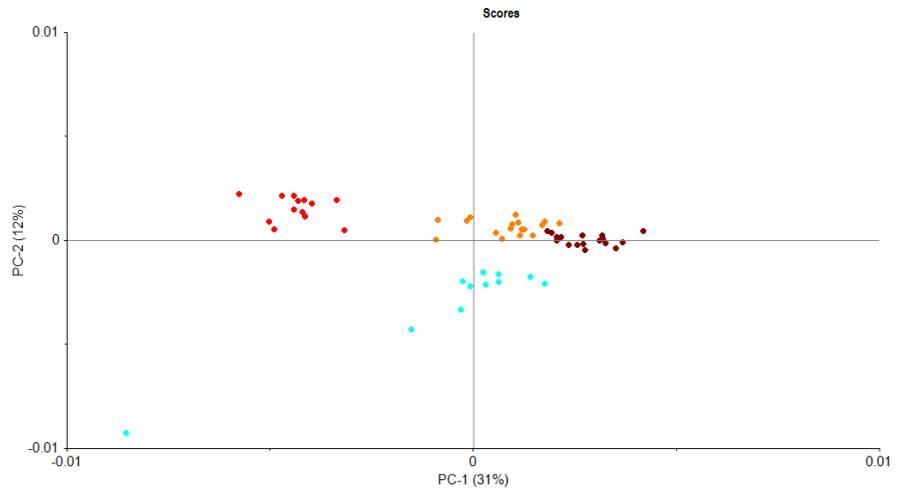


Abbildung 7-19: ug3

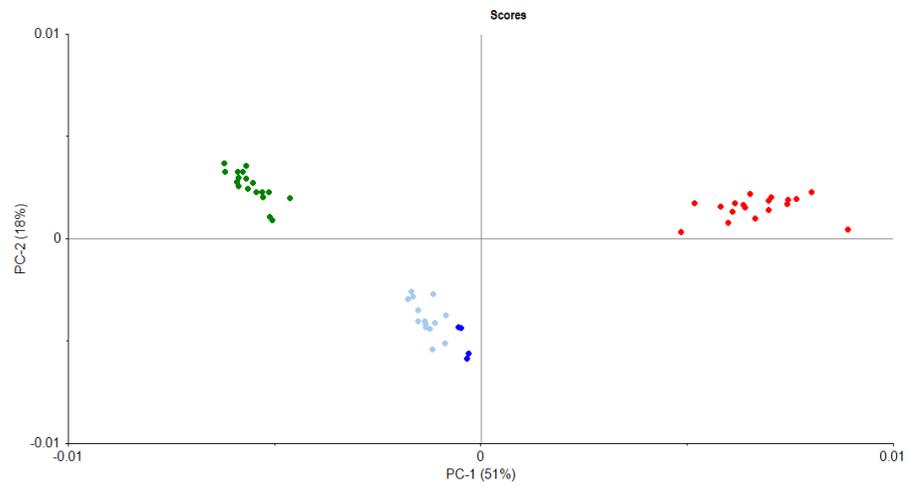


Abbildung 7-20: *ug6*

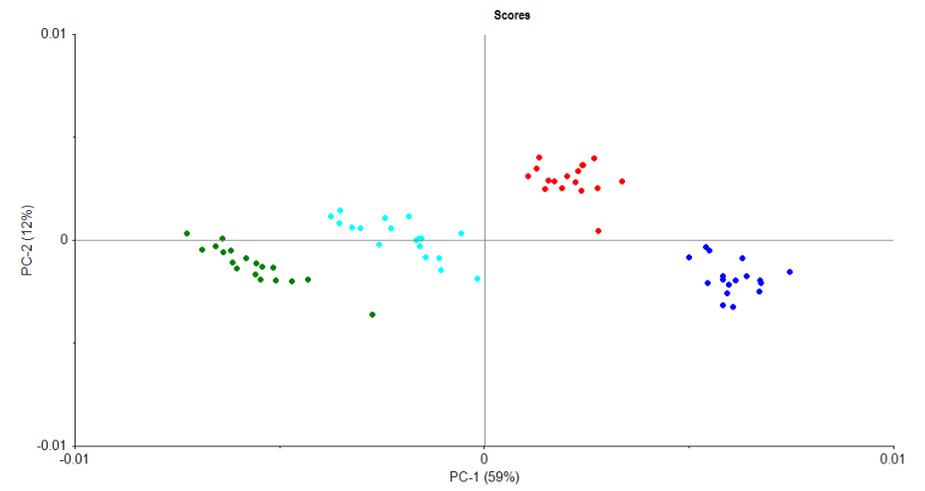


Abbildung 7-21: *ug7*

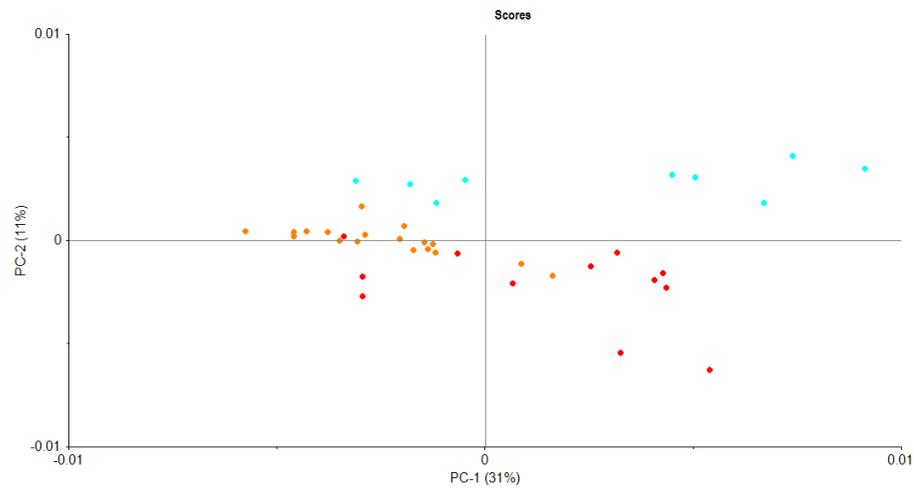


Abbildung 7-22: *Pichia membranifaciens*

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben worden sind. Weiter erkläre ich, dass ich nicht schon anderweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

Frankfurt am Main, den 28.02.2018

Jana H. Becke