

# Transkriptomanalysen und Modifizierung von Genen des Valinstoffwechsels zur Optimierung von Brauhefen

vorgelegt von  
Diplom-Lebensmittelchemikerin  
Lysann Strack

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zu Erlangung des akademischen Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
*-doctrix rerum naturalium-*

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Lauster

Gutachter: Prof. Dr. U. Stahl

Gutachter: Prof. Dr. L. W. Kroh

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23. April 2009

Berlin 2009  
D83



## Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ulf Stahl für sein Vertrauen in mich, dieses spannende Thema zu bearbeiten. Darüber hinaus danke ich ihm für seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Lothar W. Kroh danke ich sehr herzlich für die Erstellung des Gutachtens und die damit verbundenen Mühen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. habil. Elke Nevoigt, die einen großen Anteil an dieser Arbeit trägt und mir während der Bearbeitung des Themas immer hilfreich und wissend zur Seite stand.

Herrn Studienrat Oliver Sans sei sehr für die Englischkorrektur gedankt.

Frau Dr. Yukiko Kodama und Frau Dr. Claudia Stamme möchte ich für die Überlassung des Plasmides pYCGPY2 bzw. pNatCre danken. Frau Dr. Thuy Cam Duong möchte ich dafür danken, dass sie mir die  $\Delta\Delta i/v6$ -Mutante zur Verfügung gestellt hat.

Außerdem möchte ich Frau Ulrike Künkel und Herrn Dipl.-Braumeister Christian Klahm „danke“ sagen, die mir immer ihre Hilfestellungen angeboten und mir ihr Wissen im Rahmen ihrer Tätigkeit vermittelt haben. Dies hat maßgeblich zum Gelingen der vorgelegten Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachgebiets Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Berlin für die freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner Dissertationsjahre meinen herzlichen Dank aussprechen. Besonders möchte ich mich bei Frau Maria Krain, Frau Dr. Huyen Thi Than Nguyen, Frau Dr. Cam Thuy Duong, Frau Dipl.-Ing. Isil Baki, Herrn Dipl.-Ing. Andreas Albin, Herrn Dipl.-Ing. Georg Hubmann, Herrn Dr.-Ing. Georg Kristan und Herrn Dr.-Ing. Johannes Bader für die vielen Fachdiskussionen und vor allem die lustigen Labortage bedanken.

Herrn Dipl.-Ing. Gunnar Köhler sei ebenfalls für viele gewinnbringende Diskussionen gedankt. Darüber hinaus bedanke ich mich dafür, dass er unterstützend als Partner an meiner Seite steht.

Last but not least danke ich meiner engsten Familie, besonders aber meinen Eltern und meinen Freunden für ihre Unterstützung in schwierigen Phasen dieser Arbeit. Durch ihre aufmunternden Worte haben sie mir bei der Bearbeitung des Themas sehr geholfen.

Das Projekt wurde durch die Förderung der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AiF) ermöglicht.



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	vi
Tabellenverzeichnis.....	vii

## THEORETISCHER TEIL

### “Omics” technologies and challenges for yeast genetics

1. Introduction .....	1
2. “Omics” technologies pertaining to <i>S. cerevisiae</i> .....	2
2.1. Genomics .....	2
2.2. Functional genomics.....	3
2.2.1. Transcriptomics.....	4
2.2.2. Proteomics.....	8
2.2.3. Metabolomics.....	10
3. The role of “omics” technologies for brewer’s yeast .....	11
3.1. Brewer’s yeast’s hybrid genome.....	11
3.2. Determination of the 'ome' levels of brewer’s yeast .....	12
3.3. Emerging problems in brewer’s yeast’s genetics.....	13
4. Conclusion .....	15

## PRAKTISCHER TEIL

### Transkriptomanalysen und Modifizierung von Genen des Valinstoffwechsels zur Optimierung von Brauhefen

1. Einleitung .....	17
1.1. <i>Genetic Engineering</i> von Brauhefen .....	17
1.2. Problemstellung .....	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1. Chemikalien, Antibiotika.....	25
2.2. Enzyme.....	26
2.3. Kitsysteme .....	26
2.4. Plasmide.....	26
2.5. Primer (Oligonukleotide) .....	27

2.6.	Stämme .....	28
2.7.	Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung .....	29
2.8.	Bierfermentationen.....	31
2.8.1.	Hefepropagation, Anstellen, Schlauchen, Lagerung .....	31
2.8.2.	Extraktgehalt, Zellzahl, pH-Wert .....	31
2.8.3.	Diacetyl .....	32
2.8.4.	Höhere Alkohole, Ester und niedere Fettsäuren .....	33
2.8.5.	Sensorik .....	33
2.9.	Transkriptomanalyse.....	33
2.10.	DNA-Isolierungen.....	34
2.10.1.	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	34
2.10.2.	Präparative Plasmid-DNA-Aufreinigung.....	35
2.10.3.	Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefe.....	35
2.11.	<i>In vitro</i> DNA-Techniken .....	36
2.11.1.	Restriktions-Verdau von Plasmid-DNA .....	36
2.11.2.	Ligation (enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten) .....	37
2.11.3.	PCR (Polymerase Chain Reaction) und Aufreinigung von PCR-Produkten.....	37
2.11.3.1.	Amplifizierung der <i>BAT</i> -Gene .....	38
2.11.3.2.	PCR zur Kontrolle des Antibiotikaresistenz-Verlustes .....	39
2.11.3.3.	Kontroll-PCR zur Insertion der Plasmide in Brauhefe.....	39
2.12.	Transformation.....	40
2.12.1.	Transformation von <i>E. coli</i> .....	40
2.12.1.1.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	40
2.12.1.2.	Transformation von Plasmid-DNA .....	41
2.12.2.	Transformation von Brauhefe nach der Lithiumacetatmethode.....	41
2.12.3.	Verlust der Antibiotikaresistenz des Stammes $\Delta\Delta ilv6$ .....	43
2.13.	Bestimmung des Anteils plasmidtragender Zellen.....	44
2.14.	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA .....	44
3.	Ergebnisse .....	46
3.1.	Bierfermentationen mit sechs verschiedenen Brauhefestämmen .....	46
3.1.1.	Extraktgehalt, Zellzahl, pH-Wert .....	46
3.1.2.	Diacetyl .....	48
3.1.3.	Höhere Alkohole, Ester und niedere Fettsäuren .....	49
3.1.4.	Sensorik .....	50
3.2.	Analysen von Brauhefen auf der Ebene des Transkriptoms.....	51

---

3.2.1.	Paarweise Stammvergleiche der untersuchten Brauhefen .....	52
3.2.2.	Zuordnung der Daten zu zellbiologischen Funktionen .....	54
3.2.3.	Kandidatengene des Valinstoffwechsels .....	54
3.3.	Modifikationen der Kandidatengene <i>BAT1</i> und <i>BAT2</i> .....	58
3.3.1.	Klonierung der <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - <i>BAT</i> -Gene in den Zwischenvektor pGEM-T <sup>®</sup> Easy .....	59
3.3.2.	Klonierung der <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - <i>BAT</i> -Gene in den Vektor pYCGPY2 .....	60
3.3.3.	Verlust der Antibiotikaresistenzen der <i>ILV6</i> -Doppeldeletionsmutante...60	
3.3.4.	Transformation von Brauhefe mit den konstruierten Vektoren .....	61
3.4.	Kontrollfermentationen mit den zehn modifizierten Brauefestämmen .....	62
3.4.1.	Extraktgehalt, Zellzahl, pH-Wert .....	62
3.4.2.	Diacetyl .....	64
3.4.3.	Höhere Alkohole, Ester und niedere Fettsäuren .....	66
3.4.4.	Sensorik .....	67
4.	Diskussion .....	68
4.1.	Expressionsanalysen der sechs ausgewählten Brauefestämme .....	69
4.2.	Signifikant differentiell exprimierte Gene der Valinbiosynthese .....	71
4.3.	Genvariationen und modifizierte Stämme .....	73
4.4.	Reduktion der Diacetylbildung durch gezielte, genetische Veränderungen ..75	
4.5.	Einfluss der Modifizierungen auf die Bildung höherer Alkohole und Ester ....78	
5.	Zusammenfassung .....	83
6.	Literaturverzeichnis .....	84
7.	Anhang .....	94

## Abkürzungsverzeichnis

Sofern nicht anders vermerkt, gelten die SI-Einheiten.

2DE	zweidimensionale Gelelektrophorese, two-dimensional gel electrophoresis
ADH	Alkoholdehydrogenase
AFLP	amplified fragment length polymorphism
ALDC	Acetolactatdecarboxylase
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz-Gen
ANOVA	Analysis of variance
ATF	Acetyltransferase
ClonNAT	Aminoglykosid-Antibiotikum Nourseothricin
CGH	comparative genomic hybridisation
d	day, Tag
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	Elektroneneinfang-Detektor (electron catch detector)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
e.g.	exempli gratia, for instance
Es	scheinbarer Extrakt
EtBr	Ethidiumbromid
e.V.	eingetragener Verein
FG	Functional Genomics
FDR	False Discovery Rate
Fw	<i>forward</i>
G418	Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin 418
GC	Gaschromatographie, gas chromatography
GE	<i>Genetic Engineering</i>
h	hour, Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, high performance liquid chromatography
<i>IME</i>	<i>Inverse Metabolic Engineering</i>
IS	Interner Standard
<i>kan<sup>r</sup></i>	Kanamycin- bzw. Geneticinresistenz-Gen
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LB	Luria-Bertani
LC	Flüssigchromatographie, liquid chromatography
Lg	<i>Lager</i>
MALDI-TOF/MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation - Flugzeitmassenspektrometer, matrix-assisted laser ionization/desorption/time of flight mass spectrometry
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<i>ME</i>	<i>Metabolic Engineering</i>
MS	Massenspektrometrie, mass spectrometry
mRNA	messenger ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NMR	Kernspinresonanz, nuclear magnetic resonance
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge $\lambda = x$

ori	Replikationsursprung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
p-value	probability value, Irrtumswahrscheinlichkeit
PYK	Pyruvatkinase
<i>RME</i>	<i>Rational Metabolic Engineering</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rv	<i>reverse</i>
SAGE	Serial analysis of gene expression
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<i>S. bayanus</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>S. carlsbergensis</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
Sc, <i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pastorianus</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
s.o.	siehe oben
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer (Trisbase mit Borsäure und EDTA)
<i>TDH3<sub>p</sub></i> , <i>TDH3<sub>t</sub></i>	Promotor/Terminator des <i>TDH3</i> -Gens aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase)
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Lösung, mit HCl auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt
U	units
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
var.	variation
VLB	Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin
Vol	Volumen
w/v	weight/volume
YEPD	Hefeextrakt, Pepton, Dextrose (yeast extract, peptone, dextrose)
YEPGal	Hefeextrakt, Pepton, Galactose (yeast extract, peptone, galactose)
z.B.	zum Beispiel
ZKT	Zylindrokonischer Tank

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Strategie des <i>Inverse Metabolic Engineering</i> .....	20
<b>Abbildung 2:</b> Diacetylbildung durch Hefe..	22
<b>Abbildung 3:</b> Konzentrationen der Zellen in der Schwebelösung der sechs verwendeten Brauhefen.	47
<b>Abbildung 4:</b> Gemessene scheinbare Extraktgehalte der sechs verwendeten Brauhefen. ....	47
<b>Abbildung 5:</b> Gemessene pH-Werte der sechs verwendeten Brauhefen. ....	48
<b>Abbildung 6:</b> Verläufe der extrazellulären Diacetylkonzentration der sechs verwendeten Brauhefen .....	49
<b>Abbildung 7:</b> Summe der höheren, aliphatischen Alkohole (C3-C5) der sechs verwendeten Brauhefen.....	49
<b>Abbildung 8:</b> Summe der Ester (Ethylacetat, Isoamylacetat, Phenylethylacetat) der sechs verwendeten Brauhefen. ....	50
<b>Abbildung 9:</b> Summe der niederen Fettsäuren (C3-C10) der sechs verwendeten Brauhefen. ....	50
<b>Abbildung 10:</b> Hierarchische Anhäufung von Genen mit ähnlichen Expressionsmustern. ....	53
<b>Abbildung 11:</b> Valinbiosynthese von Hefen. Signifikant differentiell exprimierte Gene.....	56
<b>Abbildung 12:</b> Abhängigkeit der Diacetylgehalte von der Expressionsstärke des Gens <i>ILV3</i> . ....	57
<b>Abbildung 13:</b> Abhängigkeit der Diacetylgehalte von der Expressionsstärke des Gens <i>ILV6</i> . ....	57
<b>Abbildung 14:</b> Abhängigkeit der Diacetylgehalte von der Expressionsstärke des Gens <i>BAT1</i> . ....	57
<b>Abbildung 15:</b> Abhängigkeit der Diacetylgehalte von der Expressionsstärke des Gens <i>BAT2</i> . ....	58
<b>Abbildung 16:</b> Vektoraufbau des pGEM-T <sup>®</sup> Easy.....	59
<b>Abbildung 17:</b> Vektoraufbau des pYCGPY2.....	60
<b>Abbildung 18:</b> Konzentrationen der Zellen in der Schwebelösung der genetisch veränderten Brauhefen.....	63
<b>Abbildung 19:</b> Gemessene scheinbare Extraktgehalte der genetisch veränderten Brauhefen. ....	63
<b>Abbildung 20:</b> Gemessene pH-Werte der genetisch veränderten Brauhefen.....	64
<b>Abbildung 21:</b> Verläufe der extrazellulären Diacetylkonzentration der genetisch veränderten Brauhefen.....	65
<b>Abbildung 22:</b> Summe der höheren, aliphatischen Alkohole (C3-C5) der genetisch veränderten Brauhefen.....	66
<b>Abbildung 23:</b> Summe der Ester (Ethylacetat, Isoamylacetat, Phenylethylacetat) der genetisch veränderten Brauhefen.....	66
<b>Abbildung 24:</b> Summe der niederen Fettsäuren (C3-C11) der genetisch veränderten Brauhefen.....	67
<b>Abbildung 25:</b> Übersicht über die Teilaspekte der vorliegenden Arbeit. ....	69
<b>Abbildung 26:</b> Valinbiosynthese von Hefen. Expressionssignale der jeweiligen Gene. ....	73
<b>Abbildung 27:</b> Valinbiosynthese von Hefen. Genetische Veränderungen und Stammnamen..	74
<b>Abbildung 28:</b> Valinbiosynthese von Hefen. Auswirkungen auf die Diacetylbildung. ....	78
<b>Abbildung 29:</b> Valinbiosynthese von Hefen. Auswirkungen auf die Alkohol- und Esterbildung. ....	81

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Primer.....	28
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Mikroorganismen.....	29
<b>Tabelle 3:</b> PCR-Reaktionsansatz für 50 µl.....	38
<b>Tabelle 4:</b> PCR-Programm zur Amplifizierung der <i>BAT</i> -Gene.....	38
<b>Tabelle 5:</b> PCR-Reaktionsansatz für 50 µl (Finnzymes).....	39
<b>Tabelle 6:</b> PCR-Programm zur Kontrolle des Antibiotikaresistenz-Verlustes.....	39
<b>Tabelle 7:</b> PCR-Programm zur Kontrolle der Plasmide.....	40
<b>Tabelle 8:</b> Pipettierschema für einen Transformationsansatz nach der Lithiumacetatmethode für Hefe.....	42
<b>Tabelle 9:</b> Paarweise Stammvergleiche, Es = 8%.....	52
<b>Tabelle 10:</b> Paarweise Stammvergleiche, Es = 6%.....	53
<b>Tabelle 11:</b> Stammmamen der modifizierten Brauhefestämme.....	62



## THEORETISCHER TEIL

### “Omics” technologies and challenges for yeast genetics \*

#### 1. Introduction

The improvement of organisms towards certain traits has been enabled by the progress in DNA recombinant technology. But before one can start with genetic work in the first place the objective target for the improvement of organisms has to be considered. Today there are different approaches which concentrate on aspects of the “course from gene to metabolites”. Within *metabolic engineering (ME)* the cellular activities can be improved by manipulation of enzymatic, transport and regulatory functions of the cell (Bailey *et al.*, 1990; Bailey *et al.*, 2002). Therefore, it is necessary to have a specific knowledge about the genes, the encoded enzymes and their regulation for the use of genotypic traits as a starting point. In many cases, there is insufficient information concerning cellular functions available. For this reason, an alternative approach for the improvement of an organism towards desired traits is required for which there is no need of the aforementioned knowledge. The so called *inverse metabolic engineering (IME)* strategy comprises i) the construction of a desired phenotype and ii) the identification of the genetic basis for the different values of the traits which is required to enable the researcher to iii) let follow genetic manipulations. Consequently, in contrast to rational *metabolic engineering*, *IME* starts with the phenotypic trait. With the aid of these technological advances it should be possible to understand whereby a phenotype is determined by a genotype.

---

\* Um den Theoretischen Teil in Fachliteratur publizieren zu können, wurde dieser in englischer Sprache verfasst.

But these approaches do not combine a collective knowledge of the organism which is necessary to understand the details of its metabolic system. Hence, the challenge is to introduce global studies for the determination of targets and approaches for the improvement of several organisms.

## **2. “Omics” technologies pertaining to *S. cerevisiae***

The availability of complete genomes for an increasing number of organisms brought about a strong need for comprehensive methods of analysis to take advantage of these complete inventories of genes (Wu *et al.*, 2004). Because only sequencing an organism's genome does not give any details of its enzymes and their encoding genes the field of “omics” technologies was created to understand the sequence information better (Oliver, 2002). These techniques have become important tools in many metabolic engineering strategies and furthermore have facilitated the understanding of organisms' metabolism (Bro und Nielsen, 2004). These are mainly genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. Genomics concentrate on the study of genomes of an organism. Within functional genomics (FG), the levels of the transcriptome, the proteome and the metabolome reveal the complete set of the mRNA molecules, the proteins or the metabolites of a cell. These techniques have allowed the identification of genetic differences (transcripts) and gave insight into their cellular effects (proteins, metabolites). Furthermore, they have provided an insight into the cellular response to genetic alterations or environmental changes. The accumulation of such in-depth knowledge is highly advantageous for elucidating functions of novel genes and gives a cause for thoughts about their genetic manipulation with regard to organisms' improvement (Oliver, 2002).

### **2.1. Genomics**

Genomics promote the understanding of the structure, function and evolution of genomes and the application of genome technologies to challenging problems in biology and medicine. The field is intensively trying to decode the entire DNA sequence of organisms and fine-scale genetic mapping. Furthermore, studies of intragenomic phenomena such as heterosis, epistasis, pleiotropy and other interactions between loci and alleles within the genome are enclosed. In contrast, the investigation of single genes and their functions is not the object of “genomics”.

Useful tools and fingerprinting methods are available for the global-scale genome analysis. Microarray-based comparative genomic hybridisation (CGH) has been used successfully in detecting gene deletions, quantification of gene copy numbers and in searching for information on chromosomal aneuploidies as well as translocations of gene parts (Winzeler *et al.*, 1999; Daran-Lapujade *et al.*, 2003). The identification of genomic differences between species showing different degrees of a certain phenotype can directly reveal target genes for organisms' improvement.

Another firmly established method among these genomic fingerprinting methods is the amplified fragment length polymorphism (AFLP) which is based on the selective PCR amplification of restriction fragments from a total digest of genomic DNA (Vos *et al.*, 1995; Meudt und Clarke, 2007). AFLP has the capability to detect various polymorphisms in different genomic regions simultaneously.

These technologies have become widely used for the identification of genetic variation in strains or closely related species of plants, fungi, animals and bacteria. Especially for yeast which has become a eukaryotic model organism one can find many research studies dealing with species determination and the relatedness among them. A diverse collection of up to 70 *Saccharomyces cerevisiae* strains and its closest relative sampled from different ecological niches were examined using microarrays with regard to their variations in gene content, single nucleotide polymorphisms, nucleotide insertions and deletions, copy numbers and transposable elements (Liti *et al.*, 2009; Schacherer *et al.*, 2009). Hence, it can be concluded that yeast DNA microarray hybridization has a high resolution to discriminate between species, even when the strains are closely related. Furthermore, it is very useful in the analysis of evolutionarily genetic distance among species (Watanabe *et al.*, 2004) and facilitates finding correlations of phenotypic variation with global genome-wide phylogenetic relationships. However, to obtain meaningful information at the individual gene level, this method should be confirmed by additional techniques such as AFLP (Daran-Lapujade *et al.*, 2003).

## **2.2. Functional genomics**

After sequencing the genome the next logical step is to elucidate the functions and interactions of the enzymes which the genes are coding for. Functional genomics (FG) is a field of molecular biology that describes gene and protein functions and interactions. The area focuses on the dynamic aspects such as gene transcription, translation and protein-protein interactions, as opposed to the genomic information

such as DNA sequences or structures (see 2.1). FG includes function-related aspects of the genome itself such as mutation and polymorphism (same as Single Nucleotide Polymorphism, SNP) analysis as well as measurement of molecular activities. Furthermore, it comprises "omics" technologies as transcriptomics (gene expression), proteomics (protein expression) and metabolomics (metabolite profiles) (Oliver, 2002). By means of functional genomics it is possible to quantitate the steps from transcriptome to metabolome and to improve our understanding of gene and protein functions and interactions.

The FG approaches involve the use of large-scale and/or high-throughput methods to understand genome-scale functions and regulations of transcriptomes, proteomes and resulting metabolomes. These methods are particularly i) the Gene Chip technology (DNA microarrays) and Serial analysis of gene expression (SAGE) which provide various images of the transcriptome (mRNA) (Jansen und Gerstein, 2000) ii) the two-dimensional gel electrophoresis (2D gel electrophoresis) and mass spectrometry (MS or coupled MS/MS) for the proteome level (Gygi *et al.*, 2000) and iii) mass spectrometry-based techniques such as GC/MS or LC/MS for measurement of the metabolites.

### **2.2.1. Transcriptomics**

Among the different levels of functional genomics the transcriptome has attracted the most attention (Wu *et al.*, 2004). Transcriptomics deal with the transcripts of a given organism and reveal the whole set of mRNA molecules in the cell. With the aid of transcriptome analysis it is possible to study the expression of all genes in a single experiment (Pugh *et al.*, 2002). Moreover, transcriptome analyses can disclose external environmental conditions and reflect the genes that are being actively expressed at any point in time.

For the global-scale transcriptome analysis the DNA microarray is a powerful tool which has revolutionized the fields of genetics (Pugh *et al.*, 2002). Microarray-based transcriptome analysis enables the examination of abundance of all transcripts in the cell at a given state or condition and thus allows both the identification of genes which are co-regulated and the analysis of global responses to genomic mutations.

DNA microarrays can be used to detect DNA or RNA. For the detection of copy number changes or losses in comparison to another related organism DNA is first stained and then hybridized to specific DNA probes. The dye ratio along the chromosomes can observe regions of DNA gain or loss in the analyzed sample. The method has been

referred to as comparative genomic hybridization. The measurement of RNA after reverse transcription to cDNA is called expression profiling and allows simultaneously monitoring the expression levels of thousands of genes in order to study the effects of certain conditions (Khatri und Draghici, 2005). For standard microarrays, first of all, the probes have to be designed which are then attached to a solid surface by a covalent bond to a chemical matrix. This solid surface can be glass or a silicon chip (gene chip). Other microarray platforms use microscopic beads. The small chips contain series of thousands of microscopic spots of DNA, each containing picomoles of the specific DNA sequence. Therefore, sample-specific oligonucleotides (25-70mers long) which can be short sections of a gene or other DNA elements such as open reading frames (ORF) are spotted on the surface which shall hybridize the sample-cDNA (target). Probe-target hybridization is usually detected and quantified by fluorescence-based detection of fluorophore-labeled targets to determine relative abundance of nucleic acid sequences of the target.

For the single channel hybridization the sample cDNA is biotin labelled, and then hybridisation can be induced. During the staining step the chip is dyed with a fluorescent molecule which binds to biotin ("antibody staining"). Many series of washes and stainings provide amplified fluorophore that emits light which can be scanned with a control laser. The result is a specific signal pattern of the tested organism at a certain timepoint which indicates the status of cellular processes (Eisen *et al.*, 1998). The advantage of single channel experiments is the easy comparison of arrays from different experiments even months or years after procedure. When samples shall be directly compared to each other hybridization over two channels is carried out. The cDNA is labeled with two different fluorophores, generally Cy3 and Cy5 (Cyanine dyes), and then mixed (Shalon *et al.*, 1996). Relative intensities of each fluorophore may then be used in ratio-based analysis to identify up-regulated and down-regulated genes (Tang *et al.*, 2007). With the two-color system relative differences in expression among different spots within a sample and between samples can be measured.

The obtained expression levels using microarrays provide the researchers with the opportunity to broaden their knowledge about the correlation of genotypes and their roles for the functions in the cell. But before one can correlate genotypic settings and resulting effects the great quantities of data have to be evaluated. A big challenge is the development of efficient methods for organizing and interpreting the large amounts of data (DeRisi *et al.*, 1997). Hence, it is necessary to normalize and summarize the values first. Herein the expression signals are set to a certain value and calculated from the background-adjusted value to get a trimmed mean at the end. Then, the

statistical differential analysis can follow which tests whether there are differentially expressed probes. In general, the significance is defined by statistical analysis via t-testing (for two-sampling). Most commonly, One-way Analysis of Variance (ANOVA, for at least three independent groups) is used which filters out genes that have the same expression level across groups (samples, datasets) followed by a pairwise comparison for the identification of genes which differ from each other.

The probability value is traditionally set to  $p\text{-value} = 0.05$  and states that random sampling from identical groups would lead to a difference smaller than one observed in 95% of experiments and larger than one observed in 5% of experiments. In some cases, genes are classified as significantly different when actually they are not ("false positives") (Reiner *et al.*, 2003). To avoid such multiple testing errors, follow-up tests have to be done. The False Discovery Rate (FDR) can account for this problem and has become an essential tool in any study that has a very large multiplicity problem (Benjamini und Yekutieli, 2005).

Having a list of differentially expressed genes it is essential to translate it into a functional profile to offer insights into the cellular mechanisms activated in a given condition (Khatri und Draghici, 2005). But these detected genes have to be annotated because otherwise one cannot benefit from the data. To get functional genomic information manifold tools and databases have been established (see Review (Khatri und Draghici, 2005)). One important ontological analysis tool is Gene Ontology (GO) which features a large amount of annotations for genes of many species (Ashburner *et al.*, 2000; Doniger *et al.*, 2003). GO as well as the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) facilitate functional interpretations (Al-Shahrour *et al.*, 2006). KEGG gains access to 29 different species for gene ordering. These databases help to understand functional meanings of the detected genes and offer pathway maps which are hierarchically classed (Kanehisa *et al.*, 2004). A further bioinformatics resource is MAPPFinder which allows to create gene expression profiles from microarray data with the aid of both GO terms and GenMAPP and therefore, eases data analysis (Doniger *et al.*, 2003). Other web tools which use GO terms for the functional analysis of groups of genes are Babelomics (Al-Shahrour *et al.*, 2005b; Al-Shahrour *et al.*, 2006) and FatiGO (Al-Shahrour *et al.*, 2004; 2005a; Al-Shahrour *et al.*, 2007). The tools are integrated in the analysis package Gene Expression Profile Analysis Suite (GEPAS) which analyses gene expression patterns and is the most complete web-based resource today (Vaquerizas *et al.*, 2005).

But despite the growing number of programs available for microarray data analysis there are still many aspects with incomplete coverage (Herrero *et al.*, 2004). One

reason for that is the knowledge of only a subset of genes for sequenced organisms (King *et al.*, 2003). This comes along with the manual curation process of annotations and its time lag or even incorrectness (Khatri und Draghici, 2005). Another point is the incomplete linkage of different tools and the inconnectivity between them emerging out of problems with input/output formats caused by different task-performances (Herrero *et al.*, 2004). Until now, there is no unified analysis for data evaluation available (Khatri und Draghici, 2005).

Another important step in the analysis of gene expression data is the identification of gene groups and clusters (Ray *et al.*, 2007). Hierarchical clustering for instance calculates the similarity between each sequence (point) in a cluster (dataset) and all the points in the neighbouring cluster. Array and sample qualities as well as the degree of potential relationship of organisms within the same species can be approximated using the clustering. Therefore, clusters show the diversity of characteristic values and ideally common samples should cluster into similar classes. The more distant organisms are in relation to each other the less accordances will be found.

It is also possible to measure genes expressed in an organism using serial analysis of gene expression (SAGE) which was developed by Velculescu in 1995 (Velculescu *et al.*, 1997). The general goal of the technique is similar to the DNA microarray. However, SAGE is a sequence-based sampling technology where small pieces of all mRNA molecules of an organism are put together to form a long chain. Afterwards, the latter is taken up by bacteria for amplification and then sequenced by high-throughput DNA sequencers. The benefit of this method is the revelation of new, unknown transcripts while measuring expression levels without reference to a standard so that data are definitively acquired and cumulative. A major limitation of SAGE is i) that it can hardly be performed on multiple samples and ii) its high costs and labor input in contrast to microarrays (Marti *et al.*, 2002). But the combination of DNA microarray experiments with SAGE analysis can show gene expression profiles and allows networking gene regulations (Skoneczna, 2006).

Follow up experiments play key roles in successful expression profiling experiments. Therefore, another method which is often used for confirmation of the microarray data is real time reverse transcriptase PCR (rt-PCR) where messenger RNA in cells is highly sensitive quantified. The technology is used in the determination of how the genetic expression of a particular gene changes over time, for example in response to changes in environmental conditions. Therefore, rt-PCR is a routinely used tool in molecular biology for determination of mRNA concentrations of specific genes (Pfaffl, 2004).

Relatively small changes in mRNA expression of several genes can produce large changes in the total amount of the corresponding protein present in the cell. Therefore, the analysis of relative mRNA expression levels can be complicated. The Gene Set Enrichment Analysis identifies coregulated gene networks rather than individual genes that are up- or down-regulated in different cell populations (Subramanian *et al.*, 2005). A number of organism-specific transcriptome databases has been constructed and annotated for the identification of genes that are differentially expressed in distinct cell populations or subtypes. The use of miniaturized microarrays for gene expression profiling was first reported in 1995 (Schena *et al.*, 1995) and the complete eukaryotic genome of *Saccharmyces cerevisiae* on a microarray was published in 1997 which made this yeast being the outrider for all organisms (Lashkari *et al.*, 1997). The result was a huge run on this new method, especially for the comparison of transcriptional profiles of yeast strains. Various yeasts showing different phenotypes were analysed to find the genetic basis relevant to these differences. Using microarrays, target genes for strain improvement could be identified (Bro *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2005; Gorsich *et al.*, 2006; Petersson *et al.*, 2006; Cordier *et al.*, 2007). Moreover, yeasts were exposed to different conditions to measure how the latter have an influence on the transcripts of the yeast. Special terms were zinc, iron or nutrient deprivation where it was demonstrated that the transcriptional activities of particular involved *S. cerevisiae*-genes differ from these at stable conditions (ter Linde *et al.*, 1999; Gasch *et al.*, 2000; de Nobel *et al.*, 2001; Yale und Bohnert, 2001; Yoshimoto *et al.*, 2002b; Higgins *et al.*, 2003b; Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004). Therefore, it can be concluded that transcriptome analyses are able to reflect changes on a molecular level and whether terms and conditions in industrial processes are well adjusted. Recording the expression levels enables the implication of changes in phenotype with associated changes in genotype of an organism (Gill, 2003). If additional cluster analyses are accomplished for the expression data it is also possible to find relationships among organisms of the same species (Kellis *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2004).

### **2.2.2. Proteomics**

Although microarray studies can reveal the relative amounts of different mRNAs in the cell, these levels are not directly proportional to the expression level of the proteins they code for. The number of protein molecules synthesized using a given mRNA molecule as a template is highly dependent on translation-initiation features of the mRNA sequence and will vary with time and environmental conditions to which a cell or

organism is exposed. The entire complement of proteins of a cell is known as the proteome which brings us one level closer to the phenotype (Wilkins *et al.*, 1996; Bro und Nielsen, 2004). The study of the protein-entirety is described by proteomics (Pandey und Mann, 2000). Hence, the proteomics technology comprises highly sensitive and high throughput methods which are able to quantitatively display and analyse all the proteins present in a sample (Haynes und Yates, 2000). Therefore, proteome analysis is mostly accomplished by two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and mass spectrometry (MS) (Gygi *et al.*, 2000).

The 2DE is a powerful technique whereby proteins are separated i) based on their charge by isoelectric focusing (IEF) and ii) according to their molecular weight by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Beranova-Giorgianni, 2003). 2DE is considered more laborious, less sensitive and less producible than DNA microarray despite its potential in the study of gene functions. However, the optimisation of the 2DE and hence the development of new methods for global quantification of proteins based on mass spectrometry will bring about more perspectives for global-scale proteome studies (Aebersold und Mann, 2003). Within MS, it is possible to identify unknown molecules while determining the structure of a compound by observing its fragmentation and quantifying the amount of a compound in a sample. For the determination of phosphorylation sites in proteins (which implies the latter being an intermediate structure in a pathway) MALDI-TOF/MS can also be used (Graves und Haystead, 2002). Its high sensitivity and applicability makes it the method of choice for investigating complex molecules in biology and chemistry.

Recently, a gel free method for the specific isolation of phosphorylated peptides using diagonal, reversed-phase chromatography with further peptide-characterization by mass spectrometry has been described (van Damme *et al.*, 2008; Gevaert und Vandekerckhove, 2009). This technology points to changes in protein expression levels and has been widely used as an important tool for exploring complex biological systems (Nie *et al.*, 2008).

Since the introduction of 2DE and MS technologies these have been successfully used in a number of studies in many biological fields (Beranova-Giorgianni, 2003). One of the most exciting applications of proteomics involves studies for yeasts because these are the eukaryotic model organisms for research purposes. Herein, the number of identified protein spots could be largely extended to create protein maps for reference purposes (Boucherie *et al.*, 1995; Perrot *et al.*, 1999; Perrot *et al.*, 2007). Furthermore, mitochondrial proteins can be identified with these methods as well as phenotypic differences as a result of deletion events (Rogowska-Wrzesinska *et al.*, 2001;

Sickmann *et al.*, 2003). These approaches demonstrate that studies on the proteome level have the ability to give further information for the understanding of cellular functions of an organism (Kolkman *et al.*, 2005; Pham und Wright, 2007).

### **2.2.3. Metabolomics**

The metabolome level refers to the complete set of small-molecule metabolites which can be found within a biological sample (Oliver *et al.*, 1998). It includes metabolites such as metabolic intermediates, hormones and other signalling molecules. A range of analytical techniques are required in order to maximize the number of metabolites that can be identified in a matrix (Griffin, 2006). For this purpose, separation and detection methods are applied. Popular metabolic profiling tools are gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectrometry (MS). Using HPLC a wider range of analytes can potentially be measured but compared to GC the chromatographic resolution is lower. The disadvantage for GC-analyses is that a derivatization is required for most compounds which is not invariably possible. Hence, not every molecule can be detected. Moreover, the sample evaporates and cannot be used for further analysis. Although the nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy allows for secondary analyses it is relatively insensitive compared to mass spectrometry-based techniques. However, a full metabolic picture requires the combination of several analytical techniques (Smedsgaard und Nielsen, 2005).

For industrial applications there are only a few organisms considered. One of them is yeast which is a single cell organism that emphasised as the eukaryotic model organism. Yeast helped to understand their metabolic fluxes and therefore, research on yeasts is advanced. Yeast organisms produce a broad range of metabolites due to their complex metabolism (Smedsgaard und Nielsen, 2005). These metabolites have to be profiled in order to understand the metabolic fluxes in the cell. Therefore, the above mentioned technologies opened up new vistas and were used to characterise specific enzymes and genes in the cell and especially to achieve insights into the central carbon metabolism of *S. cerevisiae* (Gombert *et al.*, 2001; dos Santos *et al.*, 2003).

Another important field is mapping the effects of specific mutations in the genome. There are a lot of *metabolic engineering* strategies elucidated in the literature for improving yeasts concerning product formation or cellular properties (Stephanopoulos, 1999). Within these the metabolites have been measured with different techniques (Olsson und Nielsen, 2000; Dietvorst *et al.*, 2005; Lafaye *et al.*, 2005). While analysing

the metabolite spectrum it is possible to notice specific changes as a result of *metabolic engineering* in order to clarify the cellular functions and metabolic fluxes. The technologies can generally be applied to any organism.

### **3. The role of “omics” technologies for brewer’s yeast**

Yeasts have been used over centuries for the production of wines, bakery products and beer. But the fact that microorganisms such as yeasts are responsible for the fermentation and by-product formation has been only known for about 150 years. Today, these yeasts are used precisely. Especially for the beer production the selection of adequate yeasts is necessary to guarantee an optimal brewing process and taste of the beverage. In general, two types of beer can be classified. These are ale beers using top-fermenting yeasts and lager brews using bottom-fermenting yeasts which each require different fermentation conditions and as a consequence, show various product qualities. But various yeast species do not combine every desired trait in one strain and therefore, these yeasts still need to be optimised. Hence, for the brewing industry it is indispensable that yeast improvement is the main focus of research purposes. But due to the fact that over 90% of the worldwide produced beer are lager brews the research concentrates on lager brewing yeasts (Kodama *et al.*, 2006).

#### **3.1. Brewer’s yeast’s hybrid genome**

Brewer’s yeasts of the *Saccharomyces sensu stricto* group differ from *S. cerevisiae* regarding their genomes. Specifically, the size of the lager brewer’s yeast’s genome is approximately twice the size of *S. cerevisiae* and therefore reflects that lager brewer’s yeasts vary from other brewing yeasts (Kodama *et al.*, 2006). Their genome is a combination of at least two species of which one was clearly identified as *S. cerevisiae*. Still the other ancestors remain unclear but they were considered to be derived from another *Saccharomyces* species (Casaregola *et al.*, 2001; Kodama *et al.*, 2006). Older results hypothesised that brewer’s yeast is a hybrid of *S. cerevisiae* and *S. bayanus* (Tamai *et al.*, 1998; Yamagishi und Ogata, 1999). Recently, outcomes argue for *Saccharomyces uvarum* and/or *Saccharomyces bayanus* so that the lager brewer’s yeast’s genome could be composed from three different ancestors. Furthermore, there are findings that lager yeasts consist either of the pure lines *S. uvarum* or *S. bayanus* or they are combinations together with *S. cerevisiae*. In addition, there could be a

fourth part which could originate from *S. uvarum* and was named “lager” according to its first revelation from lager brewer’s yeast (Rainieri *et al.*, 2006). Moreover, Gonzalez *et al.* (2008) and Naumova *et al.* (2005) postulated new hybrids consisting of *S. cerevisiae* and other yeasts of the *Saccharomyces sensu stricto* group like *S. kudriavzevii* which constitute to the diversity and complexity of brewer’s yeasts. But still it is unclear whether these hybrids are “real” species or may be only breedings of the same species. The type strains of brewer’s yeast have formerly been named *S. carlsbergensis* or *S. monascensis* but now the hybrid genome lines which contain a *S. cerevisiae* genome part shall be named *S. pastorianus* (Rainieri *et al.*, 2006).

### **3.2. Determination of the 'ome' levels of brewer’s yeast**

As previously mentioned lager brewer’s yeast strains are hybrids between *S. cerevisiae* and other *Saccharomyces* yeasts (see section 3.1). As the genome sequence of brewer’s yeast has not been publicly available the application of “omics” technologies in brewer’s yeast studies has mostly been performed by employing the current knowledge of the *S. cerevisiae* genome sequence. Nevertheless, recent approaches regarding the 'ome' levels of brewer’s yeast studies can be found in the literature.

Regarding genomics CGH using microarrays was carried out for the diversity and complexity studies of brewer’s yeast genomes. The results showed the diversity of genome composition and possibly occurred hybridisation events between different lager brewer’s yeast strains again suggesting their hybrid genomes (Dunn und Sherlock, 2008). In addition, large segments of the *S. cerevisiae* DNA were found to be absent in lager brewer’s yeast once more confirming the fact that the latter are of aneuploid nature (Bond *et al.*, 2004). Pope *et al.* (2007) combined both microarray and AFLP techniques for the discrimination between various lager strains. The application of AFLP analyses for the genomic fingerprinting and polymorphisms-detection of diverse yeast strains resulted in their relatively good characterisation (Azumi und Goto-Yamamoto, 2001; de Barros Lopes *et al.*, 2002).

Transcriptional profiles of brewer’s yeast during the fermentation process highlighting different points in time were studied by the application of DNA microarrays (Olesen *et al.*, 2002; Pugh *et al.*, 2002; Higgins *et al.*, 2003a; James *et al.*, 2003). So far, these studies have been performed with *S. cerevisiae* gene chips. As the information for the lager genome part is not available using *S. cerevisiae* chip technology two-species microarrays for the detection of the brewer’s yeast transcriptome level have been

developed. Microarray approaches have provided valuable insights according to the involvement of genes in various cellular processes and even for the detection of genes which were expressed under certain conditions or involved in particular pathways and therefore could help to understand the yeast physiology during brewing processes (Higgins *et al.*, 2003b; Blicek *et al.*, 2007).

For the detection of the translated proteins (proteomics) in brewer's yeast strains 2D gel electrophoresis as well as MS techniques have been used. The first proteome maps of lager and ale brewer's yeast were presented by Joubert *et al.* (2000) and Kobi *et al.* (2004). Herein the relatedness between different brewer's yeasts and *S. cerevisiae* and the co-migration of the proteins could be observed. Furthermore, different fermentation stages as the lag and early exponential phase were investigated by proteomics studies to determine the early-induced proteins (Brejning *et al.*, 2005). These proteome analyses allowed the identification of many novel non-*S. cerevisiae* proteins of lager brewer's yeast (Joubert *et al.*, 2001). Although the results obtained via transcriptome analyses concerning the complexity and relation of investigated strains could be confirmed by proteome analyses, the expression levels of the genes and their encoded proteins differed (Brejning *et al.*, 2005). Once again, these findings indicate that the amount of the gene product (protein) cannot be predicted with the aid of the expression signals of the activated genes.

Besides transcriptomics and proteomics also metabolic footprinting methods such as GC/MS have been applied for the discrimination between brewer's yeasts (Pope *et al.*, 2007). Using these powerful tools the researcher is moreover able to characterise various strains concerning their metabolic profile. The obtained information will help to design genetic changes for improving brewer's yeasts and accordingly monitoring the adjustment of industrial fermentation conditions (Penttilä, 2001). Today, for this purpose numerous attempts are described for *metabolic engineering* strategies (Koffas *et al.*, 1999; Dequin, 2001; Nielsen, 2001; Donalies *et al.*, 2008; Nevoigt, 2008).

### **3.3. Emerging problems in brewer's yeast's genetics**

In comparison to euploid yeasts *genetic engineering* of brewer's yeast is much more difficult because of its hybrid genome and aneuploidy respectively. Although overexpressions of specific genes are feasible gene deletions for inactivation of metabolism functions are complicated due to the fact that at least two copies of each genomic part (*S. cerevisiae* and non-*S. cerevisiae*) have to be disrupted. For the

selection of correct clones either four dominant drug markers have to be applied or the marker has to be removed for further use (Kodama *et al.*, 2006). To facilitate genetics for brewer's yeasts and to get a deeper knowledge of cellular regulations, sequencing of their genomes is required. Recently, the genome of the lager brewer's yeast strain WH 34/70 was sequenced (Kodama *et al.*, 2006).

Gene expression analyses for brewer's yeast strains are in general complicated because so far only the *S. cerevisiae* chip technology had been deployed for determining brewer's yeast's transcriptome level (James *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2007). Array-based comparative genomic hybridisation (CGH) approaches failed to differentiate between studied strains as the information for lager brewer's yeast's second genome part cannot be obtained. For a better opportunity to precisely discriminate between lager brewer's yeast strains a two-species microarray has been developed. It is based on the genome sequence of one *S. cerevisiae* strain and contig sequences of one *S. bayanus* var. *uvarum* strain although the sequence of the decoded lager brewer's yeast has not been publicly available (Dunn und Sherlock, 2008). But the exploitation of this two-species microarray could not fully evaluate the genotype of lager brewer's yeast caused by the estimation that the *S. bayanus* sequence which contributed to the lager brewer's yeast genome was about 10% divergent to the sequence of the *S. bayanus* var. *uvarum* strain which provided the basis for the microarray (Dunn und Sherlock, 2008). Another possibility for the detection of brewer's yeasts transcripts is the specific construction of bottom-fermenting yeast oligoarrays (Yoshida *et al.*, 2008). The challenge will be the construction of a multi-species-array for the detection of the sum of brewer's yeast genes.

Also, proteome studies have been hampered due to the lack of the non-*S. cerevisiae* sequences. Only *S. cerevisiae* databases are available which have been used for the identification of found proteins after application of separating gelelectrophoresis and following MS techniques. But, of course, the non-*S. cerevisiae* proteins cannot be distinctly identified with this common methods. For the identification of non-*S. cerevisiae* proteins methods such as tandem MS or nano-electrospray tandem MS/MS are therefore needed which is based on sequence homologies (Joubert *et al.*, 2001; Brejning *et al.*, 2005).

Still there are certain limitations detecting metabolite structures of brewer's yeasts. The interpretation of metabolic studies will be more difficult because one has to consider both the *S. cerevisiae*-derived and the non-*S. cerevisiae* genes having an impact on

the translation into functional proteins. The regulation of the different genomes still remains unclear and thus, the research shall proceed with this goal.

## 4. Conclusion

Applying the global “omics” technologies has already enabled the accumulation of in-depth knowledge about cellular activities of microorganisms. Within these methods it is not only possible to comprise the gene transcripts but also the entirety of metabolites. The combination of the “omics” systems engineering has an enormous potential to provide new and profound insights into biology and illustrates the power of integrating different types of data obtained from the same sample (Griffin *et al.*, 2002). The advancements of the “omics“ technologies will help to get qualitatively and quantitatively well obtained results and offers new perspectives to broaden the understanding of diverse organisms. Such analyses have therefore enabled the development of new products e.g. for medical purposes.

The technologies for the different 'ome' levels have been applied frequently for yeast organisms. Combining these methodologies one is able to get desirable insights from the genotype to the phenotype (Oliver, 2002). Implementing “omics” for further investigations of brewer’s yeasts is much more challenging because of the diversity of their genomes. Since these analyses are based on the current knowledge of the *S. cerevisiae* genome sequence they cannot be simply applied to lager brewer’s yeast studies. Nevertheless, the availability of the whole brewer’s yeast sequence will afford the scientists to carry out comprehensive expression analyses and genome structural analyses (Kodama *et al.*, 2006). Furthermore, the construction of the bottom fermenting yeast DNA microarray will strongly facilitate the enlargement of the basic knowledge. Both the progress of *genetic engineering* and the application of 'ome' analyses have led to the creation of numerous novel brewer’s yeast strains with high benefit for the brewing industry including possibilities to control beer processes and their sustainability. But as long as the connections of (the brewer’s yeast’s *S. cerevisiae* and non- *S. cerevisiae*) genes with their accompanying proteins and metabolites are not entirely clarified the knowledge about the cell as a whole system will remain incomplete.



## **PRAKTISCHER TEIL**

# **Transkriptomanalysen und Modifizierung von Genen des Valinstoffwechsels zur Optimierung von Brauhefen**

## **1. Einleitung**

### **1.1. *Genetic Engineering* von Brauhefen**

Bereits seit Jahrtausenden werden alkoholische Getränke und Backwaren hergestellt. Es ist allerdings erst seit ca. 150 Jahren bekannt, dass Mikroorganismen, insbesondere Hefen, für die Fermentation und Bildung der entsprechenden Metabolite verantwortlich sind. Heutzutage verlässt man sich kaum noch auf eine spontane Gärung, sondern verwendet ausgewählte Hefestämme als Starterkulturen, die ein Produkt jahrzehntelanger Selektion sind. Diese Stämme zeichnen sich durch ihre jeweils typischen Eigenschaften aus, die für den Charakter und die Qualität des Endproduktes (Backwaren, Wein oder Bier) entscheidend sind.

Hefestämme, die bei der Herstellung von Bier zum Einsatz kommen, lassen sich generell in ober- und untergärige Hefen unterscheiden. Über 90% des weltweit hergestellten Bieres werden mit untergärigen Hefen produziert (Kodama *et al.*, 2006). Diese Biere, zu denen auch Pilsener-Biere gehören, werden häufig auch als sogenannte *Lager*-Biere bezeichnet, da sie länger gelagert werden, um den Geschmack des Bieres abzurunden.

Für die Brauindustrie ist es von großer Relevanz, dass ihre Brauhefestämme eine gleichmäßig hohe Produktqualität und einen effektiven, kostengünstigen Herstellungsprozess gewährleisten. Das bedeutet u. a., dass sie bei niedrigen Temperaturen eine

hohe Gärgeschwindigkeit aufweisen, am Ende der Gärung optimal flockulieren und ein ausgewogenes Aromaprofil mit möglichst geringen Mengen an Gärungsnebenprodukten bieten. Diese Eigenschaften lassen sich durchaus in einzelnen Brauhefestämmen finden, jedoch sind nicht alle in einem einzigen Stamm optimal vereint. Daher ist es für Brauereien nach wie vor interessant, ihre Produktionsstämme weiter zu verbessern (Hammond, 1995).

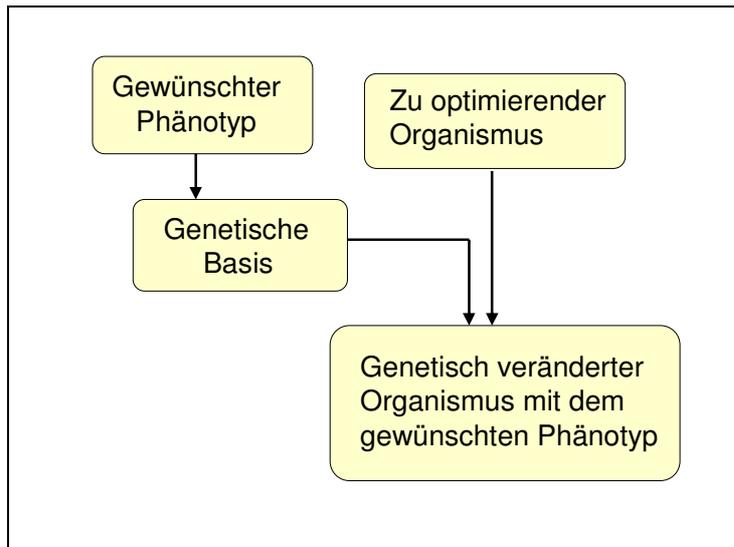
Brauhefen der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe unterscheiden sich von *Saccharomyces cerevisiae* bezüglich ihres Genoms. Nach de Barros Lopes *et al.* (2002) besitzen untergärige Brauhefen ein Hybridgenom, d. h. das Genom dieser Hefen ist aus zwei unterschiedlichen Arten zusammengesetzt. Einer der Vorfahren konnte eindeutig als *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert werden. Über das zweite Genom gibt es bis heute Unstimmigkeiten. Yoshida *et al.* (2007) fanden Hybridgenome, bei denen über 90% des *Saccharomyces*-Teils einer Hybridhefe mit dem *S. cerevisiae*-Genom übereinstimmten. Es war jedoch unklar, welcher Hefe der zweite Teil des Genoms zuzusprechen ist. Neuere Forschungsergebnisse sprechen für *Saccharomyces uvarum* und/oder *Saccharomyces bayanus*, sodass das Genom sogar aus drei Vorfahren zusammengesetzt sein könnte. Es gibt Untersuchungen, die aufzeigen, dass Lagerhefen nur aus *S. uvarum* oder *S. bayanus* oder den entsprechenden Kombinationen mit *S. cerevisiae* bestehen, wobei noch ein vierter „Lager“-Anteil vermutet wird, der zuerst in einer Lagerhefe gefunden wurde und aus *S. uvarum* hervorgegangen zu sein scheint (Rainieri *et al.*, 2006). Gonzalez *et al.* (2008) postulieren darüber hinaus noch weitere, neue Hybride von *S. cerevisiae*, die zur Komplexität der untergärigen Brauhefen beitragen. Die Hybridgenom-Linien, die einen Teil des *S. cerevisiae*-Genoms enthalten, werden nun generell nach Rainieri *et al.* (2006) unter dem Namen *Saccharomyces pastorianus* zusammengefasst.

Normalerweise stellt die Gentechnik ein hervorragendes Werkzeug dar, um Hefen (ungerichtet) zu verändern. Das Hybridgenom untergäriger Brauhefestämme erschwert jedoch ein Eingreifen in den Metabolismus via *Genetic Engineering* (Kodama *et al.*, 2006), weil StoffwechsellLeistungen von beiden Genomen übernommen werden könnten. Überexpressionen einzelner Gene sind durchaus möglich, da Expressionskassetten mit Hilfe von Plasmiden eingebracht werden können. So konnten einige Arbeiten wie z.B. die Erhöhung der Esterbildung während der Bierfermentation oder aber die effizientere Verwertung von Maltose erfolgreich durchgeführt werden (Fujii *et al.*, 1994; Kodama *et al.*, 1995). Deletionen hingegen sind komplizierter umzusetzen, da mindestens zwei Kopien des jeweiligen Gens ausgeschaltet werden müssen, nämlich eine Kopie des *S. cerevisiae*-Genoms und eine

des zweiten Genomanteils der Hybridhefen (*Lagergenom*). Nichtsdestotrotz gab es auch hierfür bereits interessante Ansätze wie z.B. die drastische Erhöhung der Sulfitbildung im Bier (Hansen und Kielland-Brandt, 1996).

Um nun eine Hefe gezielt bezüglich eines gewünschten Phänotyps zu modifizieren, ist es notwendig, die Eigenschaften der relevanten Enzyme oder der für die Enzyme kodierenden Gene zu kennen (Bailey *et al.*, 1990; Nielsen, 2001). Diese Idee verfolgt das traditionelle *Metabolic Engineering (ME)* bzw. *Rational Metabolic Engineering (RME)* (Bailey *et al.*, 2002), welches sich mit der Verbesserung von zellulären Aktivitäten durch die Veränderung der Enzym-, Transport- oder Regulationsmechanismen beschäftigt. Es gibt bisher zahlreiche Versuche, Brauhefen mit Hilfe des *RME* zu optimieren, die in verschiedenen Abhandlungen zusammengefasst wurden (Koffas *et al.*, 1999; Dequin, 2001; Nielsen, 2001; Donalies *et al.*, 2008; Nevoigt, 2008). Obwohl es durchaus positive Ergebnisse zu verzeichnen gab, führten die Veränderungen im Metabolismus oftmals zu Unausgewogenheiten, die sich in unerwünschten geschmacksrelevanten Nebenprodukten oder zellphysiologischen Auswirkungen äußerten. Ein Beispiel hierfür ist die Minderung der Ethanolproduktion, die unerwarteterweise mit einer übermäßigen Acetoinbildung einherging und in Geschmacksverfälschungen resultierte (Nevoigt *et al.*, 2002). Diese unerwünschten Nebeneffekte treten auf, weil die Metabolitflüsse der Zelle in ihrer Komplexität bisher noch nicht komplett verstanden sind. Das Wissen über die Wege vom Gen zum Protein und weiter zu den Metaboliten ist jedoch für das Verständnis des „Systems Zelle“ entscheidend (Förster *et al.*, 2003).

Um den Problemen des *RME* entgegenzutreten, wurde eine Strategie entwickelt, die auch als *Inverse Metabolic Engineering (IME)* bezeichnet wird. Dieser Begriff wurde von Bailey *et al.* (2002) geprägt und umfasst die folgenden drei Schritte: 1. die Identifizierung relevanter physiologischer Eigenschaften, 2. die Bestimmung der genetischen Basis für diese Eigenschaften und 3. die Entwicklung von Methoden für die gezielte Optimierung eines ausgewählten Hefestammes. Das *IME*, dessen Prinzip in Abbildung 1 dargestellt ist und kein Vorwissen über Stoffwechselwege bzw. Enzymkinetiken erfordert, stellt eine völlig neuartige Herangehensweise dar, um Brauhefestämme zu optimieren. Sauer und Schlattner (2004) betonten, das *IME* bedeute nichts anderes als das Nutzen der „Prinzipien der Natur“ für gezielte Modifizierungen mit Hilfe des *ME*.



**Abbildung 1:** Strategie des *Inverse Metabolic Engineering* modifiziert nach Bailey *et al.* (2002).

Ein entscheidender Faktor beim *IME* ist die zuverlässige Detektion der genetischen Basis für physiologische Unterschiede. Mit der Transkriptomanalyse (z.B. Microarray-Technologie) kann man die Expression von sehr vielen Genen eines Organismus gleichzeitig erfassen. Dabei wird die mRNA-Menge nachgewiesen, die anschließend in ein Protein mit einer speziellen Funktion in der Zelle (z.B. Enzym) umgeschrieben werden kann. Vergleicht man nun z.B. zwei *S. cerevisiae*-Hefestämme mit unterschiedlicher Merkmalsausprägung, wird man Unterschiede in der Expression einzelner Gene finden. Die identifizierten Gene stellen Kandidaten dar, die Ansatzpunkte für die gezielte genetische Veränderung hinsichtlich einer physiologischen Eigenschaft (*Target*) liefern können.

Genexpressionsanalysen von untergärigen Brauhefen sind aufgrund des Hybridgenoms (s. o.) komplizierter, weil möglicherweise Gene auftreten, die mit dem eigentlichen *Target* nichts zu tun haben. Bisher konnte man für Transkriptomanalysen von untergärigen Brauhefen nur Microarrays einsetzen, die für *Saccharomyces cerevisiae*-Hefen zugeschnitten sind (James *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2007). Dies ist aber ein akzeptabler Kompromiss, da die Homologien zwischen den *Saccharomyces cerevisiae*-Genen und den Nicht-*Saccharomyces cerevisiae*-Allelen in untergärigen Brauhefen ca. 80% betragen (James *et al.*, 2003). Transkriptom-Analysen von untergärigen Brauhefen mit *Saccharomyces cerevisiae*-Microarrays liefern daher tatsächlich gute Ergebnisse bei der Auffindung differentiell exprimierter Gene, beispielsweise während einer Biergärung. Es gibt mittlerweile einige Arbeiten, bei denen verschiedene Gärzeitpunkte untersucht und deren Expressionsmuster speziell

in frühen Gärphasen miteinander verglichen wurden (Olesen *et al.*, 2002; Higgins *et al.*, 2003a; James *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2007).

Natürlich sind der Expressionsanalyse von Brauhefen mit *S. cerevisiae*-Chips Grenzen gesetzt, da die Informationen des Lagergenoms verborgen bleiben und man den Verlust dieser hinnehmen muss. Außerdem lässt sich mit Hilfe der Expressionssignale der angesprochenen Gene nicht vorhersagen, ob bzw. wie viel Genprodukt (Protein) letztendlich an der Katalyse der Stoffwechselwege beteiligt ist. Die Wahrscheinlichkeit ist recht hoch, dass die nachgewiesene mRNA-Menge mit der Proteinbildung korreliert. Es kann aber durchaus sein, dass Transkriptomanalysen keine Hinweise zur Aufdeckung der Metabolitflüsse spezieller Stoffwechselwege liefern.

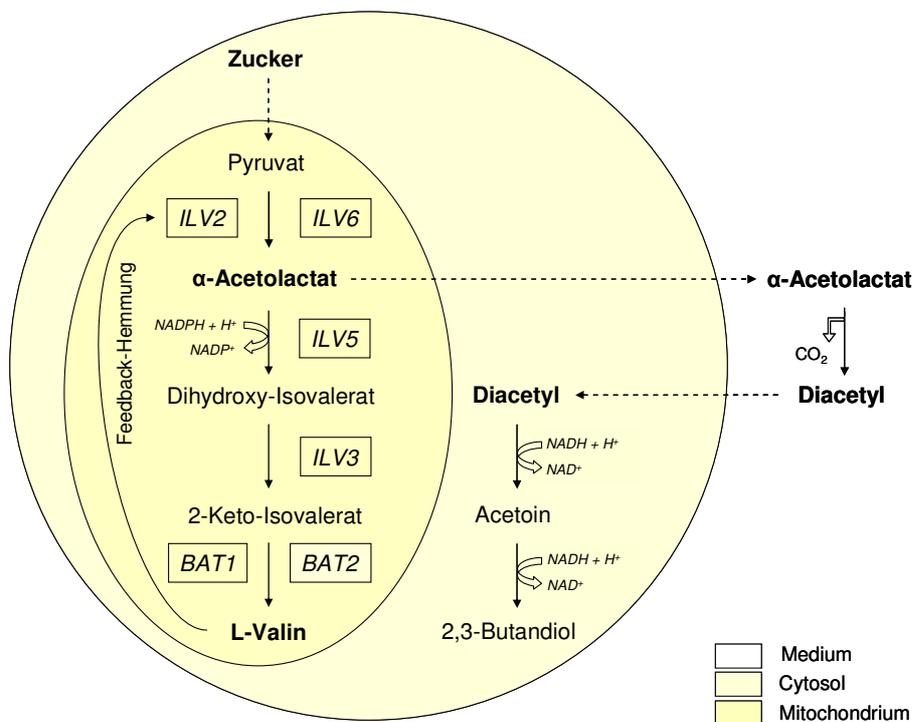
Die Aufzeichnung des Transkriptoms ermöglicht es jedoch, eine Relation zwischen Veränderungen des Phänotyps und des Genotyps eines Organismus herzustellen (Gill, 2003). Tatsächlich konnten mit dieser Herangehensweise bereits sichtbare Erfolge hinsichtlich der Optimierung von Mikroorganismen erzielt werden (Übersichtsartikel (Bro und Nielsen, 2004). Auch für die Hefe *S. cerevisiae* gibt es aktuelle Beispiele der erfolgreichen Anwendung von *IME* für die Stammoptimierung (Bro *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2005; Gorsich *et al.*, 2006; Petersson *et al.*, 2006; Cordier *et al.*, 2007).

Allerdings gibt es nur einen Forschungsansatz, Brauhefestämme mittels *IME* zu verbessern. So konnte die Sulfitproduktion stark erhöht werden (Yoshida *et al.*, 2008). Sulfit ist ein Antioxidans, welches das Bier vor der Bildung sogenannter Alterungscarbonyl und somit vor Veränderungen des Aromaprofils schützt (Kristan, 2009).

Eines der wichtigsten wirtschaftlich relevanten Optimierungsziele in Bezug auf untergärig gebraute Biere stellt die Verkürzung der Lagerzeit dar. Einer der wesentlichen Gründe für die Notwendigkeit der Lagerung ist der Abbau eines unerwünschten Nebenproduktes, des Diacetyls. Dieses wird während der Wachstumsphase der Hefe spontan in einer oxidativen Decarboxylierung aus  $\alpha$ -Acetolactat und nicht enzymkatalysiert gebildet.  $\alpha$ -Acetolactat ist ein Zwischenprodukt in der Valin/Leucinbiosynthese und gelangt während der Biergärung in das Medium (Abbildung 2). Die Bildung dessen aus Pyruvat wird durch die Acetolactatsynthase (*ILV2*) katalysiert. Das *ILV2*-Protein besitzt mit dem Produkt des Gens *ILV6* eine regulatorische Untereinheit, welche die Aktivität des Enzyms im ersten Schritt der Aminosäuresynthese verstärkt. Während die Acetolactat-Reductoisomerase (*ILV5*) das  $\alpha$ -Acetolactat zu Dihydroxy-Isovalerat reduziert, katalysiert die Dihydroxysäure-Dehydratase (*ILV3*) die Reduktion zu 2-Ketoisovalerat unter Wasserabspaltung. Der Transfer der Aminogruppen zwischen der  $\alpha$ -Ketosäure und der

Aminosäure wird durch die Enzyme katalysiert, für welche die Gene *BAT1* und *BAT2* kodieren. Die  $\alpha$ -Ketosäure ist die letzte Stufe vor der Bildung der Aminosäure Valin. Die Seitenketten-Aminosäure Valin wird ebenso wie Leucin und Isoleucin in den Mitochondrien der Hefe synthetisiert.

Diacetyl hat einen butterartigen, ranzigen Geschmack, der schon ab 0,1 ppm im Bier zu schmecken ist (Hammond, 1995). Um das Diacetyl abzubauen und so einen Bierfehlgeschmack zu vermeiden, ist die sogenannte Nachgärung (Lagerung) von mehreren Wochen erforderlich. Dabei wird das Diacetyl enzymatisch zu den Produkten Acetoin und 2,3-Butandiol reduziert (Abbildung 2), deren Geschmacksschwellenwerte aber weitaus höher liegen. Für diese Reduktion kommen fünf Enzyme in Frage (Ehsani), darunter die Butandioldehydrogenase (BDH1), welche nicht nur Acetoin, sondern auch das vorangegangene Diacetyl reduzieren kann (Heidlas und Tressl, 1990).



**Abbildung 2:** Diacetylproduktion durch Hefe. *ILV2*: Acetylactatsynthese, *ILV3*: Dihydroxysäure-Dehydratase, *ILV5*: Acetylactat-Reductoisomerase, *ILV6*: Regulatorische Untereinheit des *ILV2*, *BAT1*: Aminosäure-Transferase, *BAT2*: Aminosäure-Transaminase.

Bei Brauefestämmen gibt es merkbare Unterschiede in der Diacetylproduktion während einer Fermentation. Einige Hefen weisen einen hohen Gehalt an Diacetyl auf, andere hingegen produzieren so wenig Diacetyl, sodass die gebildete Menge sogar unter dem Geschmacksschwellenwert liegt. Diese vergären dann aber beispielsweise

die gegebenen Zuckerquellen in der Würze nicht vollständig, wodurch solche Hefen dennoch nicht für eine optimale Biergärung geeignet sind.

Um die Diacetylbildung von Hefen auf rationalem Wege und mit genetischen Methoden zu senken, gab es in der Vergangenheit bereits unterschiedliche Ansätze (Ostergaard *et al.*, 2000; Dequin, 2001; Vanderhaegen *et al.*, 2003). Beispielsweise wurde ein bakterielles Gen, welches für ein Enzym namens  $\alpha$ -Acetolactat-Decarboxylase (ALDC) kodiert, aus verschiedenen Spezies kloniert und in die Hefe eingeführt (Goelling und Stahl, 1988; Yamano *et al.*, 1994a; Yamano *et al.*, 1994b; Yamano *et al.*, 1994c). Dieses Enzym ist in der Lage,  $\alpha$ -Acetolactat direkt in Acetoin zu decarboxylieren. Diese genetische Modifikation führte zu einer erheblichen Verminderung der Diacetylproduktion während der Gärungen (Yamano *et al.*, 1995). Durch das Einführen bakterieller Gene, beispielsweise unter Kontrolle spezifischer Promotor wie des Alkoholdehydrogenase (*ADH1*)-Promotors, konnte die Bildung des unerwünschten Nebenprodukts ebenfalls reduziert werden, sodass eine Nachgärung nicht mehr nötig war (Onnela *et al.*, 1996). Für die Einführung von artfremden Genen in einen Organismus, der zur Lebensmittelherstellung eingesetzt wird, fehlt jedoch bisher die Akzeptanz der Verbraucher. Dies gilt besonders für die Brauhefe.

Die Gentechnik stellt andererseits eine sehr effiziente Methode dar, um in der Industrie verwendete Mikroorganismen zu optimieren. Ein Kompromiss ist die sogenannte „Selbstklonierung“, bei welcher sich die genetischen Veränderungen ausschließlich auf eine Neukombination von arteigenen Genen beschränken. Dieser Ansatz stellt die erste Möglichkeit dar, genetisch veränderte Organismen kommerziell für die Herstellung von Lebensmitteln zu verwenden (Gentechnikgesetz, 1990. Letzte Änderung vom 01.04.2008; Akada, 2002) und wurde in Japan und den USA bereits angenommen. Versuche, die Diacetylbildung in Brauhefen ohne das Einbringen hefefremder Gene zu drosseln, schlossen beispielsweise die Deletion von *ILV2* und die Überexpression von *ILV5* ein (Gjermansen *et al.*, 1988; Mithieux und Weiss, 1995; Liu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Mit diesen Strategien wurde (bis zu 70%) weniger Diacetyl gebildet. Allerdings waren die erzeugten Stämme Valin- und Leucin-auxotroph, d. h. dass sie ohne eine Zugabe dieser Aminosäuren nicht wachsen konnten. Daher kommen diese für eine Verwendung in der Brauindustrie nicht in Frage. Ziel ist es, das Diacetyl zu reduzieren, ohne die Hefestämme physiologisch zu verändern. Mit dem *Inverse Metabolic Engineering* bietet sich die Möglichkeit, die Expressionshöhen der Gene des relevanten Stoffwechselweges aufzuzeigen, um anschließend direkt in diesen einzugreifen. In Bezug auf die Anwendung des *IME* liegen bis dato keine internationalen Forschungsarbeiten vor, bei denen

Expressionsanalysen mit nachfolgenden Selbstklonierungen einer Hefe durchgeführt wurden, um die Diacetylproduktion im Bier zu senken. Allerdings wurden im eigenen Institut parallel Forschungen durchgeführt, bei denen die *ILV6*-Allele ausgeschaltet wurden und ein Abfall des Diacetyls während der Hauptgärung einer Brauhefe erzielt werden konnte (Duong, 2009). Um die Funktionalität weiterer potentieller *Target*gene zu analysieren, sollte daher die Herangehensweise des *IME* für weitere erfolgreiche Ansätze eingesetzt werden.

## 1.2. Problemstellung

Übergeordnetes Ziel besteht in der Optimierung von Brauhefen im Rahmen des *Inverse Metabolic Engineering*. Diesbezüglich ergeben sich folgende Fragestellungen: Können physiologische Differenzen von verschiedenen Brauhefen mit dem Expressionslevel der am jeweiligen Stoffwechsel beteiligten Gene korreliert werden? Kann das gewonnene Wissen bezüglich der genannten Korrelation auf einen Brauefestamm übertragen werden? Das *proof of concept* soll am Beispiel der Diacetylproduktion erbracht werden. Die Bildung dieses störenden Gärnebenprodukts soll durch die gezielte Modifizierung von potentiellen *Target*genen, die mittels Transkriptomanalysen identifiziert werden sollen, in einer industriell relevanten Brauhefe gesenkt werden. Von großer Relevanz ist dabei die Bedingung, keine artfremden Gene einzuführen, sodass eine Selbstklonierung vorliegt (Gentechnikgesetz, 1990. Letzte Änderung vom 01.04.2008). Das Hefewachstum und weitere für die Qualität des Bieres wichtige Geschmacksparameter sollen außerdem durch die genetischen Veränderungen nicht negativ beeinflusst werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien, Antibiotika

<b>Substanzen</b>	<b>Hersteller</b>
Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ampicillin	Roth, Mannheim
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
dNTPs	Roche, Mannheim
EDTA	Sigma, Steinheim
Ethanol	Likörfabrik am Institut für Gärungsgewerbe, Berlin
Geneticin G418 Sulphate	Invitrogen, Karlsruhe
100bp plus DNA ladder mix	Bioneer, Alameda, CA/USA
Massruler Low Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Glukose	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	Serva, Heidelberg
HEPES free acid	Serva, Heidelberg
Heringsperma-DNA	Flika 31162
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Ligationspuffer	Promega, Madison
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma, Steinheim
Manganchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fluka, Steinheim
Natriumhydroxid	Fluka, Steinheim
Nourseothricin (ClonNAT)	Werner BioAgents, Jena
Phenol	Sigma, Steinheim
PCR-Puffer	Roche, Mannheim
SDS	Roche, Mannheim

Tris-HCl	Invitrogen, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, Steinheim
Trypton	Serva, Heidelberg

## 2.2. Enzyme

T4 DNA Ligase /Ligationspuffer	Bioneer, Alameda, CA/USA
NEB2 Puffer	New England Biolabs
<i>NotI</i>	New England Biolabs
Phusion-Polymerase	New England Biolabs
TOP Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
<i>SacI</i>	New England Biolabs

## 2.3. Kitsysteme

Accu Prep <sup>®</sup> Plasmid Extraction Kit	Bioneer, Alameda, CA/USA
Accu Prep <sup>®</sup> PCR Purification Kit	Bioneer, Alameda, CA/USA
Plasmid Isolation Kit	Fermentas, St. Leon-Rot

## 2.4. Plasmide

pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector System	Promega, Madison
---	------------------

Dieses High-copy number-Plasmid enthält die Promotoren *T7* und *SP6*, die eine *multiple cloning region* flankieren. Diese enthält Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme, z.B. *NotI* oder *SacI*. Außerdem vermittelt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion von *E.coli*-Transformanden ( $Amp^r$ ). Bei dem pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector handelt es sich um einen T-Vektor. Dies bedeutet, dass T (Thymin-Triphosphat)-Nukleotid-Überhänge vorhanden sind, sodass ein PCR-Produkt mit A (Adenosin-Triphosphat)-Nukleotid-Überhängen direkt an den gewünschten Vektor binden kann.

pYCGPY2 (Kodama *et al.*, 2001)

Das Centromer-Plasmid enthält eine Hefe-Centromer-Sequenz (*CEN4*), einen Replikationsursprung für Hefen und den Pyruvatkinase-Promotor (*PYK1*) für das einzubringende Gen. Außerdem trägt das Plasmid das Gen *kanMX* des *E. coli*

Transposons *Tn903*, welches in transformierten Hefezellen die Resistenz gegenüber dem Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin G418 und in *E. coli* gegenüber Kanamycin vermittelt. Der *TDH3p* (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase)-Promotor und der dazugehörige Terminator *TDH3t* schließen die G418-Resistenz ein. Zusätzlich vermittelt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion von *E. coli*-Transformanten ( $Amp^r$ ).

Das Plasmid pYCGPY2 (Referenzplasmid ohne Gen) und die Plasmide, welche das jeweilige Gen des Lager-Genomteils *LgBAT1* und *LgBAT2* (pYCGPY2+*LgBAT1*, pYCGPY2+*LgBAT2*) des Brauhefegenoms tragen, wurden von Suntory<sup>®</sup> Ltd./Osaka, Japan zur Verfügung gestellt.

pNatCre (Steensma und ter Linde, 2001)

Dieses Plasmid enthält die Cre-Rekombinase, mit welcher es möglich ist, Antibiotikaresistenzen, z.B. gegen Geneticin, aus dem Genom eines Mikroorganismus<sup>´</sup> zu entfernen, um weitere Vektoren zu integrieren, die den gleichen Selektionsmarker tragen. Dabei ist die Sequenz für die Antibiotikaresistenz auf einer *loxP-kanMX-loxP*-Kassette verankert, die homolog in das Genom integriert. Dadurch können Gene spezifisch ausgeschaltet werden. Bei Entfernen der Resistenz durch die Cre-Rekombinase bleibt nur ein *loxP*-Stück zurück, sodass der Marker erneut verwendet werden kann (Gueldener *et al.*, 1996). Die Cre-Rekombinase steht unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors. Außerdem besitzt das Plasmid neben der  $\beta$ -Lactamase auch eine *natMX*-Kassette mit dem Dominanzmarker *nat*, sodass die Hefe eine Resistenz sowohl gegen Ampicillin ( $Amp^r$ ) als auch gegen das Antibiotikum Nourseothricin (ClonNAT) ausbildet.

Das Plasmid wurde von Frau Claudia Stamme, Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt/Main zur Verfügung gestellt.

## 2.5. Primer (Oligonukleotide)

Die in Tabelle 1 dargestellten Primer wurden von der Firma Metabion GmbH synthetisiert und für DNA-Amplifikationen mittels PCR verwendet. Blau markierte Bereiche der Primer kennzeichnen den für die Amplifizierung bzw. das Annealing während der PCR wichtigen Bereich. Eingeführte Restriktionsstellen (*NotI*: 5'-G C<sup>^</sup>GGCCGC-3'; *SacI*: 5'-GAGCT<sup>^</sup>C-3') sind rot hervorgehoben.

**Tabelle 1:** Verwendete Primer.

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	Anwendung
1, Fw-Sc-BAT1	GCGGAGCTCAAAAATGTCTTTGCAGAGACATTCCT	Forward Primer für die Amplifizierung der <i>S. cer.</i> BAT-Gene
2, Fw-Sc-BAT2	GCGGAGCTCAAAAATGTCTACCTTGGCACCCCTA	
3, Rv-Sc-BAT1	GCGGGGGCCGTTAGTTCAAGTCGGCAACAG	Reverse Primer für die Amplifizierung der BAT-Gene ( <i>S. cer.</i> ) und zur Plasmidkontrolle*
4, Rv-Sc-BAT2	GCGGGGGCCGCTCAGTTCAAATCAGTAACAACC	
5, Fw2-ILV6diag	ATATGGAAGTACATAGTTTCG	Primer für die Kontrolle des Antibiotikaresistenz-Verlustes des Stammes $\Delta\Delta ILV6$ (Duong, 2009)
6, Rv-ILV6del-diag	TTCGGCGACCAATTCTTG	
7, Rev.-LagerBAT1	GACGAACGGCCTTGAAACCGG	Forward und Reverse Primer zur Plasmidkontrolle*
8, Rev.-LagerBAT2	GCAAGGAGCATAGTTGGCGCCC	
9, Fw-Kanamycin-resistance2	GGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTG	*: Kontrolle, ob die Gene <i>ScBAT1</i> , <i>LgBAT1</i> , <i>ScBAT2</i> und <i>LgBAT2</i> in das jeweilige Plasmid (pGEM-T <sup>®</sup> Easy, pYCGPY2) integriert wurden
10, Rev-Kanamycin-resistance2	CACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGC	

## 2.6. Stämme

Die während dieser Arbeit verwendeten Stämme der jeweiligen Mikroorganismen sind in Tabelle 2 dargestellt. Diese wurden von der Stammsammlung des Fachgebiets für Mikrobiologie und Genetik der TU-Berlin und von Dr. Truong Nam Hai des Vietnam National Centre for Natural Science And Technology zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2:** Verwendete Mikroorganismen.

Mikroorganismus	Stamm	Merkmale
<i>Escherichia coli</i> (Bakterium)	DH5 $\alpha$	<i>fhuA2</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> ); <i>U169</i> ; <i>phoA</i> ; <i>glnV44</i> ; $\Phi 80$ ; $\Delta$ ( <i>lacZ</i> ) <i>M15</i> ; <i>gyrA96</i> ; <i>recA1</i> ; <i>relA1</i> ; <i>endA1</i> ; <i>thi-1</i> ; <i>hsdR17</i>
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> Laborbezeichnung	Sa-06136 1000 A	untergärige Brauhefe; übliche Produktionshefe deutscher Brauereien
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> Laborbezeichnung	Sa-06168 H06 B	untergärige Brauhefe
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> Laborbezeichnung	Sa-06165 1000-22 C	untergärige Brauhefe; aus Stamm A hervorgegangen
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> Laborbezeichnung	Sa-06167 Sc. DN D	untergärige Brauhefe; Isoliert aus vietnamesischer Brauerei
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> Laborbezeichnung	Sa-07310 Hebru E	untergärige Brauhefe; übliche Produktionshefe deutscher Brauereien
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> Laborbezeichnung	Sa-06143 W34/70 F	untergärige Brauhefe; übliche Produktionshefe deutscher Brauereien
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> $\Delta\Delta ilv6$ Laborbezeichnung	C	untergärige Brauhefe; <i>ILV6</i> -Kopien sind deletiert, enthält <i>loxP-G418-loxP</i>

## 2.7. Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung

Die hergestellten Nährmedien und Lösungen wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Die Zugabe von sterilfiltrierten oder in Ethanol gelösten Antibiotika erfolgte steril nach dem Autoklavieren unter der Cleanbench.

### *E. coli* DH5 $\alpha$ :

Die Anzucht dieses Bakterienstammes erfolgte in LB (Luria-Bertani)-Vollmedium bei einer Temperatur von 37 °C auf einem Reziproschüttler bei 180 rpm. Für die Selektion und Anzucht von *E. coli*-Transformanten wurde dem Medium nach dem Autoklavieren

das in 50%-igem Ethanol gelöste Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 150 µg/ml zugesetzt.

Zur Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen wurde der Bakterienstamm in SOB-Medium angezüchtet.

LB-Medium (Luria-Bertani):

0,5% Hefeextrakt, 1% Natriumchlorid, 1% Trypton, pH-Wert = 7,0

SOB-Medium:

2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

Magnesiumchlorid und Magnesiumsulfat wurden erst nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Brauhefen *S. carlsbergensis* 1000, 1000-22, H06, W34/70, Hebru, S.c. DN:

Die Anzucht der Hefen erfolgte in YEPD-Medium bei einer Temperatur von 30 °C auf einem Reziproschüttler bei 150-170 rpm.

Brauhefe *S. carlsbergensis* Sa-06165:

Für die Klonierungsarbeiten erfolgte die Anzucht der plasmidhaltigen Brauhefe-Transformanten in YEPD-Medium mit Selektionsmarker in Erlenmeyerkolben bei einer Temperatur von 30 °C auf einem Reziproschüttler bei 150-170 rpm. Dem Medium wurde das nach dem Autoklavieren in Wasser gelöste, sterilfiltrierte Antibiotikum Geneticin G418 in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Für die Selektion der Hefeklonen, welche die Resistenz gegen Geneticin verloren haben, wurden diese in YEPD-Medium angezogen. Das Medium enthielt das in Wasser gelöste und sterilfiltrierte Antibiotikum Nourseothricin mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml.

YEPD-Medium:

1% Hefeextrakt, 2% Glukose, 2% Trypton, pH = 6,3

Für die Herstellung der jeweiligen Festmedien wurden 1,5% Agar-Agar zugesetzt.

Für eine dauerhafte Aufbewahrung der jeweiligen Kultur wurde 1 ml einer Flüssigkultur mit 0,3 ml 99,5%-igem Glycerol in einem Kryoröhrchen versetzt (Glycerolkultur) und bei -70 °C konserviert.

## **2.8. Bierfermentationen**

### **2.8.1. Hefepropagation, Anstellen, Schlauchen, Lagerung**

Zur Fermentation unter brauereirelevanten Bedingungen wurden die verwendeten untergärigen Brauhefestämme zunächst in einer Vorkultur in gehopfter Würze mit einem Extraktgehalt von 11,5% angeimpft (30 ml, 300 µl einer Glycerolkultur). Anschließend wurden 500 ml der gleichen Würze mit einer Zellzahl von etwa 5 Mio. Zellen/ml Würze angeimpft. Ein weiterer Impfschritt wurde dann in 5 l-Gefäßen mit einer Zellzahl von 10 Mio. Zellen/ml Würze vorgenommen. Die Kulturen wurden bei 24 °C geschüttelt. Nachdem die Hefen bis zu einer Zellzahl von etwa 100 Mio. Zellen/ml gewachsen waren, wurden diese zusammen mit 17-21,5 l Medium (je nach Hefewachstum für gleiche Anstellzahl) in 30 l-zylindronische Tanks (ZKT) gegeben (sogenanntes „Anstellen“). Anschließend wurde noch einmal mit Sterilluft (entölt, entwässert und gefiltert) belüftet. Die Kühlung für die ca. 8-10 Tage dauernden Fermentationen wurde auf 11 °C eingestellt. Täglich wurden Proben zur Kontrolle der Gärungen (pH-Wert, Zahl der Zellen in der Schwebel, Extraktgehalt) und zur Messung des Gärungsnebenprodukts Diacetyl genommen. Nach Abfällen des Extraktes auf 3,5 - 2,5% wurden die Biere von den Tanks abgezogen (sogenanntes „Schlauchen“) und in Kegs gefüllt. Die Fässer wurden nochmals zwei Tage bei Raumtemperatur gelagert, um den Diacetylabbau (Diacetylrest) zu beschleunigen. Abschließend erfolgte eine zwei- bis vierwöchige Lagerung bei 0 °C. Nach abgeschlossener Lagerung wurden die Biere zu 0,5 l in Flaschen abgefüllt und deren Gehalte an höheren Alkoholen, Estern und niederen Fettsäuren bestimmt. Zusätzlich wurden sensorische Analysen zur Bewertung der Qualität der Biere durchgeführt.

Für jeden Stamm wurden drei unabhängige Gärungen unter Nutzung zwei verschiedener Sude (Malz der Firmen Weyermann bzw. Weissheimer) durchgeführt. Für die erste Gärung wurde das Weissheimer-Malz, für die zweite und dritte Gärung das Malz der Firma Weyermann verwendet. Bei den Kontrollfermentationen wurde Pilsener-Malz eingesetzt.

### **2.8.2. Extraktgehalt, Zellzahl, pH-Wert**

Die Bestimmungen des Extraktgehaltes, der Konzentration der Zellen in der Schwebel (Zellzahl) und des pH-Wertes wurden während der Hauptgärung täglich (24 h Abstand) wiederholt.

Der Extraktgehalt der jeweiligen Proben wurde mit einem Biegeschwinger (Beer-Analyzer, Paar, Österreich) gemessen. Dazu wurden die Proben über einem Filtrierpapier filtriert und in die entsprechenden gerätespezifischen Gefäße umgefüllt.

Die Bestimmung der Konzentration der Zellen in Schwebel in den jeweiligen Gäransätzen erfolgte mittels Auszählen in einer Thoma-Kammer. Die Proben wurden jeweils so verdünnt, dass pro Kleinquadrat 30 - 80 Zellen gezählt wurden. Die Berechnung der Zellen/ml erfolgte nach folgender Formel:

$$N = \text{Zellen} \cdot 10^6 \cdot \text{VF}/4 .$$

N... Zellzahl/ml

VF...Verdünnungsfaktor

Der pH-Wert der jeweiligen Bierproben wurde nach 10 minütigem Entkohlensäuern von 50 ml Bier im Ultraschallbad mit Hilfe einer pH-Elektrode gemessen. Diese wurde vorher mit Standardlösungen pH = 4,0 und pH = 7,4 kalibriert.

### **2.8.3. Diacetyl**

Die Analyse des Diacetyls im Bier wurde nach der Methode der MEBAK (Vicinal Diketone – GC/ECD-Headspace-Methode, Band III, 1.2.1, 1996) vorgenommen. Es wurden je Probe zwei Ansätze à 10 ml vorbereitet. Je nach zu erwartendem Diacetylgehalt wurden die Proben entsprechend verdünnt (1:2, 1:5). Zusätzlich wurden je Probengefäß (vial) 4 g NaCl eingewogen, um die Löslichkeit der Probe zu erhöhen. Es wurde mit einem internen Standard (IS, Hexandion, Einwaage ca. 250 mg/50 ml) gearbeitet. Es wurden 500 µl dieser Stammlösung auf 50 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. Von dieser Gebrauchslösung wurden 20 µl zu 10 ml Probe gegeben, sodass 0,1 ppm IS im vial enthalten waren. Ebenso wurde eine Kalibrierreihe über mindestens vier Kalibrierpunkte (0,005 - 0,2 ppm) sowohl mit dem IS als auch Diacetyl mit entsprechenden Mengen an Chemikalien aus den Stammlösungen (jeweils ca. 250 mg/50 ml) angesetzt. Nach Umsetzen des α-Acetylactats zu Diacetyl im Wasserbad (90 min, 60 °C) wurden diese Lösungen zur GC-ECD eingesetzt. Nach Auswertung der

Ergebnisse wurden diese auf die exakte Einwaage des Standards bezogen, um die Gehalte an Diacetyl im Endbier zu bestimmen.

#### **2.8.4. Höhere Alkohole, Ester und niedere Fettsäuren**

Die Endbiere wurden auf höhere Alkohole, Ester und niedere Fettsäuren nach der MEBAK-Methode (Band III, 1.1.1, 1.1.4, 1996) im Zentrallabor der VLB Berlin untersucht.

#### **2.8.5. Sensorik**

Die Biere wurden im Zentrallabor der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei Berlin verkostet. Zur Einstufung der sensorischen Qualität wurden Geruch, Reinheit des Geschmacks, Vollmundigkeit, Rezenz und Qualität der Bittere bewertet.

### **2.9. Transkriptomanalyse**

Während der Hauptgärungen (siehe 2.8.) wurden Proben bei einem Extraktgehalt von 8% und 6% genommen. Die Zellen (mind.  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml) wurden abzentrifugiert (4500 rpm, 4 °C, 3 min) und bei -70 °C konserviert. Die gefrorenen Zellpellets wurden auf Trockeneis zur weiteren Untersuchung zur Firma Asuragen Inc., Austin, Texas geschickt. Die RNA-Isolation wurde von Asuragen Inc. entsprechend dem Methodenhandbuch RiboPure™-Yeast Instruction Manual ([http://www.ambion.com/techlib/prot/fm\\_1926.pdf](http://www.ambion.com/techlib/prot/fm_1926.pdf)) durchgeführt. Anschließend wurden die Microarray- bzw. Single Channel-Analysen durchgeführt. Es wurden Affymetrix® Yeast Genome 2.0 Gene Chips verwendet, die nach dem Standardprotokoll ([http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression\\_manual.affx](http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx)) beladen wurden. Asuragen gebraucht das Affymetrix Integrated GeneChip® System mit dem Hybridisierungssofen 640, die Fluidics Station 450, den GeneChip® Scanner 3000 7G und die dazugehörige Affymetrix® GeneChip® Operating System Software (<http://www.affymetrix.com/index.affx>).

Anschließend wurden Analysen zur Statistik durchgeführt. Die Signalintensitäten wurden summiert und mit Hilfe des Affymetrix MAS 5.0 Algorithmus auf einen Wert von 500 normalisiert und logarithmiert. Die Gruppen wurden mit One-Way ANOVA und False Discovery Rate (FDR, Benjamini & Hochberg, 1995) bei einer

Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.05 getestet. Die Idee der ANOVA ist, dass jegliche Unterschiede zwischen den Mittelwerten durch die Standardabweichungen zwischen den Stichproben (der Signale) reflektiert werden sollten. Die FDR wird durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine Gene als signifikant differentiell exprimiert klassifiziert werden, wenn sie es nicht sind. Als signifikant differentiell exprimiert wurden die Gene gewertet, die eine  $\log_2$ -ratio von  $\geq +1$  für höher exprimierte Gene oder  $\leq -1$  für niedriger exprimierte Gene zeigten. Nach Abschluss der grundlegenden Untersuchungen konnten die Daten mit Hilfe von Bioinformatik-Programmen und Gendatenbanken (SGD, KEGG, Babelomics-Tools) ihren zellbiologischen Funktionen und den Biosynthesewegen zugeordnet werden, in welche sie involviert sind.

## 2.10. DNA-Isolierungen

### 2.10.1. Minipräparation von Plasmid-DNA

Plasmidtragende *E.coli*-Zellen einer Kolonie wurden in 4 ml LB-Medium unter selektiven Bedingungen (150  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin) über Nacht in 5 ml Zentrifugenröhrchen unter Schütteln bei 37 °C und 180 rpm angezchtet. In einem Eppendorfgefäß wurden 1,5 ml der Kultur 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  Lösung a aufgenommen und kurz gevortext. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Lösung b wurde das Eppendorfgefäß vorsichtig zum Mischen der Probe 3x invertiert, um die Bakterien zu lysieren. Eine erfolgreiche Lyse der Zellen ist an der leicht schleimigen Konsistenz der Probe zu erkennen (beim vorsichtigen Öffnen des Eppendorfgefäßes sind Schleimfäden zu erkennen). Anschließend wurde 150  $\mu\text{l}$  Lösung c dazugegeben. Zum Mischen wurde das Eppendorfgefäß 3x invertiert. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Phenol wurde die Probe 1 min gevortext und anschließend für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der klare, wässrige Überstand mit 500  $\mu\text{l}$  Chloroform/Isoamylalcohol (24/1) versetzt und gut gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C wurde die obere, wässrige, DNA-haltige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es sollte möglichst nichts von der Interphase und der organischen Phase mitgenommen werden. Durch eine anschließende Alkoholfällung wurden Phenolreste entfernt und die Plasmid-DNA konzentriert. Zur Fällung wurde der abgenommene Überstand mit 0,8 Vol Isopropanol versetzt, gut gemischt und für 15 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300  $\mu\text{l}$  70%-igem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet

luftgetrocknet und schließlich in 50 µl dest. Wasser aufgenommen. Die isolierten Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

Lösung a:

10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl (pH = 8,0); 50 mM Glukose

Lösung b:

200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS (frisch angesetzt)

Lösung c:

3 M Kaliumacetat (pH = 5,2)

### **2.10.2. Präparative Plasmid-DNA-Aufreinigung**

Die präparative Aufarbeitung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe der Plasmidpräparationskits „Plasmid Isolation Kit“ oder „Accu Prep<sup>®</sup> Plasmid Extraction Kit“ der Firma Fermentas bzw. Bioneer.

Die transformierten *E. coli*-Zellen mit dem zu isolierenden Plasmid wurden unter selektiven Bedingungen angezüchtet. Das Plasmid wurde entsprechend der Kit-Beschreibung des Herstellers isoliert. Die isolierten Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

### **2.10.3. Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefe**

Die verwendeten Hefestämme wurden über Nacht in YEPD-Medium angezüchtet. Für eine Genomisolation wurde der entsprechende Hefestamm in YEPD kultiviert. Für die Isolation der Gesamt-DNA von plasmidtragenden Transformanden wurde der jeweilige Stamm in YEPD mit Geneticin G418 (100 µg/ml) zur Selektion angezogen. In einem sterilen Zentrifugenröhrchen wurden 5 ml einer Übernacht-Kultur für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C pelletiert. Die Zellen wurden in 500 µl sterilem dest. Wasser resuspendiert und anschließend für 2 min bei 6000 rpm und 4 °C in 15 ml Greinerröhrchen zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurde das Pellet im Restwasser resuspendiert und mit 200 µl Lysispuffer versetzt. Die Suspension wurde in ein mit 0,3 g Glasperlen (0,45-0,5 mm) gefülltes 2 ml-Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) wurde das Eppendorfgefäß fest verschlossen und für 4 min bei max.

Geschwindigkeit gevortext, um die Hefezellen aufzubrechen. Anschließend wurde die Suspension bei 12000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige, DNA-enthaltende Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der abgenommene Überstand wurde 1:2 mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) versetzt, gut gemischt und anschließend bei 12000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde wieder vorsichtig abgenommen (möglichst ohne Bestandteile der weißen Interphase sowie der unteren organischen Phase) und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, um dann ca. 2,5 Vol Isopropanol dazuzusetzen. Nach 1,5 h bei -20 °C wurde erneut zentrifugiert (12000 rpm, 15 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 12000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und schließlich in 50 µl dest. Wasser aufgenommen. Die isolierte Gesamt-DNA wurde bei -20 °C gelagert. Diese wurde zur Amplifizierung von Genen mittels PCR eingesetzt.

Lysispuffer:

10 mM Tris-HCl (pH = 8), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25/24/1 (v/v/v)

10,0 ml Phenol, 9,6 ml Chloroform, 0,4 ml Isoamylalkohol, pH = 7,5-8,0

Chloroform/Isoamylalkohol 24/1 (v/v)

9,6 ml Chloroform, 0,4 ml Isoamylalkohol

## **2.11. *In vitro* DNA-Techniken**

### **2.11.1. Restriktions-Verdau von Plasmid-DNA**

Die Behandlung der DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den vom Enzymhersteller angegebenen Bedingungen. Die Restriktionsansätze (DNA, Puffer und Enzym) wurden für 5 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei einem Doppelverdau (Restriktion mit zwei verschiedenen Enzymen) wurde der Puffer verwendet, in dem beide Enzyme eine ausreichend hohe Aktivität besitzen (mindestens 75 %). Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass der Volumenanteil der Enzyme 10 % des Gesamtvolumens nicht überschreitet, um unspezifische Reaktionen

(*staractivity*) der Enzyme durch mehr als 5% Glycerin nicht zu begünstigen. Der Restriktionsansatz wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.14).

### 2.11.2. Ligation (enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten)

Den Herstellerangaben entsprechend wurden zu dem zu ligierenden linearen Vektor und dem PCR-Produkt (Insert) Ligationspuffer und 1-3 U T4-Ligase gegeben. Eine anschließende Inkubation des Liagtionsansatzes erfolgte für 3 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C. Für die Ligation wurde ein molares Verhältnis von Vektor:Insert von 1:2 verwendet. Zur Bestimmung der einzusetzenden Menge des Inserts wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Vektor-DNA (ng)} \times \text{Größe des Inserts (kb)}}{\text{Größe des Vektors (kb)}} \times \text{molares Verhältnis Insert:Vektor} = \text{Menge des Inserts (ng)}$$

Der Ligationsansatz hatte ein Endvolumen von 10-100 µl.

Einige Polymerasen wie z.B. die TOP-Polymerase, die keine proof reading-Aktivität besitzen, hängen an das amplifizierte PCR-Produkt ein einzelnes 3'-A (Adenosin-Triphosphat)-Nukleotid. Das PCR-Produkt mit den A-Überhängen kann dann direkt an einen gewünschten Vektor binden, der T (Thymidin-Triphosphat)-Überhänge besitzt (sogenanntes „T/A-Cloning“). Als Ergebnis erhält man rekombinante DNA. Die Rekombination wird durch die Ligase katalysiert.

### 2.11.3. PCR (Polymerase Chain Reaction) und Aufreinigung von PCR-Produkten

Die PCR dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten aus einer Template-DNA (genomische Hefe-DNA oder Plasmid-DNA) und zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primer) mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Die PCR-Produkte wurden für Klonierungen in den Zwischenvektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy eingesetzt. Außerdem wurden Teilsequenzen der verwendeten Vektoren (siehe 2.4) amplifiziert, um zu kontrollieren, dass die Gene korrekt inseriert wurden.

Aufreinigungen der PCR-Produkte erfolgten mit dem „PCR Purification Kit“ von Bioneer entsprechend den Herstellerempfehlungen der Kitbeschreibung.

Die Reaktionen wurden im Thermocycler (MyCycler Personal Thermal Cycler) der Firma Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) durchgeführt.

### 2.11.3.1. Amplifizierung der *BAT*-Gene

Der Reaktionsansatz für die Amplifizierung der jeweiligen *BAT*-Gene wurde nach Tabelle 1 mit den Primern *Fw-Sc-BAT1/ Rv-Sc-BAT1* (Primer 1 und 3) bzw. *Fw-Sc-BAT2/ Rv-Sc-BAT2* (Primer 2 und 4) angesetzt. Bei der verwendeten DNA-Polymerase handelte es sich um die TOP-Polymerase. Diese fügt 3'-A-Überhänge an jedes Ende des PCR-Produkts an. Die Amplifizierung erfolgte nach dem PCR-Programm in Tabelle 4. In Tabelle 3 sind die Angaben für einen 50 µl PCR-Reaktionsansatz angegeben.

**Tabelle 3:** PCR-Reaktionsansatz für 50 µl.

20-250	ng	genomische oder Plasmid-DNA
1	µM	Primer FW
1	µM	Primer RV
5	µl	10x PCR-Puffer
250	µM	dNTPs
0,02	U/µl	TOP-Polymerase
x	µl	dH <sub>2</sub> O
50	µl	Gesamtvolumen

dNTP-Gemisch (2 mM (Mengenangaben für 1 ml)):

20 µl 100 mM dATP, 20 µl 100 mM dCTP, 20 µl 100 mM dGTP, 20 µl 100 mM dTTP,  
920 µl ddH<sub>2</sub>O

**Tabelle 4:** PCR-Programm zur Amplifizierung der *BAT*-Gene.

Temperaturprofil		Anzahl der Zyklen
Temperatur	Zeit	
95 °C	4 min	1x
95 °C	45 sec	30x
61 °C	1 min	
72 °C	1:30 min	
72 °C	15 min	1x
4 °C	∞	

### 2.11.3.2. PCR zur Kontrolle des Antibiotikaresistenz-Verlustes

Zur Kontrolle, ob die Antibiotikaresistenz für Geneticin im verwendeten Hefestamm  $\Delta\Delta/ILV6$ , bei welchem die Allele für das Gen *ILV6* ausgeschaltet wurden, verloren gegangen ist, wurde eine PCR mit den Primern *Fw2-ILV6diag/Rv-ILV6del-diag* (Primer 5 und 6, siehe Tabelle 1) und der Phusion-Polymerase durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde nach Tabelle 5 vorgenommen. Das PCR-Programm ist in Tabelle 6 einzusehen.

**Tabelle 5:** PCR-Reaktionsansatz für 50  $\mu$ l (Finnzymes).

50-250	ng	genomische oder Plasmid-DNA
0,5	$\mu$ M	Primer FW
0,5	$\mu$ M	Primer RV
10	$\mu$ l	5x Phusion HF-Puffer
200	$\mu$ M	dNTPs
0,02	U/ $\mu$ l	Phusion-Polymerase
x	$\mu$ l	dH <sub>2</sub> O
50	$\mu$ l	Gesamtvolumen

**Tabelle 6:** PCR-Programm zur Kontrolle des Antibiotikaresistenz-Verlustes.

Temperaturprofil		Anzahl der Zyklen
Temperatur	Zeit	
98 °C	30 sec	1x
98 °C	10 sec	30x
52 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1x
4 °C	$\infty$	

### 2.11.3.3. Kontroll-PCR zur Insertion der Plasmide in Brauhefe

Mit Hilfe der PCR wurde zusätzlich zur selektiven Anzucht der transformierten Hefe kontrolliert, ob die Hefe das jeweilige Plasmid (pYCGPY2+Sc*BAT1*, +Lg*BAT1*, +Sc*BAT2*, +Lg*BAT2*) trug. Dazu wurden dementsprechend die Primer 2, 4, 7, 8 und 10 (siehe Tabelle 1) als Reverse Primer verwendet. Für alle PCR-Ansätze wurden der Primer Nr. 9 (*Fw-Kanamycin-resistance2*) als Forward Primer und die Phusion-

Polymerase genutzt. Der Reaktionsansatz wurde nach Tabelle 5 vorgenommen. Die Amplifizierungen erfolgten nach dem PCR-Programm wie in Tabelle 7 angegeben. Die Annealing-Temperatur (Anlagerung des Primers an das DNA-Template) muss bei Verwendung der Phusion-Polymerase mit der niedrigsten Primer-Schmelztemperatur übereinstimmen, sofern die Primerlänge nicht mehr als 20 Basen beträgt. Bei mehr als 20 Primer-Nukleotiden sollte die Temperatur +3 °C höher liegen als die niedrigste Primer-Temperatur. Da die Hefen in einem PCR-Durchlauf getestet wurden, wurde für die verwendeten Primer eine Annealing-Temperatur von 68 °C gewählt.

**Tabelle 7:** PCR-Programm zur Kontrolle der Plasmide.

Temperaturprofil		Anzahl der Zyklen
Temperatur	Zeit	
98 °C	30 sec	1x
98 °C	10 sec	30x
68 °C	30 sec	
72 °C	1:30 min	
72 °C	10 min	1x
4 °C	∞	

## 2.12. Transformation

### 2.12.1. Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E.coli* erfolgte leicht abgewandelt nach der Methode von HIMENO *et al.* (1984). Das Prinzip liegt in der vorübergehenden Befähigung der Zellen, durch die Anwesenheit der Kationen Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> DNA aufzunehmen. Sie werden als kompetente Zellen bezeichnet.

#### 2.12.1.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

In einem sterilen 500 ml Erlenmeyerkolben wurden 250 ml SOB-Medium mit 3 ml einer *E. coli* DH5α-Vorkultur angeimpft (eingestellte OD<sub>600</sub> = 0,02-0,04) und unter Schütteln bei 180 rpm und 37 °C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> = 0,6 erreicht war. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/3 des Originalvolumens (17 ml/50 ml) an TB-Lösung aufgenommen. Anschließend wurde 10 min auf Eis gekühlt. Nach erneutem Zentrifugieren (siehe oben) wurden die Zellen

in 1/12 des Originalvolumens (4 ml/50 ml) an eiskalter TB aufgenommen. Anschließend wurden 280 µl DMSO unter vorsichtigem Mischen zugegeben. Nach diesem Aufarbeitungsschritt waren die Zellen kompetent für die Plasmidaufnahme. Die kompetenten Zellen konnten direkt für die Transformation angewendet oder bei -70 °C eingefroren werden, um sie für spätere Transformationen direkt einsetzen zu können. Dafür wurden jeweils 1,5 ml kompetente Zellen mit 0,3 ml Glycerin versetzt. Um fertige Ansätze für spätere Transformationen zu erhalten, wurden jeweils 200 µl der mit Glycerin versetzten kompetenten Zellen in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -70 °C eingefroren.

TB:

250 mM KCl, 10 mM HEPES free acid, 15 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 55 mM MnCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O

### **2.12.1.2. Transformation von Plasmid-DNA**

Zu 200 µl der zuvor eingefrorenen kompetenten *E. coli*-Zellen wurde Plasmid-DNA (ca. 100 ng bzw. 5-10 µl eines Ligationsansatzes) gegeben. Nach einer Inkubation von 2 min auf Eis wurden die Bakterien 30 sec lang einem Hitzeschock in einem Wasserbad bei 42 °C ausgesetzt und nochmals für 1 min im Eisbad gekühlt. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zur Regeneration 30-60 min in 1,5 ml Eppendorfgefäßen bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit konnten die von der Plasmid-DNA in die Zelle eingebrachten neuen Eigenschaften exprimiert werden (insbesondere Gene, die eine Resistenz gegenüber Antibiotika vermitteln). Nach dieser Regeneration wurden 100 µl des Transformationsansatzes zur Selektion auf LB+Ampicillin (150 µg/ml)-Agarplatten ausplattiert. Nach der Transformation eines Ligationsansatzes wurde der Rest der Probe für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde im Restüberstand (50-100 µl) resuspendiert und ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### **2.12.2. Transformation von Brauhefe nach der Lithiumacetatmethode**

Die Hefetransformation wurde leicht abgewandelt nach der Methode von ITO et al. (1983) durchgeführt. Hierfür wurden 100 ml YEPD-Medium in einem sterilen 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Vorkultur der Hefe auf eine Start-OD<sub>600</sub> = 0,2 angeimpft.

Dieser Ansatz wurde unter Schütteln bei 170 rpm bei 30 °C bis zur logarithmischen Wachstumsphase bzw. bis zu einer  $OD_{600} = 0,8-1,5$  inkubiert. Die Zellen dieser logarithmischen Phase wurden 5 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 5000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml autoklaviertem dest. Wasser aufgenommen und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem, sterilem dest. Wasser aufgenommen. Während der Zentrifugationsschritte wurde die bei -20 °C aufbewahrte einzelsträngige Carrier-DNA (Heringsperma-DNA) für 5 min in kochendem Wasser inkubiert und anschließend bis zur Anwendung auf Eis gekühlt.

Die folgende Transformationsanweisung ist für vier Transformationen ausgelegt:

In ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden 400 µl der Zellsuspension überführt und bei 13000 rpm für 30 sec bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 400 µl autoklaviertem dest. Wasser resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl entnommen, in ein neues steriles 2 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 13000 rpm für 30 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, und das Pellet wurde in dem Transformationsansatz nach Tabelle 8 resuspendiert. Zunächst wurden die Zellen, die DNA und das Wasser gemischt, danach wurde der T-Mix aus PEG400, Lithiumacetat und Carrier-DNA zugegeben (Das Volumen der DNA-Lösung richtete sich nach der DNA-Konzentration, und dementsprechend variierte die dazuzugebende Wassermenge. Es sollen ca. 100 ng DNA eingesetzt werden.). Der komplette Ansatz wurde anschließend kurz gevortext und für 40 min bei 42 °C in einem Wasserbad inkubiert. Durch diesen Hitzeschock erfolgt die DNA-Aufnahme. Während dieser Inkubationszeit wurde der Transformationsansatz 2-3x gemischt.

**Tabelle 8:** Pipettierschema für einen Transformationsansatz nach der Lithiumacetatmethode für Hefe.

240	µl	PEG400 (50 % w/v)
36	µl	1,0 M Lithiumacetat
50	µl	2 mg/ml einzelsträngige Carrier-DNA
x	µl	steriles dest. Wasser
x	µl	Plasmid-DNA
<hr/>		
360	µl	Gesamtvolumen

Anschließend wurden die Zellen bei 13000 rpm für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml YEPD-Medium aufgenommen und für 4 h bei 30 °C in 2 ml Eppendorfgefäßen auf einem Reziproschüttler bei 160 rpm inkubiert.

Diese Inkubationszeit war für die Regeneration der Zellen und die Expression der plasmidvermittelten Geneticinresistenz nötig. Nach der Regeneration wurden die Zellen bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert, mit 2 ml sterilem dest. Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml autoklaviertem dest. Wasser aufgenommen, und 200 µl der resuspendierten Zellen wurden auf YED+G418-Agar (100 µg/ml) ausplattiert und 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

Bei der Transformation von Brauhefe mit dem pNatCre-Plasmid wurden jedoch die Zellen nach dem Regenerationsschritt auf YEPD-Platten, die das Antibiotikum Nourseothricin (ClonNAT) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml enthielten, ausplattiert (Steensma et al., 2001).

PEG4000 (50%, w/v):

50 g PEG4000, 100 ml TE-Puffer, pH = 8,0

1,0 M Lithium-Acetat:

5,1 g Lithium-Acetat-Dihydrat, 50 ml dest. H<sub>2</sub>O

Einzelsträngige-Carrier DNA (2 mg/ml):

40 mg Heringsperma-DNA wurden in 20 ml TE-Puffer in einem sterilen Becher unter Rühren für 1-2 h bei 4 °C gelöst. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0

### **2.12.3. Verlust der Antibiotikaresistenz des Stammes $\Delta\Delta ilv6$**

100 ClonNat-resistente Kolonien wurden dreimal mit je 1 ml YEPGal-Medium gewaschen und zentrifugiert (13000 rpm, RT, 30 sec). Die Zellen wurden dann für 2-3 h bei 30 °C in 2 ml YEPGal-Medium inkubiert (Güldener et al., 1996). Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl der entsprechenden Verdünnung ( $10^{-4}$ ) jeweils auf YEPD- und YEPD + ClonNAT-Agarplatten ausplattiert und zwei Tage bei 30 °C bebrütet. Von den YEPD-Platten wurden jeweils 50 Klone auf YEPD-, YEPD+ClonNat- und auf YEPD+G418-Platten überpickt. Anschließend wurden die Klone, die für das Antibiotikum G418 sensitiv geworden sind, selektiert und auf den Verlust des pNatCre-Plasmids getestet. Dazu wurden einige Klone in YEPD-Medium ohne Selektionsdruck bei 30 °C auf dem Schüttler angezchtet und nachfolgend auf YEPD-Platten

ausgestrichen und bebrütet (2d, 30 °C). Die gewachsenen Kulturen wurden nochmals jeweils auf YEPD- und YEPD+ClonNat-Platten ausplattiert. Unter den Kolonien waren einige, die das pNatCre-Plasmid verloren hatten. Dies wurde mit Hilfe der PCR getestet (2.11.3.2).

YEPGal-Medium:

1% Hefeextrakt, 2% Galaktose, 2% Trypton

### **2.13. Bestimmung des Anteils plasmidtragender Zellen**

Um den Anteil plasmidtragender Zellen in einer Kultur zu bestimmen, wurden die entsprechenden Stämme in YEPD-Medium ohne Selektionsdruck angezüchtet und 100 µl der auf ca.  $1 \times 10^3$  Zellen/ml verdünnten Zellsuspension auf selektive (YEPD + 100 µg/ml G418) und nichtselektive (YEPD) Platten ausplattiert. Die Anzahl der in dem selektiven Medium anwachsenden Kolonien im Vergleich zu der Anzahl in nichtselektivem Medium stellt den Anteil der plasmidtragenden Zellen in der Kultur dar.

### **2.14. Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA**

Durch die Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente und Plasmide voneinander getrennt und sichtbar gemacht. Agarose wurde in einer Konzentration von 0,8 % in 1xTBE-Puffer durch Erwärmen in Lösung gebracht. Nach einer kurzen Abkühlzeit wurde das Gel in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegossen. Nach dem Erstarren wurde es mit 1xTBE-Puffer bedeckt. In die Beladungstaschen wurden die vorbereiteten Proben gegeben. Die Proben wurden mit 1/3 Vol Stopperlösung versetzt. Des Weiteren wurde eine Geltasche mit einem Größenmarker beladen, wobei Fragmentgröße und die aufgetragene Menge bzw. Konzentration der jeweiligen Fragmente bekannt sind. So kann neben der Fragmentgröße auch die ungefähre Menge der Probe bestimmt werden. Die DNA-Fragmente bzw. Plasmide wurden bei 3-5 V/cm voneinander getrennt.

Die Dokumentation nach der elektrophoretischen Trennung erfolgte über Visualisierung der jeweils aufgetrennten DNA-Banden mit UV-Licht (254 nm) nach einer 10-20 minütigen Färbung des Gels in einer Ethidiumbromidlösung.

Agarosegel:

1,6 g Agarose in 200 ml 1xTBE-Puffer erhitzen.

TBE-Puffer 5x (Tris-Borat):

445 mM Tris, 445 mM Borsäure, 10 mM EDTA, pH = 8,0

Stopper-Lösung:

60 % Saccharose, 20 mM EDTA, 0,025 % Bromphenolblau

Ethidiumbromidlösung:

1 l 1x TBE-Puffer mit 100 µl EtBr-Stammlösung (5 g/l)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Bierfermentationen mit sechs verschiedenen Brauhefestämmen

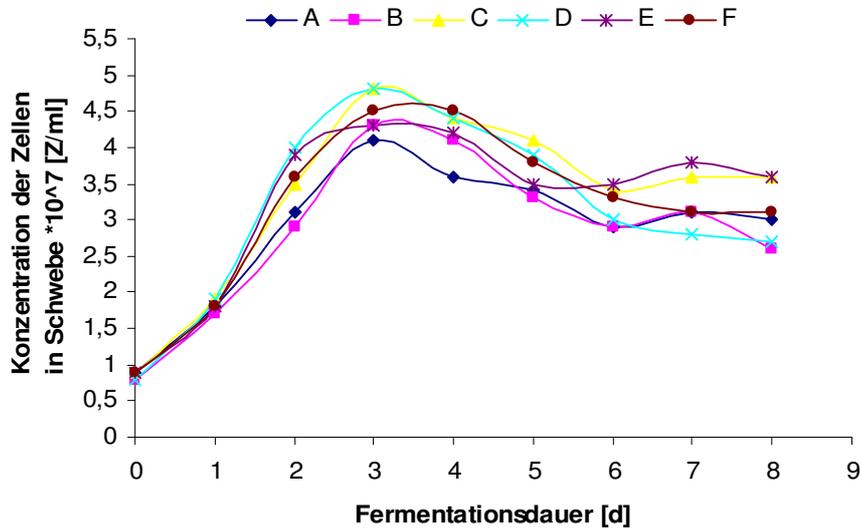
Bei der Strategie des *Inverse Metabolic Engineering* zur Brauhefeoptimierung müssen im ersten Schritt Stämme identifiziert werden, bei denen relevante Eigenschaften quantitativ unterschiedlich ausgeprägt sind. Da das Hauptaugenmerk der Arbeit auf der Optimierung des Diacetylgehaltes lag, wurden Stämme benötigt, die sich in ihrer Diacetylbildung signifikant unterscheiden, sich aber in Bezug auf alle anderen Braueigenschaften möglichst gleich verhalten. Daher wurden sechs verschiedene Brauhefestämme ausgewählt, die zunächst während mehrerer Biergärungen auf ihr Fermentationsverhalten und ihr unterschiedliches Vermögen, Diacetyl zu produzieren, getestet wurden. Weiterhin wurde das Nebenproduktprofil der Biere durch die Bestimmung der Gehalte an höheren Alkoholen, Estern und niederen Fettsäuren aufgenommen.

##### 3.1.1. Extraktgehalt, Zellzahl, pH-Wert

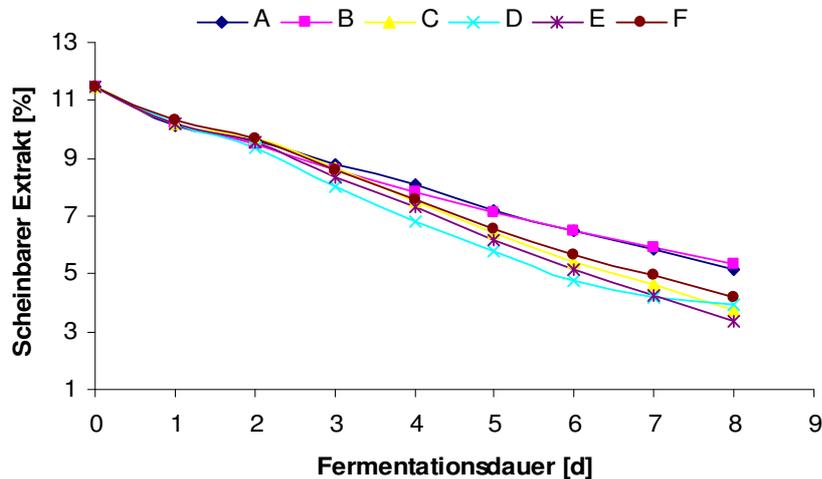
Im ersten Teil einer Gärung vermehren sich die Hefen rasant, wobei im zweiten Teil die Zellzahl, die in der Schwebelage des Gäransatzes gemessen wird, wieder aufgrund des Absinkens der Zellen abnimmt. Beim zweiten Teil der Gärung stehen die Konzentrationen der Zellzahlen in Schwebelage indirekt für das Flockulationsverhalten der Brauereihefen, wobei ein schneller Abfall der Zellzahlen infolge des Absinkens der Zellen eine unvollständige Mediumverwertung bedeutet. Der Zuckerabbau durch die Hefe geht mit deren Alkoholbildung einher. Daher ist der vollständige Verbrauch der vergärbaren Zucker bis zu einem prozentualen Anteil von 1,9 - 2,1% (scheinbarer Extraktgehalt  $E_s$  [%]) für den Geschmack des Bieres wichtig. Die restlichen Zucker sind Dextrine, die von der Hefe nicht mehr verwertet werden können.

Die Konzentration der Zellen in Schwebelage bzw. der Verbrauch der zur Verfügung stehenden Nährstoffe bzw. Zucker und somit das Flockulationsverhalten der untersuchten Stämme differierte unwesentlich (Abbildung 3). Es ist jedoch auffällig, dass die Stämme B und D die geringste Zellkonzentration aufwiesen. Dies spiegelt sich auch im Extraktverlauf (Abbildung 4) wieder. Speziell Stamm D vergor die enthaltenen Kohlenstoffquellen innerhalb der angegebenen Fermentationsdauer nicht vollständig,

er benötigte zur Mediumverwertung länger als die anderen fünf Stämme (Daten nicht gezeigt). Dies tritt aufgrund einer stärkeren Flockulation vor Ende der Gärung auf (Abbildung 3 und Abbildung 4). Der Stamm D ist diesbezüglich daher als eher ungünstig für die Brauindustrie einzustufen.

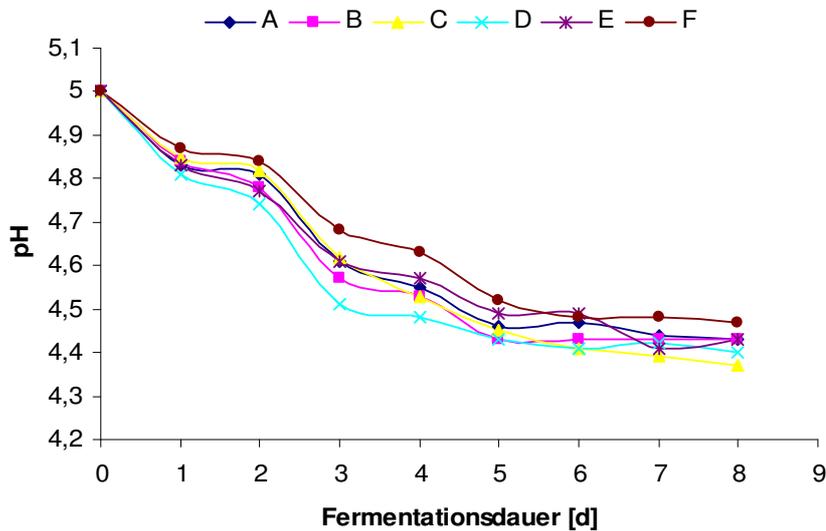


**Abbildung 3:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Gezeigt sind die Konzentrationen der Zellen in der Schweben während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze (T = 11 °C, Stammwürze: 11,5%) in 30 l-zylindrokonischen Tanks (ZKT). Dargestellt ist der Verlauf einer Fermentation von mindestens drei durchgeführten Fermentationen für jeden Stamm.



**Abbildung 4:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Gezeigt sind die gemessenen scheinbaren Extraktgehalte während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze (T = 11 °C, Stammwürze: 11,5%) in 30 l-zylindrokonischen Tanks (ZKT). Dargestellt ist der Verlauf einer Fermentation von mindestens drei durchgeführten Fermentationen für jeden Stamm.

Die gemessenen pH-Werte lagen für alle Brauhefestämme im gleichen, üblich sauren Bereich von 5 am Anfang der Fermentationen und fielen auf Werte zwischen 4,25 und 4,55 am jeweiligen letzten Probenstag ab. Gezeigt sind in Abbildung 5 die pH-Verläufe nach acht Tagen Fermentationsdauer.

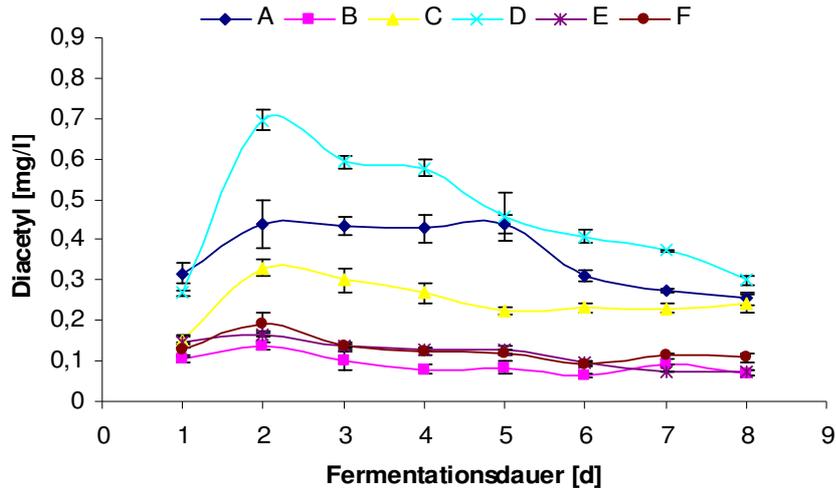


**Abbildung 5:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Gezeigt sind die gemessenen pH-Werte während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze ( $T = 11\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Stammwürze: 11,5%) in 30 l-zylindrokonuschen Tanks (ZKT). Dargestellt ist der Verlauf einer Fermentation von mindestens drei durchgeführten Fermentationen für jeden Stamm.

Die Gärungen verliefen also in einem für untergärig gebraute Biere üblichen Rahmen.

### 3.1.2. Diacetyl

Aus Abbildung 6 ist zu erkennen, dass der Stamm D am stärksten Diacetyl bildete, während die Stämme A und C im Mittelfeld lagen. Die anderen Stämme sind im niederen Bereich zu finden, wobei Stamm B eindeutig am geringsten Diacetyl bildete. Deshalb sind diese Stämme (B, E, F) in Bezug auf die Diacetylbildung als optimal einzuschätzen.

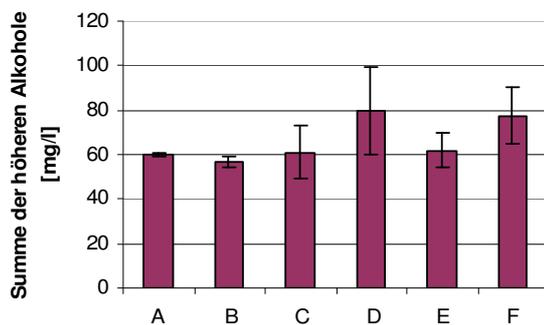


**Abbildung 6:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Gezeigt sind die Verläufe der extrazellulären Diacetylkonzentration\* während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze ( $T = 11\text{ °C}$ , Stammwürze: 11,5%) in 30 l-zylindrokönischen Tanks (ZKT). Repräsentativ sind hier die Verläufe der Diacetyl-Gehalte einer Fermentation von mindestens drei unabhängigen Fermentationen für jeden Stamm gezeigt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei parallelen Diacetylbestimmungen eine Probe).

\* Es ist hier die Gesamtdiacetylkonzentration angegeben, d.h. die Summe aus freiem Diacetyl und dessen Vorstufe  $\alpha$ -Acetolactat.

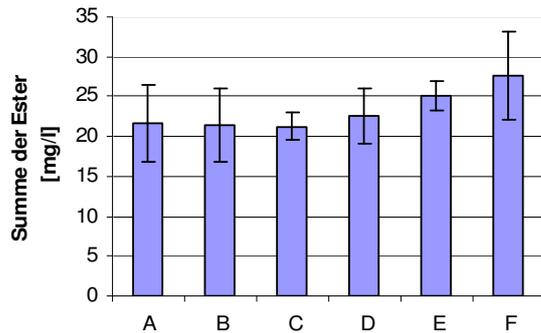
### 3.1.3. Höhere Alkohole, Ester und niedere Fettsäuren

Die Gehalte der höheren Alkohole, Ester und niederen Fettsäuren unterschieden sich zwar vereinzelt voneinander (Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9), lagen aber jeweils im akzeptablen Bereich für Pilsener Biere. Diese Nebenproduktgehalte ließen keine negativen geschmacklichen Auswirkungen auf die Biere erkennen.

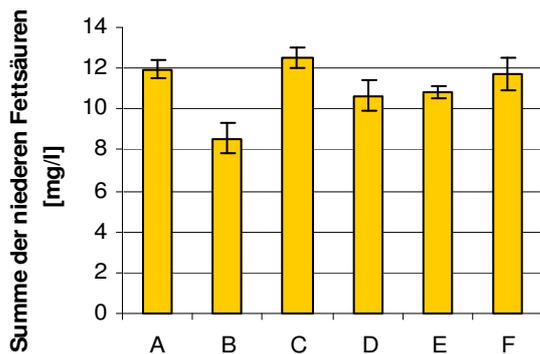


**Abbildung 7:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F) mit gehopfter Bierwürze ( $T = 11\text{ °C}$ , Stammwürze: 11,5%) in 30 l-zylindrokönischen Tanks (ZKT). Gezeigt ist die Summe der höheren, aliphatischen Alkohole (C3-C5) im gelagerten Bier (2 Wochen bei  $0\text{ °C}$ ). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (Einzelbestimmungen) aus drei unabhängigen Fermentationen. Die Gärbedingungen

entsprechen denen in der Legende von Abbildung 3. Die gemessenen Gehalte der jeweiligen Alkohole sind im Anhang einzusehen.



**Abbildung 8:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F) mit gehopfter Bierwürze ( $T = 11\text{ °C}$ , Stammwürze: 11,5%) in 30 l-zylindrokönischen Tanks (ZKT). Gezeigt ist die Summe der Ester (Ethylacetat, Isoamylacetat, Phenylethylacetat) im gelagerten Bier (2 Wochen bei  $0\text{ °C}$ ). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (Einzelbestimmungen) aus drei unabhängigen Fermentationen. Die Gärbedingungen entsprachen denen in der Legende von Abbildung 3. Die gemessenen Gehalte der jeweiligen Alkohole sind im Anhang einzusehen.



**Abbildung 9:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F) mit gehopfter Bierwürze ( $T = 11\text{ °C}$ , Stammwürze: 11,5%) in 30 l-zylindrokönischen Tanks (ZKT). Gezeigt ist die Summe der niederen Fettsäuren (C3-C10) im gelagerten Bier (2 Wochen bei  $0\text{ °C}$ ). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (Einzelbestimmungen) aus drei unabhängigen Fermentationen. Die Gärbedingungen entsprachen denen in der Legende von Abbildung 3. Die gemessenen Gehalte der jeweiligen Alkohole sind im Anhang einzusehen.

### 3.1.4. Sensorik

Der jeweilige Gesamteindruck des Endbieres wurde sensorisch von einem Verkostergremium mit zehn geschulten Personen getestet. Die sechs Biere erhielten von 5 möglichen Punkten für die Reinheit des Geschmacks Durchschnittswerte von 4,0 bis 4,5 (Daten nicht gezeigt) und waren somit qualitativ als gut einzuschätzen.

### 3.2. Analysen von Brauhefen auf der Ebene des Transkriptoms

Um die differentiell exprimierte Gene in den gewählten Stämmen zu verschiedenen Zeitpunkten einer Gärung zu detektieren, wurden Transkriptomanalysen durchgeführt. Mit Hilfe der Chiptechnologie (Microarrays) kann man die mRNA-Menge von Genen nachweisen. Dabei werden spezifische Sequenzstücke eines Gens (z.B. 25-mer Oligonukleotide) auf eine Glasfläche gespottet, um anschließend mit der zu detektierenden Probe gespült zu werden. Die „passenden“ Gensequenzen binden an die Oligonukleotide und liefern nach Anfärbung ein Signal, das anschließend direkt mit den Signalen anderer Proben verglichen werden kann. Dadurch lassen sich Aussagen über die Expressionshöhe eines bestimmten Gens treffen.

Für die Untersuchung des Transkriptoms wurden während der Fermentationen Proben der Stämme bei einem Extraktgehalt von jeweils 8% und 6% entnommen. Die beiden Zeitpunkte wurden gewählt, um die genetischen Unterschiede der Hefe zwischen der logarithmischen Wachstumsphase ( $E_s = 8\%$ ) und dem Übergang zur stationären Phase ( $E_s = 6\%$ ) aufzuzeigen. Zur weiteren Analyse wurden die Proben zur Firma Asuragen nach Texas/USA verschickt. Dort wurden die Microarray-Analysen durchgeführt. Nach Abschluss der Untersuchungen konnten die erhaltenen Daten grundlegend ausgewertet werden. Zunächst wurden statistische Analysen (ANOVA-Filter bzw. t-test und FDR) vorgenommen, um zu testen, ob die Standardabweichung vom Mittelwert zwischen den untersuchten Gruppen (hier: Stämmen) größer ist als innerhalb dieser Gruppen. Dadurch kann ermittelt werden, ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden oder nicht. Die Signifikanzen wurden zwischen den sechs verschiedenen Hefestämmen ermittelt, sodass 1546 ( $E_s = 8\%$ ) bzw. 1080 ( $E_s = 6\%$ ) Gene der Hefen als signifikant differentiell exprimiert klassifiziert wurden. Die signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den einzelnen Stämmen wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 95%, p-value 0,05 festgestellt. Dabei gibt der p-value die statistische Sicherheit für die wahre Signifikanz der Ergebnisse wieder. Als signifikant differentiell exprimiert wurden die Gene gewertet, die eine  $\log_2$ ratio von  $\geq +1$  für höher exprimierte Gene oder  $\leq -1$  für niedriger exprimierte Gene zeigten.

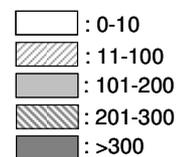
### 3.2.1. Paarweise Stammvergleiche der untersuchten Brauhefen

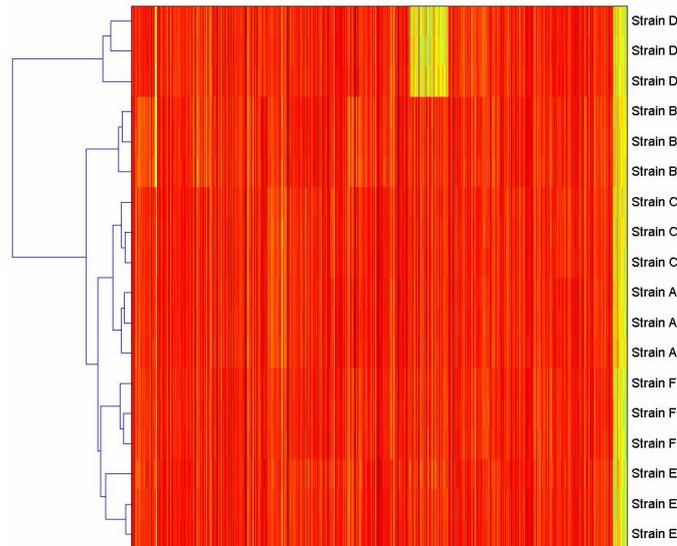
Schließlich wurden die Stämme im direkten Vergleich mit den jeweils anderen analysierten Stämmen betrachtet, um die stammspezifischen Unterschiede aufzudecken. Die einzelnen Stammvergleiche sind in untenstehenden Tabellen (Tabelle 9 und Tabelle 10) aufgeführt.

Nach der ersten Analyse bei einem Extraktgehalt der Proben von 8% konnten die meisten differentiell signifikant exprimierten Gene im direkten Vergleich zwischen den Stämmen D und E (336 Unterschiede) bei einem p-value von 0,05 gefunden werden (Tabelle 9). Aus der Clusteranalyse der Stammvergleiche ging hervor, dass Stamm D verwandtschaftlich am weitesten von den anderen Stämmen entfernt ist (Abbildung 10). Die geringste Anzahl an Unterschieden wiesen die Stämme A und C im direkten Vergleich auf (Tabelle 9). Dies bestätigt wiederum die Tatsache, dass die beiden Stämme eng miteinander verwandt sind (Abbildung 10).

**Tabelle 9:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von 8% geerntet (Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Bei den paarweisen Stammvergleichen wurde die Anzahl der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 95% (p-value 0,05) betrachtet. Es ist sowohl die Gesamtanzahl von differentiell exprimierten Genen als auch die Zahl der höher (+) bzw. niedriger (-) exprimierten Gene im jeweils ersten im Vergleich zum zweitgenannten Stamm angegeben.

p-value	A/B	A/C	A/D	A/E	A/F	B/C	B/D	B/E	B/F	C/D	C/E	C/F	D/E	D/F	E/F
0.05	189	9	255	78	60	187	311	184	102	278	57	51	336	222	40
	+149	+6	+204	+47	+28	+43	+180	+45	+24	+213	+30	+23	+77	+53	+27
	-40	-3	-51	-31	-32	-144	-131	-139	-78	-65	-27	-28	-259	-169	-13





**Abbildung 10:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von 8% geerntet (Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Hierarchische Anhäufung von Genen mit ähnlichen Expressionsmustern. Die Äste des Baumdiagrammes geben an, wie eng der Verwandtschaftsgrad der jeweiligen Stämme zueinander ist. In der Mitte liegen die verwandtschaftlich dichtesten Stämme (A und C), der Stamm D ist verwandtschaftlich am weitesten von den anderen fünf Stämmen entfernt. Repräsentativ ist das Dendrogramm der ersten von zwei Transkriptomanalysen gezeigt. Es wurden drei Proben von drei unabhängigen Fermentationen der jeweiligen Hefe miteinander verglichen.

Bei der zweiten Analyse für die bei einem Extraktgehalt von 6% entnommenen Proben wurde ein sehr ähnliches Expressionsmuster der Gene wieder gefunden (siehe Tabelle 10). Hierbei wurden die meisten differentiell exprimierten Gene zwischen den Stämmen B und D verzeichnet.

**Tabelle 10:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von 6% geerntet (Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Bei den paarweisen Stammvergleichen wurde die Anzahl der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 95% (p-value 0,05) betrachtet. Es ist sowohl die Gesamtanzahl von differentiell exprimierten Genen als auch die Zahl der höher (+) bzw. niedriger (-) exprimierten Gene im jeweils ersten im Vergleich zum zweitgenannten Stamm angegeben. Legende siehe Tabelle 9.

p-value	A/B	A/C	A/D	A/E	A/F	B/C	B/D	B/E	B/F	C/D	C/E	C/F	D/E	D/F	E/F
0.05	178	25	288	82	66	190	361	129	121	317	55	57	345	239	56
	+145	+6	+222	+51	+30	+45	+204	+30	+24	+229	+29	+24	+96	+64	+27
	-33	-19	-66	-31	-36	-145	-157	-99	-97	-88	-26	-33	-249	-175	-29

### 3.2.2. Zuordnung der Daten zu zellbiologischen Funktionen

Die erhaltenen Transkriptomdaten konnten mit Hilfe von Bioinformatik-Programmen und Gendatenbanken (SGD, KEGG, Babelomics-Tools) ihren zellbiologischen Funktionen und ihren Biosynthesewegen zugeordnet werden. Beteiligte Stoffwechselwege waren z.B. Basisfaktoren für die Transkription, MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signalwege, der Purin- bzw. Pyrimidin-Metabolismus, Pyruvatmetabolismus sowie der Hefezellzyklus. Auffällig war jedoch, dass viele Synthesewege für Aminosäuren wie beispielsweise Alanin, Tryptophan oder Histidin beteiligt waren.

Unter den Expressionsdaten wurden auch signifikante Differenzen in der Expression bereits bekannter Flockulationsgene gefunden. Diese stehen im Einklang mit den jeweiligen Phänotypen der einzelnen Hefestämme.

### 3.2.3. Kandidatengene des Valinstoffwechsels

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Diacetylbildung von Brauhefen zu reduzieren. Um nun den genetischen Hintergrund bezüglich des Diacetyls aufzudecken und so mögliche Zusammenhänge zwischen der Anhäufung von Diacetyl und den Expressionshöhen bestimmter Gene herzuleiten, wurden die Gene der Valinbiosynthese betrachtet. Dieser Stoffwechselweg ist deshalb so interessant, da Diacetyl aus  $\alpha$ -Acetolactat synthetisiert wird, welches wiederum ein Zwischenprodukt im Valinbiosyntheseweg darstellt (Abbildung 11). Tatsächlich konnten unter den differentiell exprimierten Genen solche gefunden werden, die in die Valinbiosynthese involviert sind. Diese stellen Kandidatengene dar, welche vermutlich die phänotypischen Unterschiede hinsichtlich der Diacetylbildung der sechs verschiedenen Brauhefen verursachen.

Als signifikant differentiell exprimiert wurden in diesem Biosyntheseweg folgende Gene gefunden: *ILV3*, *ILV6*, *BAT1* und *BAT2* (Abb. aa, Abb. bb, Daten siehe Anhang).

Die Expressionsdaten der Hefestämme bei einem Extrakt von 8% zeigen auf, dass die Gene *ILV6* und *BAT1* im Stamm B im Vergleich zu den anderen Stämmen niedriger exprimiert wurden. Außerdem sind die Gene *ILV3* und *BAT2* in Stamm D im Gegensatz zu allen anderen Stämmen niedriger exprimiert. Gegenläufig dazu ist das Gen *BAT1* in D am höchsten, das Gen *BAT2* in B am höchsten exprimiert worden. Erstaunlicherweise sind aber die Expressionssignale des Gens *BAT2* für die Stämme

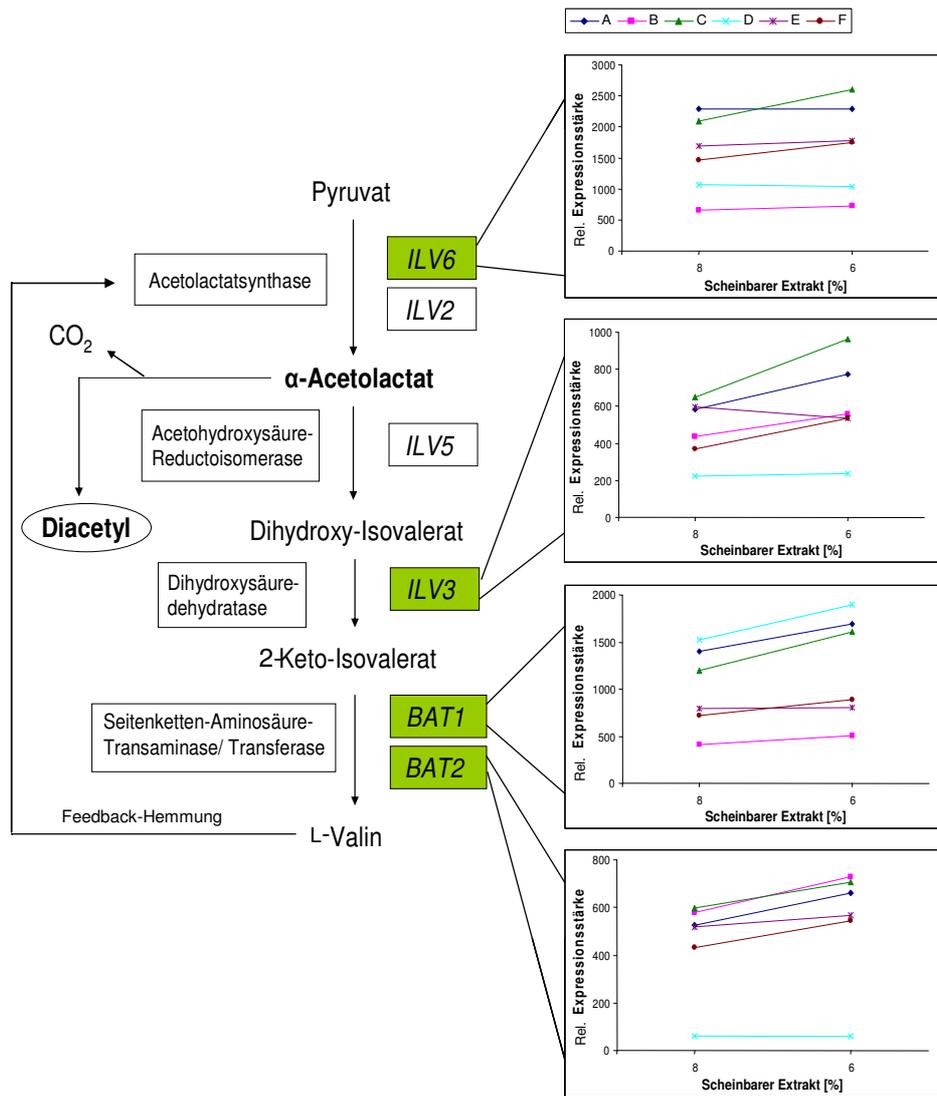
A, B und C ungefähr gleich. Die Expressionsdaten von *BAT1* unterscheiden sich jedoch zwischen jeweils A und B bzw. C und B um das fast Zweifache.

Die Daten für den Extraktgehalt 6% bestätigen, dass auch zu diesem Zeitpunkt der Fermentation die gleichen Gene des Valinstoffwechsels exprimiert wurden wie bei einem Extraktgehalt von 8%. Zusätzlich zu den Genen, die bei einem Extraktgehalt von 8% identifiziert worden sind, wurden bei  $Es = 6\%$  noch weitere Gene als signifikant unterschiedlich exprimiert angezeigt. Bei einer genaueren Analyse der Daten von 8% Extraktgehalt konnte allerdings festgestellt werden, dass die „zusätzlichen“ Gene auch dort in den entsprechenden Stammvergleichen als unterschiedlich detektiert werden konnten, jedoch nicht als statistisch signifikant gewertet (knapp unter  $\log_2$ ratio 1 oder -1) und daher als „nicht signifikant“ ausgesiebt wurden.

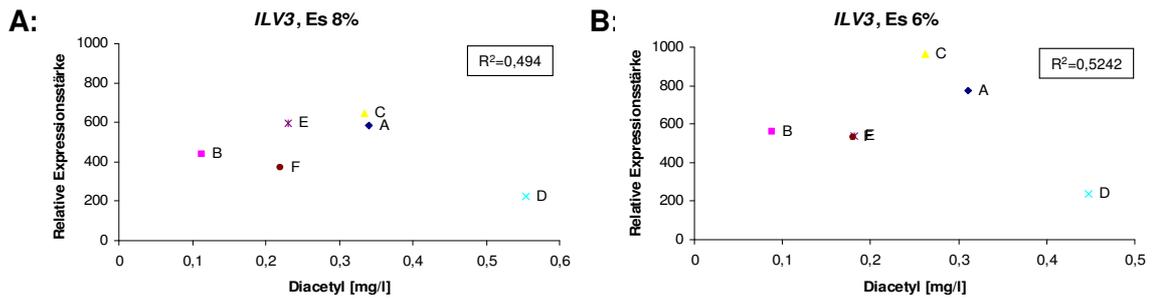
Das Expressionsmuster der Gene zwischen den beiden untersuchten Zeitpunkten ist daher sehr ähnlich. Dies wird aus Abbildung 11 ersichtlich. Hier ist zu erkennen, dass sich die Expressionshöhen des entsprechenden Gens bei beiden Probenahmezeitpunkten nur unwesentlich voneinander unterscheiden.

Die Abbildung 12 bis Abbildung 15 zeigen die Abhängigkeit der gemessenen Diacetylgehalte der Hefestämme von der Expressionsstärke der vier signifikant exprimierten Gene der Valinbiosynthese (*ILV3*, *ILV6*, *BAT1* und *BAT2*). Dargestellt sind die Auftragungen für beide Zeitpunkte von 8% und 6% Extraktgehalt.

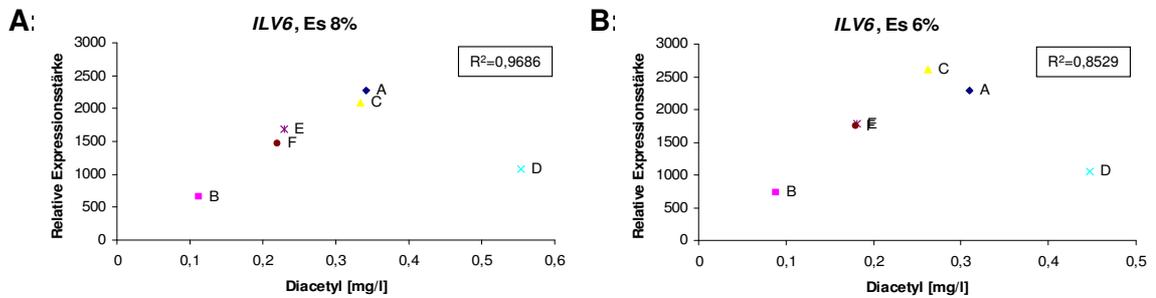
Besonders interessant ist die Tatsache, dass für die Gene *ILV6* und *BAT1*, in geringerem Ausmaß auch für das Gen *ILV3*, eine scheinbar lineare Abhängigkeit zwischen der Expressionsstärke des jeweiligen Gens und der Diacetylkonzentration des entsprechenden Hefestammes zum angegebenen Zeitpunkt besteht. Der einzige Brauhefestamm, der nicht in diese Abhängigkeit passt, ist der Stamm D.



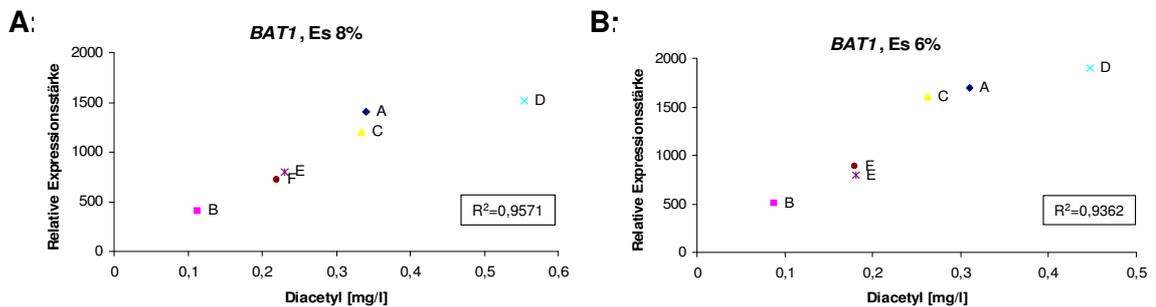
**Abbildung 11:** Valinbiosynthese von Hefen. Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Nach den durchgeführten Transkriptomanalysen wurden signifikant differentiell exprimierte Gene des gezeigten Stoffwechsels gefunden (farbig unterlegt). Deren Unterschiede in den Expressionshöhen: gezeigt sind die relativen Expressionsstärken der Gene *ILV3*, *ILV6*, *BAT1* und *BAT2* bei einem Extraktgehalt von 8% bzw. 6% der jeweiligen Hefen. Hierfür wurden die Mittelwerte der einzelnen Signale delogarithmiert. Die Gärbedingungen entsprachen denen in der Legende von Abbildung 3. Erläuterungen der Gene siehe Abbildung 2.



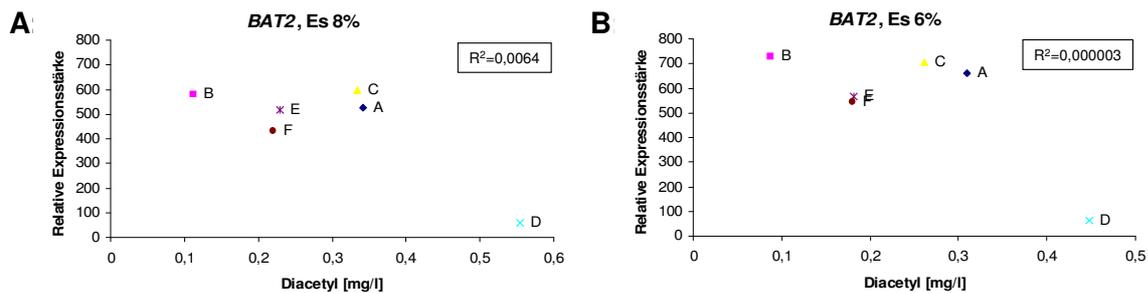
**Abbildung 12:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von 8% (erreicht nach 2-3 Tagen während der Hauptgärung) bzw. 6% (erreicht nach 4-5 Tagen während der Hauptgärung) geerntet (Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Abhängigkeit der Diacetylgehalte (aus drei Fermentationen gemittelt) der sechs Hefestämme von der Expressionsstärke des Gens *ILV3* der Valinbiosynthese bei A: Es = 8% und B: Es = 6%.



**Abbildung 13:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von 8% (erreicht nach 2-3 Tagen während der Hauptgärung) bzw. 6% (erreicht nach 4-5 Tagen während der Hauptgärung) geerntet (Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Abhängigkeit der Diacetylgehalte (aus drei Fermentationen gemittelt) der sechs Hefestämme von der Expressionsstärke des Gens *ILV6* der Valinbiosynthese bei A: Es = 8% und B: Es = 6%.



**Abbildung 14:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauerestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von 8% (erreicht nach 2-3 Tagen während der Hauptgärung) bzw. 6% (erreicht nach 4-5 Tagen während der Hauptgärung) geerntet (Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Abhängigkeit der Diacetylgehalte (aus drei Fermentationen gemittelt) der sechs Hefestämme von der Expressionsstärke des Gens *BAT1* der Valinbiosynthese bei A: Es = 8% und B: Es = 6%.



**Abbildung 15:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von 8% (erreicht nach 2-3 Tagen während der Hauptgärung) bzw. 6% (erreicht nach 4-5 Tagen während der Hauptgärung) geerntet (Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Abhängigkeit der Diacetylgehalte (aus drei Fermentationen gemittelt) der sechs Hefestämme von der Expressionsstärke des Gens *BAT2* der Valinbiosynthese bei A: Es = 8% und B: Es = 6%.

Die durchgeführten Transkriptomanalysen liefern einen detaillierten Einblick in die Unterschiede auf genetischer Basis der untersuchten Brauhefestämme. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten zeigen, dass die Microarray-Analyse in der Lage ist, signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen zu detektieren. Die Herausforderung bestand nun darin herauszufinden, welche der identifizierten Unterschiede tatsächlich den Phänotyp (mit)bestimmen.

### 3.3. Modifikationen der Kandidatengene *BAT1* und *BAT2*

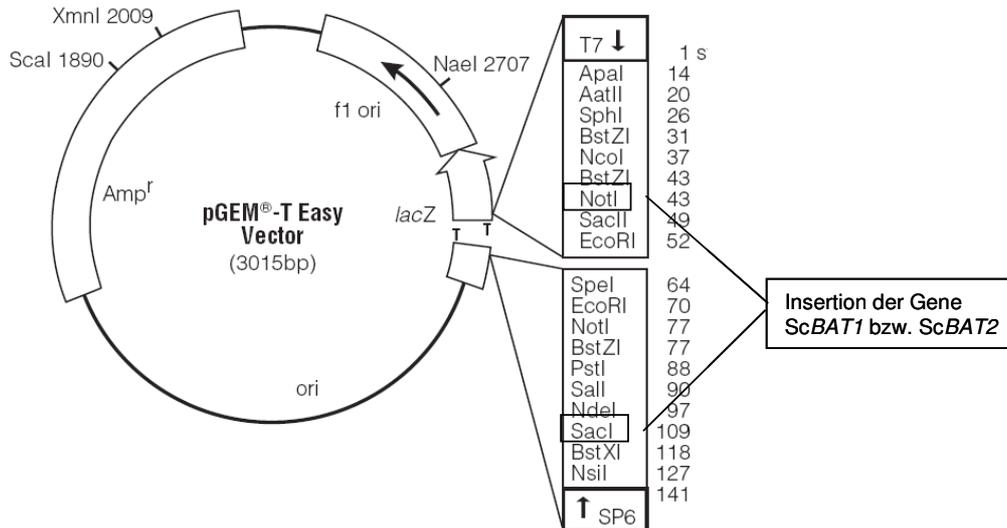
Die Korrelation von Genexpression und Phänotyp bezüglich der Diacetylbildung sollte durch die noch ausstehende, gezielte Erhöhung bzw. Erniedrigung der Aktivität der identifizierten Gene in einer Brauhefe verifiziert werden. Dazu wurde der Schwerpunkt auf solche Gene gelegt, die im direkten Zusammenhang mit dem Valinstoffwechsel stehen, da Diacetyl aus einem Metaboliten ( $\alpha$ -Acetolactat, siehe Abbildung 2) dieses Syntheseweges gebildet wird. Bei der Verifizierung der potentiellen *Target*-Gene wurde besonderes Augenmerk auf die *BAT*-Gene (*BAT1* und *BAT2*) gelegt, da diese sich in drei Stämmen gegenläufig verhielten (siehe 3.2.) und somit einen Ansatzpunkt für Modifizierungen darstellten. Diese Kandidatengene, die möglicherweise für die unterschiedlichen Gäreigenschaften der Hefestämme verantwortlich sind, wurden in dem Hefestamm C gezielt modifiziert, da dieser bereits in der Brauindustrie verwendet wird. Es resultierte eine Erhöhung der Proteinexpression in der veränderten Hefe. Zusätzlich wurden die Gene nochmals in den bereits modifizierten Hefestamm C eingebracht, dem bereits beide Kopien des *ILV6*-Gens fehlten (Duong, 2009).

### 3.3.1. Klonierung der *Saccharomyces cerevisiae*-*BAT*-Gene in den Zwischenvektor pGEM-T<sup>®</sup> Easy

Die Klonierung in den Zwischenvektor war nötig, um die entsprechend langen Überhänge nach dem Schneiden zur spezifischen Klonierung in den vorher linearisierten Vektor pYCGPY2 zu erhalten (Abbildung 16).

Die Plasmide, die das jeweilige Gen *BAT1* oder *BAT2* des *Lager*genomteils (Lg) des Brauhefegenoms trugen, wurden von Frau Dr. Y. Kodama (Suntory<sup>®</sup> Ltd./Osaka, Japan) bereitgestellt, sodass noch die *S. cerevisiae*-Gen tragenden Plasmide erstellt werden mussten.

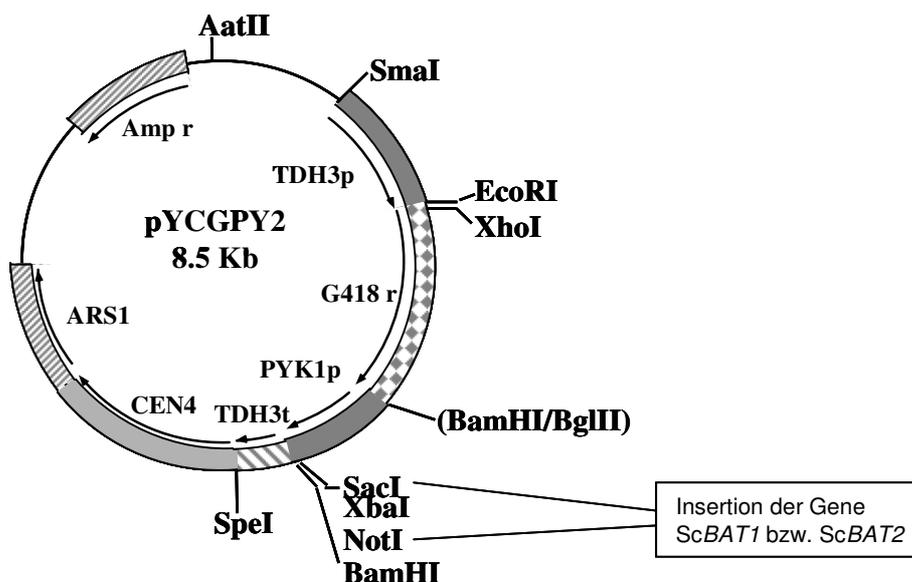
Zur Konstruktion der fehlenden Plasmide wurden zunächst die *BAT*-Gene des *Saccharomyces*-Teils (Sc) des Brauhefegenoms mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (siehe 2.11.3.1) amplifiziert, um diese dann in den Zwischenvektor pGEM-T<sup>®</sup> Easy einzubringen. Die erhaltenen Plasmide wurden ScBAT1pGEM-T Easy und ScBAT2pGEM-T Easy genannt. Aus diesen wurde das jeweilige Genstück (*ScBAT1*, *ScBAT2*) mit den passenden Restriktionsenzymen (*SacI*, *NotI*) wieder herausgeschnitten.



**Abbildung 16:** Vektoraufbau des pGEM-T<sup>®</sup> Easy. Die Gene *ScBAT1* bzw. *ScBAT2* wurden zwischen den Restriktionsstellen *SacI* und *NotI* inseriert.

### 3.3.2. Klonierung der *Saccharomyces cerevisiae*-BAT-Gene in den Vektor pYCGPY2

Mit dem Centromer-Plasmid pYCGPY2 (Abbildung 17) lag ein Plasmid vor, welches für das Einbringen der *BAT*-Gene in Brauhefe gut geeignet war, da ein *PYK1* (Pyruvatkinase)-Promotor für das einzubringende Gen vorhanden war. Um die entsprechenden *S. cerevisiae*-Gensequenzen einzubringen, wurden diese aus dem Zwischenvektor pGEM-T<sup>®</sup> Easy mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SacI* und *NotI* wieder herausgeschnitten. Anschließend konnten diese Sequenzen in den Vektor pYCGPY2 kloniert werden. Somit lagen die vier gewünschten Plasmide zur Überexpression der *BAT*-Gene jeweils des *Saccharomyces*- und des *Lager*genomparts der Brauhefe in einer industriell relevanten Hefe vor. Die Plasmide wurden entsprechend bezeichnet: ScBAT1pYCGPY2, ScBAT2pYCGPY2, LgBAT1pYCGPY2 und LgBAT2pYCGPY2.



**Abbildung 17:** Vektoraufbau des pYCGPY2. Die Gene *ScBAT1* bzw. *ScBAT2* wurden zwischen den Restriktionsstellen *SacI* und *NotI* inseriert.

### 3.3.3. Verlust der Antibiotikaresistenzen der *ILV6*-Doppeldeletionsmutante

Duong (2009) konnte zeigen, dass die Diacetylproduktion desselben Produktionsstammes C nach Ausschalten beider Kopien des *ILV6*-Gens verringert wurde. Um eine eventuelle Verstärkung der Diacetylreduktion zu vermerken, sollten die

Plasmide ebenfalls in die *ILV6*-Doppeldelentionsmutante ( $\Delta\Delta ilv6$ ) der Brauhefe C eingebracht werden. Diese enthielt aber bereits eine Resistenz für den Selektionsmarker Geneticin, da mit diesem Antibiotikum die Selektion der Transformanden vorgenommen wurde, in denen *ILV6* deletiert wurde. Daher musste diese zunächst entfernt werden, um die Vektoren (pYCGPY2-Vektoren mit den Sc- und Lg-*BAT*-Genen) zu integrieren, die den gleichen Selektionsmarker tragen. Das Plasmid pNatCre (Abb. cc, siehe Anhang) enthält die Cre-Rekombinase, mit welcher es möglich ist, Genabschnitte zu entfernen, die zwischen zwei *loxP*-flankierenden Seiten liegen. Diese können z.B. Antibiotikaresistenzen sein (z.B. gegen Geneticin). Dabei ist die Sequenz für die Antibiotikaresistenz auf einer *loxP-kanMX-loxP*-Kassette verankert, die homolog in das Genom integriert. Dadurch können Gene spezifisch ausgeschaltet werden. Beim Entfernen der Resistenz durch die Cre-Rekombinase bleibt nur ein *loxP*-Stück zurück, sodass der Marker erneut verwendet werden kann (Gueldener *et al.*, 1996). Da das Plasmid neben der  $\beta$ -Lactamase auch eine *natMX*-Kassette mit dem Dominanzmarker *nat* enthält, bildete die Hefe eine Resistenz sowohl gegen Ampicillin ( $Amp^r$ ) als auch gegen das Antibiotikum Nourseothricin (ClonNAT) aus. Daher konnten die Hefen, die dieses Plasmid trugen, erfolgreich auf ClonNAT selektiert werden, um anschließend auf den Verlust des pNatCre-Plasmids mit Hilfe der PCR-Diagnostik (2.11.3.2) getestet zu werden. In die entsprechenden Hefeklonen wurden danach die *BAT*-pYCGPY2-Vektoren eingebracht.

### 3.3.4. Transformation von Brauhefe mit den konstruierten Vektoren

Nachdem die vier Plasmide ScBAT1pYCGPY2, ScBAT2pYCGPY2, LgBAT1pYCGPY2 und LgBAT2pYCGPY2 fertig konstruiert vorlagen, konnten sowohl diese als auch das leere Referenzplasmid in den Brauhefestamm C transformiert werden. Außerdem wurden die gleichen Vektoren in den Brauhefestamm C eingebracht, bei welchem beide Kopien des *ILV6*-Gens ausgeschaltet waren ( $\Delta\Delta ilv6$ ). Nach anschließender Kontrolle mittels PCR konnte bestätigt werden, dass die Transformation erfolgreich verlaufen ist (Daten nicht gezeigt). Somit liegen die Plasmide zusätzlich zum Genom in der Hefezelle vor, was eine erhöhte Proteinexpression der entsprechenden *BAT*-Gene nach sich zieht. Mit der Bestimmung des Anteils der plasmidtragenden Zellen (2.13.) konnte sichergestellt werden, dass der Vektor auch zum Ende der Gärungen noch zusätzlich zum hefeeigenen Genom in der Zelle vorlag. Da der Vektor pYCGPY2 ein

Centromer-Plasmid ist, konnte ausgeschlossen werden, dass die zusätzliche Kopie des jeweiligen Gens verloren gegangen ist.

Die modifizierten Stämme der Brauhefe C wurden wie in Tabelle 11 angegeben bezeichnet.

**Tabelle 11:** Stammnamen der modifizierten Brauefestämme. Lg: *Lager*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*.

Wildtyp oder eingebrahtes Gen	C+pYCGPY2 (mit/ohne Gen)		$\Delta\Delta ilv6$ +pYCGPY2 (mit/ohne Gen)	
	Stammname	Kurzname	Stammname	Kurzname
Wildtyp	Wt+	LSa	LS $\Delta\Delta ilv6$	LSA
Sc <i>BAT1</i>	LSpSc <i>BAT1</i>	LSb	LS $\Delta\Delta ilv6$ + pSc <i>BAT1</i>	LSB
Sc <i>BAT2</i>	LSpSc <i>BAT2</i>	LSc	LS $\Delta\Delta ilv6$ + pSc <i>BAT2</i>	LSC
Lg <i>BAT1</i>	LSpLg <i>BAT1</i>	LSd	LS $\Delta\Delta ilv6$ + pLg <i>BAT1</i>	LSD
Lg <i>BAT2</i>	LSpLg <i>BAT2</i>	Lse	LS $\Delta\Delta ilv6$ + pLg <i>BAT2</i>	LSE

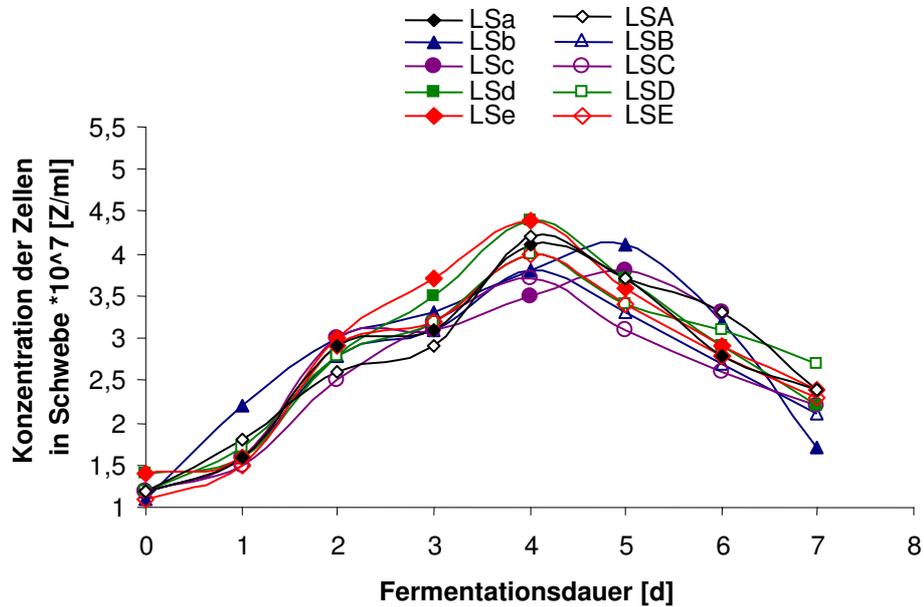
### 3.4. Kontrollfermentationen mit den zehn modifizierten Brauefestämmen

Nachdem die Plasmide zur Erhöhung der Genexpression der Gene *BAT1* und *BAT2* sowie die Referenzplasmide in die Brauhefe C bzw. die Doppeldelentionsmutante  $\Delta\Delta ilv6$  eingebracht waren, konnten diese für Fermentationen im Brauereimaßstab eingesetzt werden. Die genetisch veränderten Stämme wurden wie die Hefestämme A-F ebenfalls bei 11 °C in zylindronischen Tanks (30 l fassend) nach vorheriger Anzucht vergoren (siehe 2.8.). Deren Gärverlauf wurde durch die täglichen Messungen des Extraktgehaltes, der Konzentration der Zellen in Schwebel und des pH-Wertes kontrolliert. Außerdem wurden die Gehalte an gebildetem Diacetyl bestimmt. Nach der Lagerung der Biere wurden diese auf deren Mengen an höheren Alkoholen, Estern und niederen Fettsäuren untersucht. Auch hier folgte wieder eine sensorische Analyse zur qualitativen Einschätzung der Endbiere (siehe 2.8.).

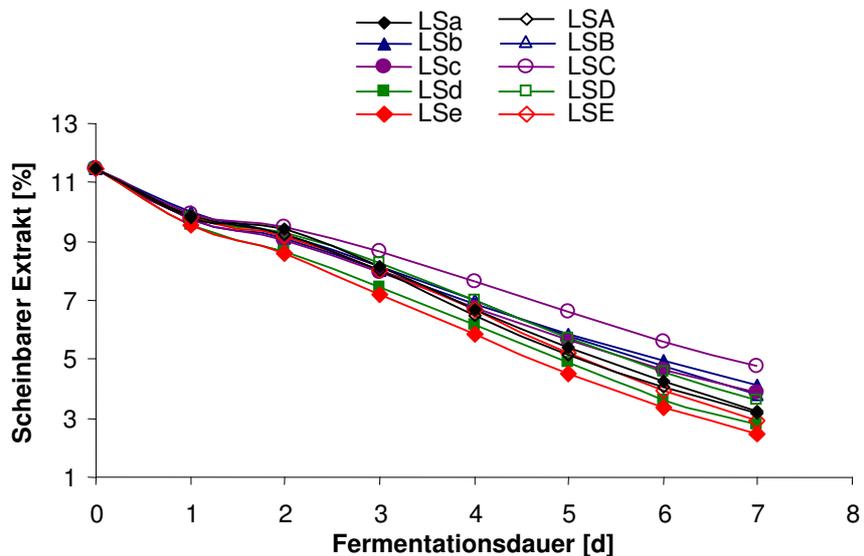
#### 3.4.1. Extraktgehalt, Zellzahl, pH-Wert

Wie aus Abbildung 18 und aus Abbildung 19 ersichtlich, verliefen die Gärungen für alle modifizierten Stämme ungefähr gleich. Die Stämme LSb und LSc erreichten ihr Maximum an Zelldichte allerdings im Gegensatz zu den anderen Hefen erst am 5. Tag der Gärung. Darüber hinaus waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Hefen zu vermerken. Die in der Würze vorhandenen Kohlenstoffquellen

wurden nahezu vollständig von den Zellen verbraucht, sodass die Fermentationen im für Pilsener-Gärungen üblichen Zeitrahmen (5-8 Tage) abgeschlossen werden konnten.

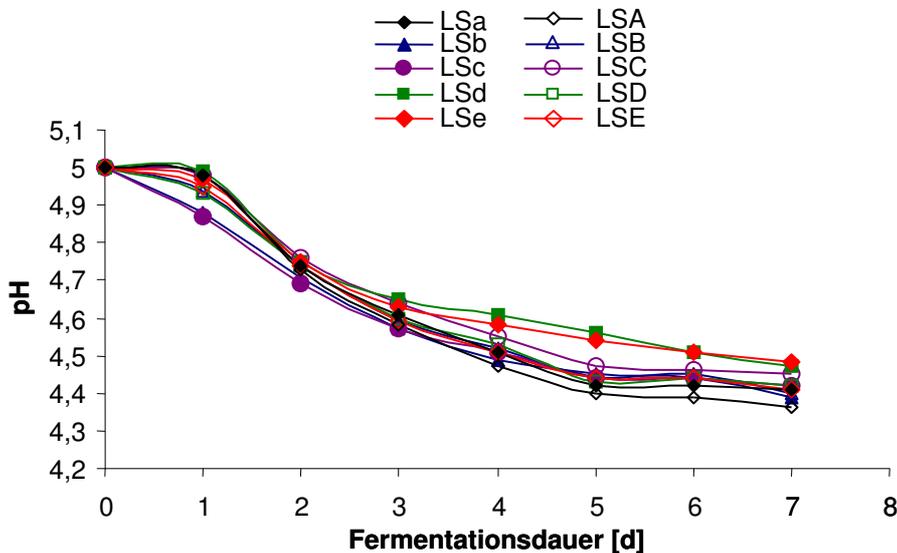


**Abbildung 18:** Fermentationen mit den zehn verwendeten, genetisch veränderten Braudefeststämmen LSA-LSe, LSA-LSE. Stammnamen siehe Tabelle 11. Gezeigt sind die Konzentrationen der Zellen in der Schwebel während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze (T = 11 °C, Stammwürze: 11,5%) in 30 I-ZKTs. Es ist der Verlauf einer Fermentation gezeigt.



**Abbildung 19:** Fermentationen mit den zehn verwendeten, genetisch veränderten Braudefeststämmen LSA-LSe, LSA-LSE. Stammnamen siehe Tabelle 11. Gezeigt sind die gemessenen scheinbaren Extraktgehalte während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze (T = 11 °C, Stammwürze: 11,5%) in 30 I-ZKTs. Es ist der Verlauf einer Fermentation gezeigt.

Die gemessenen pH-Werte lagen für alle modifizierten Brauhefestämme im gleichen, üblich sauren Bereich von 5 zu Beginn der Fermentationen und erlangten Werte zwischen 4,3 und 4,48 am jeweiligen letzten Probestag (Abbildung 20).



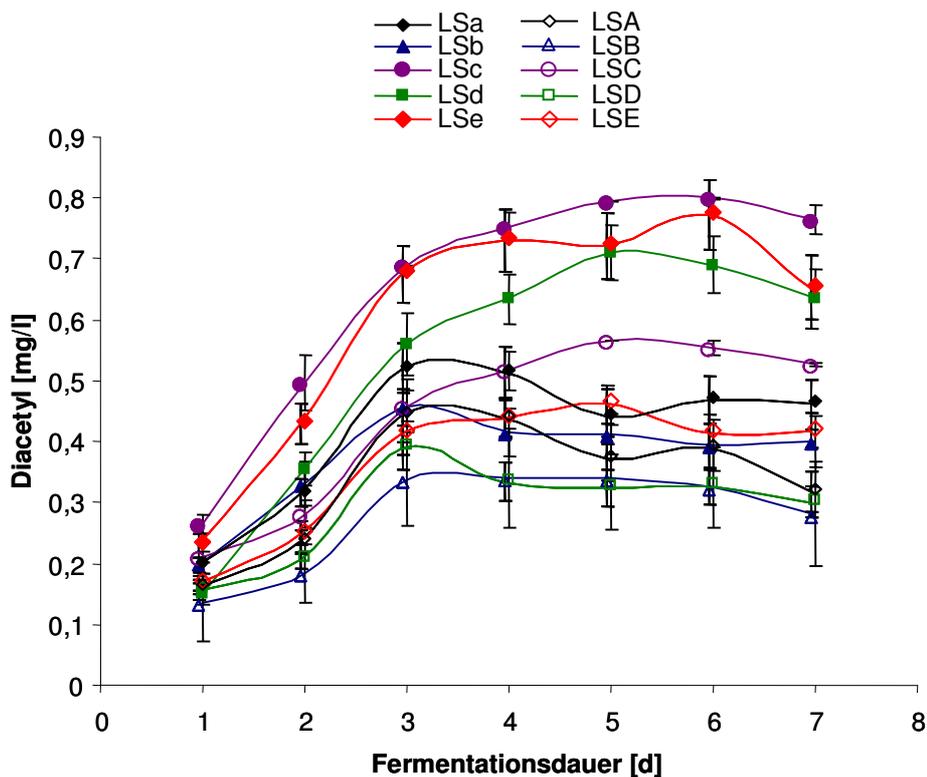
**Abbildung 20:** Fermentationen mit den zehn verwendeten, genetisch veränderten Brauhefestämmen LSA-LSe, LSA-LSE. Stammnamen siehe Tabelle 11. Gezeigt sind die gemessenen pH-Werte während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze ( $T = 11\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Stammwürze: 11,5%) in 30 I-ZKTs. Es ist der Verlauf einer Fermentation gezeigt.

### 3.4.2. Diacetyl

Aus Abbildung 21 ist zu erkennen, dass die Diacetylproduktion des Wildtyps, der nur das Referenzplasmid pYCGPY2 enthielt, im mittleren Bereich lag. Die Stämme, in welchen die *BAT2*-Gene überexprimiert wurden, produzierten stark erhöhte Diacetylgehalte. Generell wurde bei den Stämmen, die in der Expression des Gens *BAT1* verändert wurden, eine geringere Diacetylproduktion im Vergleich zu den *BAT2*-überexprimierten Hefen gemessen. Verglichen mit dem Wildtyp LSA produzierten die Hefen, die ein Plasmid mit dem *BAT2*-Gen trugen, bis auf den Stamm LSE mehr Diacetyl, alle *BAT1*-modifizierten Hefestämme bildeten jedoch weniger Diacetyl. Die jeweiligen zugehörigen Stammpaare (LSa und LSA, LSb und LSB, LSc und LSC, LSd und LSD sowie LSe und LSE) zeigten den gleichen Verlauf der Diacetylproduktion. Dabei lagen jedoch die Diacetylgehalte der Stämme, in denen zusätzlich die Doppeldeletion des *ILV6* vorlag, jeweils deutlich unter den Werten derjenigen Stämme, die nur die Plasmide zur Überexpression des entsprechenden Gens trugen.

Nachdem das *S. cerevisiae* *BAT2*-Gen (LSc) überexprimiert wurde, wurde mit +78,4% (Tag 5 der Fermentation) bzw. +66,1% (letzter Gärtag) der höchste Gehalt an Diacetyl

im direkten Vergleich zum Wildtyp Wt+ vermerkt. Der Stamm LSb produzierte bis zu 19,6% (Tag 4 der Fermentation) weniger Diacetyl als der Wildtyp (LSa). Die Produktion des Diacetyls wurde durch die Deletionen der Kopien des *ILV6*-Gens im Genom um 25,2% (LSA, Tag 2 der Fermentation) verringert. Am letzten Tag der Gärung konnte sogar ein Abfall des gemessenen Diacetyls um 30,6% verzeichnet werden. Durch die Überexpression des *Saccharomyces cerevisiae* *BAT1*-Gens in Kombination mit der *ILV6*-Doppeldelation (LSB) konnte die stärkste Reduktion des gebildeten Diacetyls um bis zu 42,7% an Tag 2 der durchgeführten Fermentation erreicht werden. Am Ende der Hauptgärung wurde eine Verringerung der Diacetylbildung um 39,7% bei demselben Stamm verzeichnet. Den Ergebnissen nach zu urteilen, scheinen die zur Modifizierung herangezogenen *Saccharomyces cerevisiae*-Gene also zu dem Zeitpunkt der Gärung etwas mehr Einfluss auf die Diacetylbildung zu haben als die entsprechenden *Lager*-Gene des Brauhefegenoms.

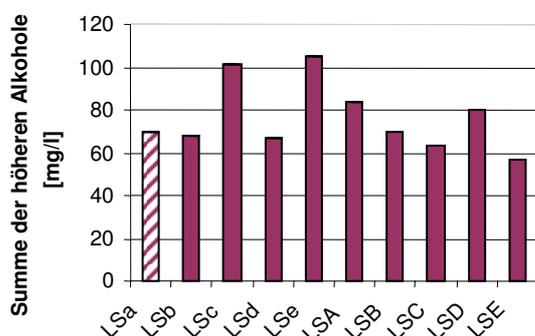


**Abbildung 21:** Fermentationen mit den zehn verwendeten, genetisch veränderten Brauefestämmen LSa-LSe, LSA-LSE. Stammnamen siehe Tabelle 11. Gezeigt sind die Verläufe der extrazellulären Diacetylkonzentration\* während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze (T = 11 °C, Stammwürze: 11,5%) in 30 l-ZKTs. Hier ist der Verlauf der Diacetyl-Gehalte einer Fermentation gezeigt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (aus vier parallelen Diacetylbestimmungen einer Probe).

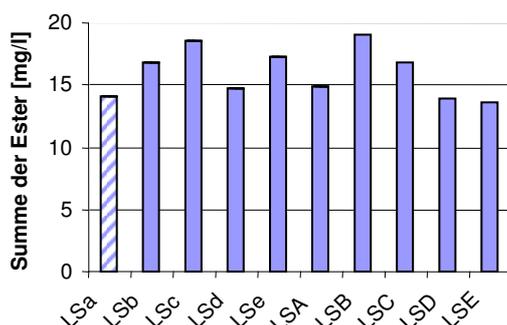
\* Es ist hier die Gesamtdiacetylkonzentration angegeben, d.h. die Summe aus freiem Diacetyl und dessen Vorstufe  $\alpha$ -Acetolactat.

### 3.4.3. Höhere Alkohole, Ester und niedere Fettsäuren

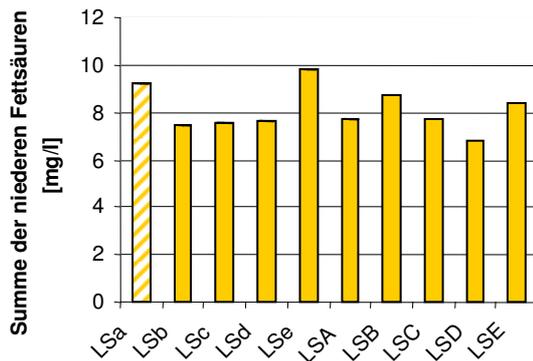
Die Gehalte der höheren Alkohole, der Ester und der niederen Fettsäuren unterschieden sich zwar vereinzelt voneinander (Abbildung 22, Abbildung 23 und Abbildung 24), lagen aber im üblichen Bereich für Pilsener Biere und hatten somit keine merklichen Auswirkungen auf den Biergeschmack. Im Vergleich zum Wildtyp konnten bei den Bieren der verschiedenen modifizierten Hefestämme keine großen Abweichungen festgestellt werden. Zu bemerken ist jedoch, dass die Stämme LSc und LSe die stärksten Abweichungen bei den höheren Alkoholen und einem Ester (Isoamylacetat) verglichen mit dem Wildtyp zeigten (siehe Anhang, Abb. s).



**Abbildung 22:** Fermentationen mit den zehn verwendeten, genetisch veränderten Brauhestämmen LSa-LSe, LSA-LSE. Stammnamen siehe Tabelle 11. Der Wildtyp ist schraffiert dargestellt. Gezeigt ist die Summe der höheren, aliphatischen Alkohole (C3-C5) im gelagerten Bier (4 Wochen bei 0 °C) während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze (T = 11 °C, Stammwürze: 11,5%) in 30 l-ZKTs. Dargestellt sind die Werte aus einer Fermentation (Einzelbestimmungen). Die Gärbedingungen entsprachen denen in der Legende von Abb. 23. Die gemessenen Gehalte der jeweiligen Alkohole sind im Anhang einzusehen.



**Abbildung 23:** Fermentationen mit den zehn verwendeten, genetisch veränderten Brauhestämmen LSa-LSe, LSA-LSE. Stammnamen siehe Tabelle 11. Der Wildtyp ist schraffiert dargestellt. Gezeigt ist die Summe der Ester (Ethylacetat, Isoamylacetat, Phenylethylacetat) im gelagerten Bier (4 Wochen bei 0 °C) während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze (T = 11 °C, Stammwürze: 11,5%) in 30 l-ZKTs. Dargestellt sind die Werte aus einer Fermentation (Einzelbestimmungen). Die Gärbedingungen entsprachen denen in der Legende von Abb. 23. Die gemessenen Gehalte der jeweiligen Ester sind im Anhang einzusehen.



**Abbildung 24:** Fermentationen mit den zehn verwendeten, genetisch veränderten Brauereifestämmen LSa-LSe, LSA-LSE. Stammnamen siehe Tabelle 11. Der Wildtyp ist schraffiert dargestellt. Gezeigt ist die Summe der niederen Fettsäuren (C3-C11) im gelagerten Bier (4 Wochen bei 0 °C) während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze (T = 11 °C, Stammwürze: 11,5%) in 30 I-ZKTs. Dargestellt sind die Werte aus einer Fermentation (Einzelbestimmungen). Die Gärbedingungen entsprachen denen in der Legende von Abb. 23. Die gemessenen Gehalte der jeweiligen Fettsäuren sind im Anhang einzusehen.

### 3.4.4. Sensorik

Der jeweilige Gesamteindruck des Endbieres wurde sensorisch von einem Verkostergremium mit zehn geschulten Personen getestet. Mit der chemisch-technischen und sensorischen Analyse des Bieres wurde der Nachweis geführt, dass bei den optimierten Stämmen keine unerwünschten neuen physiologischen Eigenschaften aufgetreten sind, die für die Bierherstellung von Nachteil sind. Die Biere erhielten von möglichen 5 Punkten 4,0 - 4,3 Punkte für die Qualität.

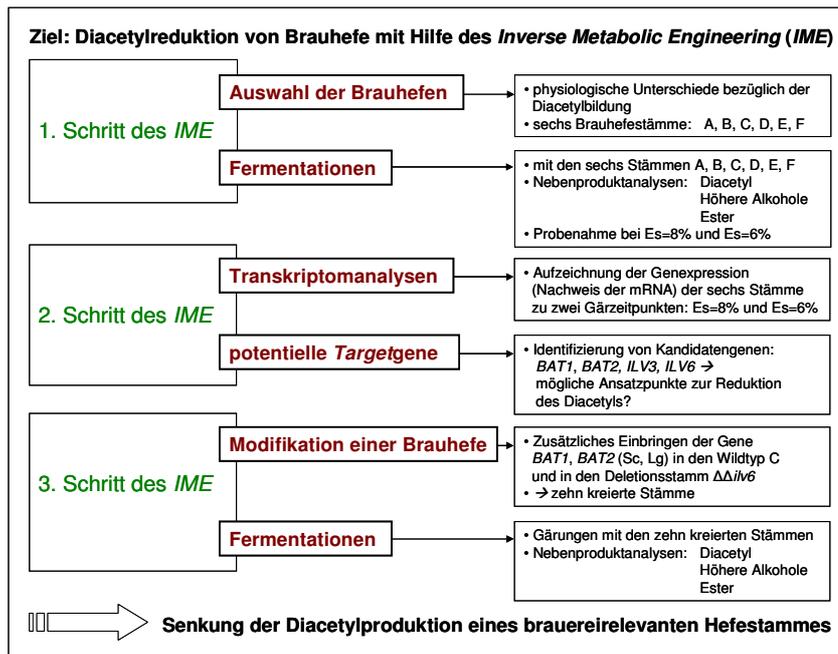
Allerdings war bei vier Bieren (LSb, LSe, LSD und LSE) ein Fehlaroma im Geruch und Geschmack nach Schwefel zu vermerken. Eine erhöhte Konzentration von Schwefelwasserstoff führt zu unangenehm riechenden und schmeckenden Bieren. Hefe bildet  $H_2S$  aus schwefelhaltigen Aminosäuren wie Cystein, die als Vorstufen für Fehlgeschmäcker in Bier gelten und setzt dieses zum Nachteil des Biergeschmacks frei (Hazelwood *et al.*, 2008). Dies kann von zu geringer Carbonisierung oder zu starker Bildung schwefelhaltiger Aminosäuren infolge einer Verstärkung der assimilatorischen Sulfatreduktion herrühren. Anhand der Punktevergabe lässt sich jedoch schlussfolgern, dass diese Aromaveränderungen nicht sehr gravierend waren.

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung von Brauhefen durch Anwendung des *Inverse Metabolic Engineering (IME)*. Hierfür mussten zunächst geeignete Stämme ausgewählt werden, die sich bezüglich ihrer spezifischen, brauereirelevanten Eigenschaften, insbesondere aber im Hinblick auf ihre Diacetylbildung unterscheiden. Um festzustellen, welche Gene für deren Unterschiede relevant sind, wurden im nächsten Schritt die Transkripte der sechs gewählten Hefen registriert und verglichen, wobei nur solche Gene interessant sind, bei denen signifikante Unterschiede ausgewiesen werden. Unter diesen können welche sein, die direkt mit der Diacetylbildung im Zusammenhang stehen. Hierbei sind insbesondere die Gene der Valinbiosynthese von Interesse, da aus diesem Stoffwechselweg die Diacetylproduktion resultiert. Die signifikant differentiell exprimierten Gene des Valinstoffwechsels (*ILV3*, *ILV6*, *BAT1*, *BAT2*) wurden im dritten Schritt als Kandidatengene betrachtet. Von diesen wurden zwei Gene (*BAT1*, *BAT2*) jeweils des *S. cerevisiae*- und des Lagergenomparts zusätzlich in den zu optimierenden Stamm eingebracht.\* Nach der Prüfung des Gärverhaltens der modifizierten Stämme im Rahmen von Fermentationen im Brauereimaßstab konnte eine starke Reduktion bezüglich der Diacetylproduktion vermerkt werden. Die Physiologie der Hefe wurde jedoch nicht negativ beeinflusst, was mit der Ermittlung der Nebenproduktgehalte kontrolliert wurde. Es war außerdem Ziel, ausschließlich hefeeigene Gene zu transferieren (Selbstklonierung) (Gentechnikgesetz, 1990. Letzte Änderung vom 01.04.2008). Ein Fließschema zur Vorgehensweise für die Bearbeitung des vorgelegten Themas ist in Abbildung 25 dargestellt.

---

\* Unabhängig von der Literatur wurde in dieser Abhandlung der Nicht-*Saccharomyces cerevisiae*-Genompart des Brauhefegenoms als *Lagerteil* bezeichnet. Sofern nicht anders gekennzeichnet, handelt es sich bei den Genangaben immer um *S. cerevisiae*-Gene.



**Abbildung 25:** Fließschema der Teilaspekte der vorliegenden Arbeit (siehe hierzu Text).

#### 4.1. Expressionsanalysen der sechs ausgewählten Brauhefestämme

Fermentationen mit den gewählten Stämmen A, B, C, D, E und F zeigten physiologische Unterschiede auf, wobei der Stamm D dabei im Vergleich zu den anderen Stämmen bezüglich der Zuckerverwertung am stärksten differierte. Außerdem wurden bei den Fermentationen mit diesem Stamm die höchsten Diacetylgehalte gemessen. Im Gegensatz dazu produzierte der Stamm B Diacetylgehalte, die sogar unter dem Geschmacksschwellenwert (0,1 ppm) lagen. Dieser Stamm neigt jedoch zu verstärkter Flockulation, was zu einer unvollständigen Zuckerverwertung führt. Damit waren die Voraussetzungen gegeben, um einen Brauhefestamm hinsichtlich der Diacetylproduktion zu optimieren.

Anschließend wurden für alle sechs Stämme A, B, C, D, E und F Transkriptomanalysen mit Hilfe der Microarray-Technologie mit *S. cerevisiae*-Chips (siehe 3.2.) durchgeführt. Dabei wurden die Expressionsstärken der zu zwei Zeitpunkten der Fermentation (8% bzw. 6% Extraktgehalt) aktiven Gene erfasst. Die beiden Zeitpunkte wurden gewählt, um die genetischen Unterschiede der Hefen zwischen der logarithmischen Wachstumsphase (Es = 8%) und dem Übergang zur stationären Phase (Es = 6%), in welcher sich die Zellvermehrung verlangsamt, aufzuzeigen.

Unter den detektierbaren Genen, deren Aktivitäten sich bei starker und schwacher Merkmalsausprägung signifikant voneinander abheben, sind immer auch solche, die direkt für die erwünschte Eigenschaft verantwortlich sind. Dabei kann es sich sowohl um Enzyme des Stoffwechselweges als auch um regulatorische Proteine handeln. Bei den durchgeführten Transkriptomanalysen wurden bei einem Extraktgehalt von  $Es = 8\%$  1546, bei  $Es = 6\%$  1080 Gene zwischen den sechs verschiedenen Hefestämmen als signifikant differentiell exprimiert klassifiziert. Unter diesen Genen wurden auch sehr viele gefunden, die in ihrer Funktion bereits bekannt sind. Mit der Zuhilfenahme verschiedener Auswertungsprogramme (SGD, KEGG, Babelomics-Tools) konnte der Großteil der identifizierten Gene seinen Biosynthesewegen und/oder Funktionen zugeordnet werden. Unter anderen konnten z.B. Basisfaktoren für die Transkription oder MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signalwege gefunden werden. Letztere regulieren unter anderem die Transkription vieler Zielgene, z.B. für das Zellwachstum. Häufig wurden Synthesewege für Aminosäuren registriert. Weiterhin wurden sehr viele Gene des Purin- bzw. Pyrimidin-Metabolismus (wie z.B. *POL32*, *MET3*), des Pyruvatmetabolismus (wie z.B. *PYK2*) und des Hefezellzyklus (wie z.B. *GRR1*, *SCC4*) identifiziert. Diese genannten Gene wurden häufig bei den untersuchten Stämmen als signifikant differentiell exprimiert gefunden.

Wie aus Tabelle 9 und Tabelle 10 ersichtlich, wurden bei beiden Gärzeitpunkten sehr viele signifikante Unterschiede zwischen den Hefestämmen B und D registriert. Besonders für die Gene *GAP1* (Aminosäure-Permease), *RSM7* (Ribosomales Protein), *RIX1* (Ribosom Export) und *PTK2* (Proteinkinase) wurden die höchsten Differenzen in ihrer mRNA-Expression festgestellt. Daraus lässt sich schliessen, dass diese Stämme, die sich in der Diacetylproduktion am meisten unterscheiden, auch generell die größten Unterschiede in der Expression ihrer mRNA aufweisen.

Die Expressionsmuster der sechs verschiedenen Hefestämme waren für die Gärzeitpunkte  $Es = 8\%$  und  $Es = 6\%$ , die in dieser Arbeit gemessen wurden, sehr ähnlich. Dies ist damit zu erklären, dass zunächst in der logarithmischen Phase und auch noch im Übergang zur stationären Phase die gleichen Stoffwechselwege signifikant aktiviert wurden, die für die Zellvermehrung der Hefe relevant sind. Diese Beobachtung stimmt mit denen von Olesen *et al.* (2002) überein. Allerdings resultieren andererseits sehr unterschiedliche Transkripte, wenn sehr ungleiche Gärphasen (z.B. frühe logarithmische und stationäre Phase) miteinander verglichen werden (Higgins *et al.*, 2003a). Dies wird in Bezug auf die Ergosterolsynthese während der ersten Gärphase deutlich. Bei James *et al.* (2003) wurden drei Gärzeitpunkte auf der Transkriptomebene untersucht. Hier wurden hohe Expressionslevel der an der

Ergosterolsynthese beteiligten Gene zu frühen Gärzeitpunkten gefunden. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen wurden für einen Extraktgehalt von 8% ebenfalls hohe Gen-Aktivitäten dieses Stoffwechsels festgestellt. Dies erscheint logisch, da Ergosterol notwendigerweise verstärkt von Hefen zu Beginn der Gärung gebildet wird, wenn noch Sauerstoff vorhanden ist, um u. a. die Hefezellmembranen zu stabilisieren (Bracher, 2003). Transkriptomanalysen können darüber hinaus die Bedingungen widerspiegeln, die während einer Gärung vorherrschen. Spezielle Gärbedingungen wie z.B. Zink-, Eisen- oder Nährstoffmangel wurden in verschiedenen Arbeiten betrachtet (ter Linde *et al.*, 1999; Gasch *et al.*, 2000; de Nobel *et al.*, 2001; Yale und Bohnert, 2001; Yoshimoto *et al.*, 2002b; Higgins *et al.*, 2003b; Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004). Auch hier konnte gezeigt werden, dass sich die Aktivitäten der beteiligten *S. cerevisiae*-Gene bei veränderten Parametern von denen bei stabilen Bedingungen unterscheiden.

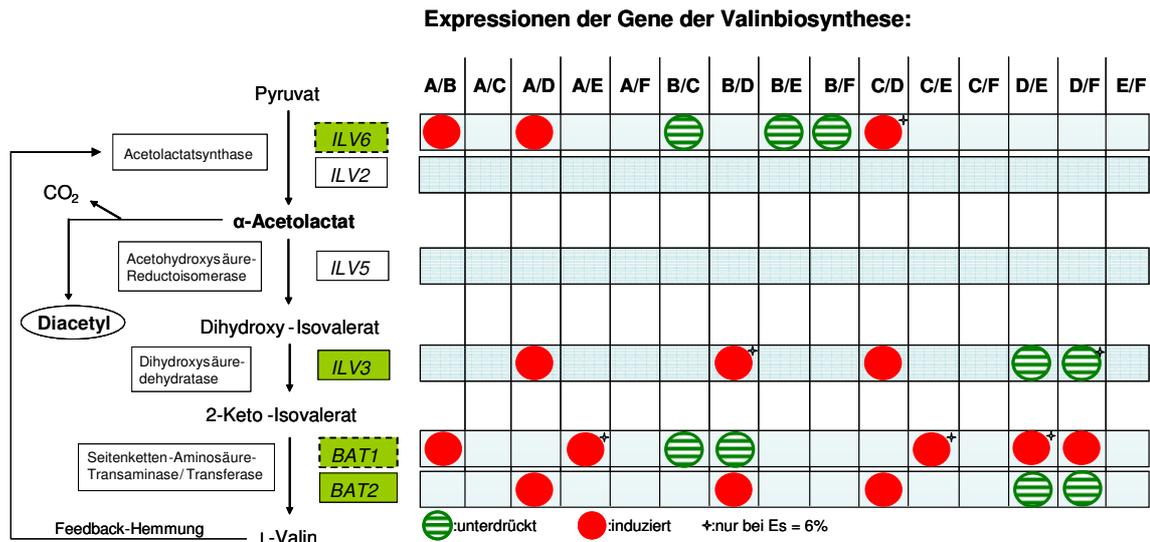
Mit Hilfe der Expressionsdaten konnte außerdem bestätigt werden, dass die Stämme A und C sehr eng miteinander verwandt sind, da nur wenige Unterschiede (9 bei Es = 8%, 25 bei Es = 6%) gefunden werden konnten. Der Stamm D hingegen ist verwandtschaftlich sehr weit entfernt und zeigt die meisten signifikanten Unterschiede im direkten Vergleich mit den anderen Hefestämmen. Dies war auch zu erwarten, da der Stamm D aus einer vietnamesischen Brauerei stammt und wenig mit in deutschen Brauereien verwendeten Hefen gemeinsam hat (z.B. weder gute Vermehrungseigenschaften noch geringe Diacetylbildung). Dies konnte auch durch die Clusteranalyse bekräftigt werden, welche die Vielfalt von Brauhefen mit den verschiedenen Merkmalsausprägungen aufzeigt (z.B. bei verschiedenen Zeitpunkten einer Fermentation, Olesen *et al.* (2002); Yoshida *et al.* (2007)) und verwandtschaftliche Beziehungen von Hefen einer Art darzustellen vermag (Kellis *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2004).

## **4.2. Signifikant differentiell exprimierte Gene der Valinbiosynthese**

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Diacetylbildung von Brauhefen zu reduzieren. Um nun mögliche Zusammenhänge zwischen der produzierten Diacetylmenge und den erhaltenen Expressionssignalen auf bestimmte Gene zurückzuführen, wurden die Gene der Valinbiosynthese betrachtet. Diacetyl wird spontan aus  $\alpha$ -Acetolactat gebildet, welches wiederum ein Zwischenprodukt im

Valinbiosyntheseweg darstellt. Tatsächlich konnten unter den differentiell exprimierten Genen solche gefunden werden, die in die Valinbiosynthese involviert sind. Diese stellen Kandidatengene dar, welche vermutlich die phänotypischen Unterschiede hinsichtlich der Diacetylbildung der sechs verschiedenen Brauhefen verursachen. Diese Gene waren *ILV3* (Dihydroxysäure-Dehydratase), *ILV6* (Acetolactatsynthase), *BAT1* (Seitenketten-Aminosäure-Transaminase) und *BAT2* (Seitenketten-Aminosäure-Transferase) (siehe Valinstoffwechsel, Abbildung 11). Bei den Genen *ILV6* und *BAT1* wurde sogar ein deutlicher linearer Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke und der gemessenen Diacetylkonzentration festgestellt. Der einzige Brauhefestamm, bei welchem diese Abhängigkeit nicht aufgezeigt werden konnte, ist der Stamm D. Hier könnte die hohe Diacetylproduktion daher andere Gründe haben, z.B. eine sehr geringe Expression von *BAT2*. Da aber erstaunlicherweise die Expressionssignale des Gens *BAT2* für die Stämme A, B und C ungefähr gleich sind und sich die Expressionsdaten von *BAT1* zwischen jeweils A und B bzw. C und B um ein fast Zweifaches unterscheiden, könnte diese Tatsache dafür sprechen, dass das *BAT1*-Genprodukt eine entscheidende Rolle in der Diacetylbildung des jeweiligen Hefestammes spielt. Somit wurden, insbesondere mit *ILV6* und den *BAT*-Genen, äußerst interessante, potentielle *Target*gene identifiziert, deren Expressionsstärke einen direkten Einfluss auf die Diacetylproduktion zu haben scheint.

Die Expressionsmuster der *S. cerevisiae*-Hefegene der untersuchten Stämme fielen für beide Zeitpunkte der Gärungen von 8% und 6% Extraktgehalt sehr ähnlich aus. Für die vier signifikant differentiell exprimierten Gene der Valinbiosynthese (*ILV3*, *ILV6*, *BAT1*, *BAT2*) wird dieser Zusammenhang besonders deutlich. Speziell für die Gene *ILV6*, *BAT1* und *BAT2* ist zu erkennen, dass diese als signifikant differentiell exprimiert ausgewiesenen Gene bei allen Stämmen gefunden wurden. Daher ist die Chance groß, dass diese Gene erheblich in die Diacetylbildung involviert sind (Abbildung 26). Dass Metabolite direkt auf Expressionssignale der an deren Synthese bzw. Verstoffwechslung beteiligten Enzyme zurückzuführen waren, konnte bereits gezeigt werden (Petersson *et al.*, 2006; Rossouw *et al.*, 2008).

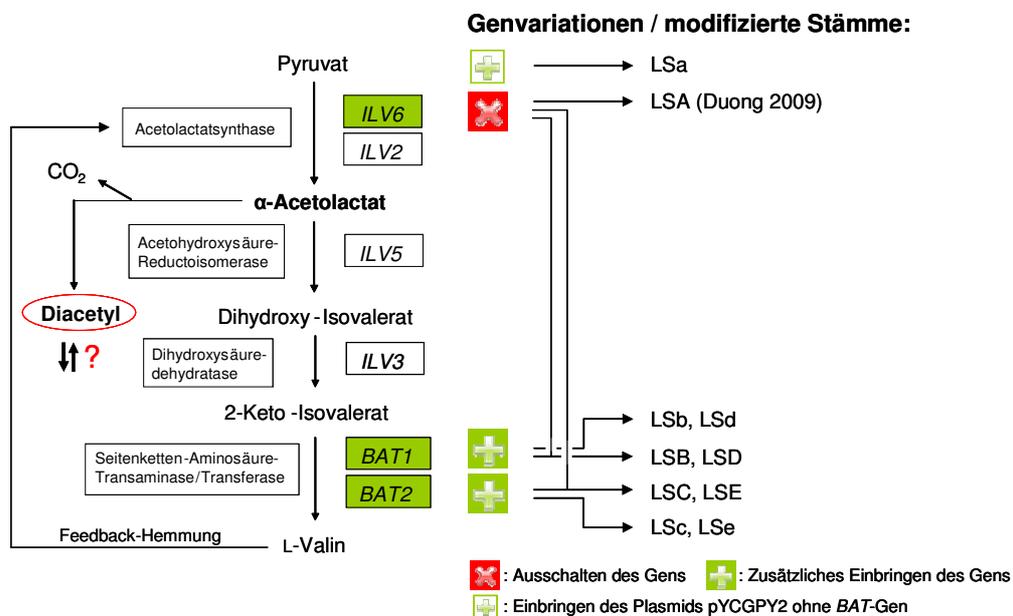


**Abbildung 26:** Valinbiosynthese von Hefen. Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von 8% bzw. 6% geerntet (Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Es wurden signifikant differentiell exprimierte Gene des Valinstoffwechsels gefunden (farbig unterlegt). Erläuterungen der Gene siehe Abbildung 2. Gezeigt sind die Expressionssignale der jeweiligen Gene in direkten, paarweisen Stammvergleichen. Ein grüner, schraffierter Kreis kennzeichnet ein unterdrücktes Signal für niedriger exprimierte Gene ( $\log_2\text{ratio} \leq -1$ ), rot ein induziertes Signal für höher exprimierte Gene ( $\log_2\text{ratio} \geq +1$ ) im Vergleich zu dem Expressionssignal des Vergleichsstamms. Ein Stern kennzeichnet, dass diese Gene nur bei Es = 6% als signifikant differentiell exprimiert gefunden wurden. Die Gene *ILV6* und *BAT1* scheinen stark an der Diacetylproduktion beteiligt zu sein (gestrichelter Rahmen).

### 4.3. Genvariationen und modifizierte Stämme

Nach den Ergebnissen der Transkriptomanalysen scheinen die Gene *ILV6* und *BAT1* vielversprechende *Targets* für eine gezielte Reduktion der Diacetylproduktion zu sein, da eine starke lineare Abhängigkeit zwischen der Expressionshöhe und der Diacetylproduktion erkennbar war. Bei dem Gen *ILV3* hingegen war dies nicht der Fall, weshalb es für eine Modifizierung nicht in Frage kam. Die Veränderung der Aktivität vom *ILV6*-Gen wurde parallel zur vorliegenden Arbeit durchgeführt, sodass daher die *BAT*-Gene für die Modifizierungen ausgewählt wurden (Duong, 2009). Um den Ergebnissen der Analyse auf Transkriptomebene zu entsprechen, sollte *BAT1* deletiert werden, was jedoch zu langsamem Wachstum führte (Lilly *et al.*, 2006b). Der von Kispal und Mitarbeitern (1996) generierte Doppeldeletionsstamm  $\Delta bat1\Delta bat2$  war in seinem Wachstum sehr stark eingeschränkt, da er für die Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin auxotroph ist (Kispal *et al.*, 1996). Laut Microarraydaten sollte eine

*BAT2*-Überexpression folgen. Um zu klären, inwieweit die Gene einen Einfluss auf die Produktion des Diacetyls haben (*proof of concept*), wurden die *BAT*-Gene überexprimiert, sodass eine Erhöhung der Aktivität des jeweiligen Gens im veränderten Stamm resultierte. Um die Einzeleffekte der Modifizierungen nachvollziehen zu können, wurden die *BAT*-Gene (*Lager*, *S. cerevisiae*) jeweils separat in den brauereirelevanten Hefestamm C transferiert (Abbildung 27). Dieser Stamm gewährleistet eine schnelle Fermentation, produziert aber dennoch zu viel Diacetyl, sodass eine Verbesserung diesbezüglich sinnvoll erschien. Anschließend wurden die jeweiligen *BAT*-Gene auch in eine Mutante des Stamms C eingebracht, der beide *ILV6*-Kopien des *S.cerevisiae*-Genoms fehlten ( $\Delta\Delta ilv6$ ) (Abbildung 27). Hiermit sollte eine mögliche Verstärkung des durch Deletion von *ILV6* bedingten Reduktionseffektes bezüglich des Diacetyls dargelegt werden.



**Abbildung 27:** Valinbiosynthese von Hefen. Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von 8% bzw. 6% geerntet (Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Signifikant differentiell exprimierte Gene wurden farbig unterlegt. Erläuterungen der Gene siehe Abbildung 2. Angegeben sind die genetischen Veränderungen, die im Stamm C vorgenommen wurden und die Stammnamen der kreierten Brauhefen LSA-LSe, LSA-LSE. Stammnamen siehe Tabelle 11.

#### 4.4. Reduktion der Diacetylbildung durch gezielte, genetische Veränderungen

Durch die Modifizierungen wurde eine Verringerung der Diacetylbildung um maximal 40% (Überexpression des *BAT1* in der  $\Delta\Delta ilv6$ -Mutante) am Ende der Fermentation im Vergleich zum Wildtyp erreicht (siehe Abbildung 21). Dabei wurden aber keine Unterschiede im Gärverhalten bezüglich des Wachstums oder der Fermentationsdauer festgestellt. Dennoch produziert der kreierte Stamm noch etwa doppelt so viel Diacetyl wie der native Stamm B. Dies mag damit zusammenhängen, dass dieser Stamm die niedrigste Genexpression von *BAT1* und die höchsten Signale für *BAT2* aufwies. Die Expressionssignale des Stamms D beispielsweise verhielten sich für diese Gene gegenläufig, sodass diese Kombination der mRNA-Expressionen für die unterschiedliche Diacetylproduktion verantwortlich zu sein scheint, die beim Stamm C so nicht nachgewiesen wurde.

Da *BAT1* in der logarithmischen Phase der Fermentation und *BAT2* in der stationären Phase exprimiert wird (Eden *et al.*, 1996), ist das Gen *BAT1* zu diesem Zeitpunkt der Gärung wohl stärker an der Diacetylproduktion als *BAT2* beteiligt. Die späte Expression des Gens *BAT2* erklärt somit auch den kontinuierlichen Anstieg der Diacetylwerte bei den Stämmen, bei welchen das jeweilige *BAT2*-Gen (Lg, Sc) überexprimiert wurde (Abbildung 21). Außerdem kann anhand der Ergebnisse vermutet werden, dass die Gene *BAT1* und *BAT2*, die im *S. cerevisiae*-Genom der Brauhefe lokalisiert sind, einen größeren messbaren Effekt auf die Bildung des Diacetyls hatten als die entsprechenden *Lager*-Gene des Brauhefegenoms. Möglicherweise werden die *Lager*-Gene anders reguliert als die *S. cerevisiae*-Gene von Brauhefen. Dafür spricht auch die Regulation der *BAP2*-Gene (Sc, Lg; Permeasen für Valin, Leucin und Isoleucin), da das *S. cerevisiae*-*BAP2*-Gen durch den Zusatz von Leucin induziert wird, das entsprechende *Lager*-Gen hingegen nicht (Kodama *et al.*, 2001).

Die Genprodukte von *ILV2* und *ILV6* unterliegen einer sogenannten Feed-back-Hemmung durch Valin (Mifflin, 1971; Pang und Duggleby, 2001). Diese Hemmung ist durch ATP wieder rückgängig zu machen, wobei hohe Konzentrationen an Phosphat und neutrale pH-Werte diese Umkehrung begünstigen (Pang und Duggleby, 1999). Die Enzyme, die durch die Gene *BAT1* bzw. *BAT2* kodiert werden, katalysieren den Transfer von Aminogruppen zwischen den Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin und ihren korrespondierenden  $\alpha$ -Ketosäuren. Letztere sind die biosynthetischen Vorstufen von höheren Alkoholen, die den Geschmack des Bieres beeinflussen

(Schoondermark-Stolk et al., 2005). Wie weit allerdings die Expressionstärke dieser Gene Einfluss auf die Diacetylproduktion der Hefe hat, ist bisher noch ungeklärt.

Die Expressionsdaten gaben Grund zu der Annahme, dass ein Ausschalten des *BAT1*-Gens und eine Erhöhung der *BAT2*-Aktivität zu einer Senkung des Diacetyls führen würden. Da die Ergebnisse der Transkriptomanalysen jedoch nicht eindeutig ausfielen und das Gen *BAT2* beispielsweise in den Stämmen A, B und C etwa gleich hoch exprimiert wurde, deren Diacetylgehalte sich jedoch deutlich unterschieden (Abbildung 6), konnte keine Aussage getroffen werden, ob es günstig ist, das jeweilige Gen *BAT1* oder *BAT2* in seiner Aktivität zu erhöhen oder es auszuschalten. Um nähere Informationen bezüglich der Regulation der Valinbiosynthese zu erhalten, wurden die Gene *BAT1* und *BAT2* zunächst überexprimiert. Wie nun in weiteren Versuchen gezeigt werden konnte, lenkt eine Überexpression des Gens *BAT1* die metabolischen Flüsse in Richtung des Valins, wobei eine Diacetylreduktion vermerkt werden konnte. Letztere entsprach jedoch nicht den nach den Microarraydaten zu erwartenden Ergebnissen. Erklärungen für diese Diskrepanz können unterschiedliche Regulationen auf der Ebene des Proteoms bzw. des Metaboloms sein. Eine hohe mRNA-Expression eines bestimmten Gens muss nicht zwangsläufig auch hohe Mengen des (Enzym-) Produkts, für welches dieses Gen kodiert, bedeuten. Außerdem betragen die Sequenzhomologien zwischen den Genen *BAT1* und *BAT2* 77%, sodass die Hybridisierung an den Sonden der Microarrays nicht spezifisch genug abgelaufen sein mag. Unterschiedliche Diacetylgehalte im Bier können auch die Folge von unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzungen der verwendeten Würzen sein. Speziell Valin hat hier einen besonderen Einfluss (Petersen et al., 2004). Da jedoch die Clusteranalysen (siehe Abbildung 10) trotz unterschiedlicher, verwendeter Würzen sehr grosse Übereinstimmungen zwischen den drei jeweiligen Stamm-Proben aufzeigten, wird dieser Zusammenhang nicht ausschlaggebend gewesen sein. Der wesentliche Grund für die aufgetretenen Unstimmigkeiten ist wohl die bereits erwähnte, notwendige Kombination aller zur Ausprägung eines Merkmals beitragenden genetischen Informationen. Es scheint daher nötig, dass für eine niedrige Diacetylbildung mindestens sowohl eine geringe Genexpression für *BAT1* als auch ein hohes Expressionssignal für das Gen *BAT2* vorliegen müssen.

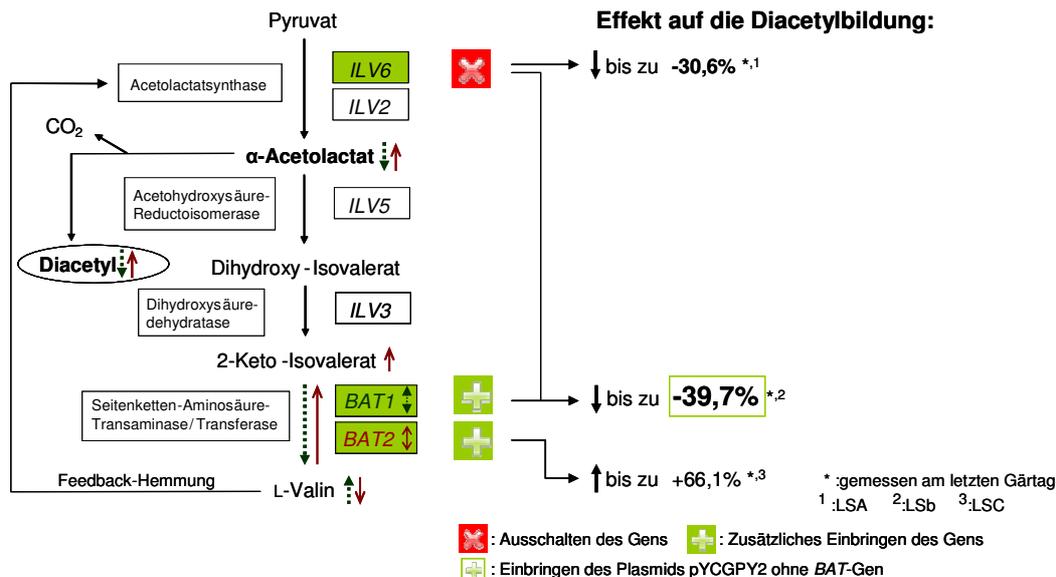
Wurden Valin-Konzentrationen von 0 mM bis 5 mM zum verwendeten Medium einer durchgeführten Gärung zugesetzt, konnte ein linearer, starker Abfall des Diacetyls mit zunehmenden Valingehalten gemessen werden (Stamm D, Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet abermals, dass eine Erhöhung des Valins, sei es durch Zugabe von außen oder durch Lenkung des metabolischen Flusses, die Acetolactatsynthese in ihrer

Funktion hemmt, sodass weniger Diacetyl resultiert. Durch die Überexpression von *BAT1* wird genügend Valin für die Zelle gebildet, wodurch das Enzym des Gens *ILV6* offenbar gehemmt wird, sodass weniger  $\alpha$ -Acetolactat entsteht. Der Bildung von Valin wird somit entgegengewirkt, was sich im Rückgang der Diacetylproduktion äußert (Abbildung 28). Eden und Mitarbeiter (1996) diskutierten, ob das Produkt des Gens *BAT1* eventuell nur als Transporter der  $\alpha$ -Ketosäuren aus dem Mitochondrium in das Cytosol dient. Dies kann jedoch durch die dargelegten Ergebnisse widerlegt werden. Zudem kodieren die *BAP*-Gene (Permeasen, *BAP1*, *BAP2*) für Seitenketten-Aminosäure-Transporter (Kodama *et al.*, 2001).

Die verstärkte Diacetylbildung nach der Erhöhung der Aktivität des *BAT2*-Gens kommt womöglich dadurch zustande, dass das entsprechende Enzym gegenläufig zur *BAT1*-Transaminase wirkt, wodurch die reversible Bildung der  $\alpha$ -Ketosäure katalysiert wird (Eden *et al.*, 2001) (Abbildung 28). Dadurch kommt es in der Zelle zu einer Anhäufung der Vorstufe von Valin, was zu einer erhöhten *ILV2*-Aktivität führt. Konsequenz ist eine verstärkte Diacetylbildung vor allem in der stationären Phase, da *BAT2* in diesem Zeitintervall aktiviert wird.

Dadurch dass das Genprodukt von *ILV6* eine regulatorische Untereinheit des *ILV2*-Genprodukts (katalysiert die Bildung von  $\alpha$ -Acetolactat) darstellt und die Feedback-Hemmung auf *Ilv2p* überträgt, durch welche die Aktivität des *ILV2* höchstwahrscheinlich erhöht wird (Pang und Duggleby, 1999), wird auch verständlich, warum durch die *ILV6*-Doppeldelation das Diacetyl reduziert wird. Die Aminosäuresynthese ist dann bereits zwischen Pyruvat und  $\alpha$ -Acetolactat gebremst, sodass nicht mehr „genügend“ von letzterem zur Verfügung steht. Hiermit lässt sich ebenso erklären, dass durch Überexpression der *BAT2*-Gene die  $\alpha$ -Acetolactat-Bildung initiiert wird, wodurch mehr Diacetyl gebildet wird. Dadurch erscheint es logisch, dass bei den Kombinationsmutanten LSC bzw. LSE, bei denen das *S. cerevisiae*- bzw. *Lager-BAT2* überexprimiert wurde, jedoch das *ILV6* fehlt, keine verstärkte Bildung des Diacetyls erfolgen kann (siehe Abbildung 28).

Dagegen führt eine Kombination der Doppeldelation des *ILV6* und der Erhöhung der *BAT1*-Aktivität demzufolge zu einer stark verringerten Diacetylproduktion, da Valin angehäuft wird und die Feedback-Hemmung nicht mehr vermittelt wird. Die katalytische Aktivität des *ILV2* wird somit nicht vervielfacht.



**Abbildung 28:** Valinbiosynthese von Hefen. Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von 8% bzw. 6% geerntet (Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Signifikant differentiell exprimierte Gene wurden farbig unterlegt. Erläuterungen der Gene siehe Abbildung 2.

Fermentationen mit den zehn verwendeten, genetisch veränderten Brauhefestämmen LSA-LSe, LSA-LSE. Stammnamen siehe Tabelle 11. Dargestellt sind die Effekte der genetischen Veränderungen auf die Diacetylbildung (gemessen am letzten Gärtag) bei folgenden Stämmen: LSA, LSb und LSC. Die farbig markierten bzw. gepunkteten oder offenen Pfeile geben die Wirkrichtung im Stoffwechselweg bzw. die Auswirkungen des entsprechenden Genprodukts auf die Diacetylbildung und Metabolite des Valinstoffwechsels an.

Die Gene *BAT1* und *ILV6* stellen demnach „Stellschrauben“ in der Reduktion der Diacetylbildung von Brauhefen dar. Die starke Senkung des im Bier am meisten störenden Nebenprodukts macht es damit Brauereien möglich, ihre eigenen Produktionsstämme mit positiven Eigenschaften anderer Stämme „nachzurüsten“. Der große praktische Nutzen liegt darin, dass der zeitliche Aufwand, um das Diacetyl in Nachgärungen abzubauen, eventuell geringer wird.

#### 4.5. Einfluss der Modifizierungen auf die Bildung höherer Alkohole und Ester

Aus den Ergebnissen wird klar, dass die Gehalte der höheren Alkohole und Ester der modifizierten Stämme zwar vereinzelt schwankten, aber im üblichen Bereich für Pilsener Biere lagen (siehe 3.4.3) (Kunze, 2004). Auffällig war jedoch, dass die Stämme LSc und LSe (Überexpression des *S. cerevisiae*- bzw. *Lager-BAT2*-Gens) die

stärksten Abweichungen bei den höheren Alkoholen und Estern verglichen mit dem Wildtyp zeigten. Wie schon bei der Diacetylproduktion wurden auch hier stark erhöhte Mengen produziert. Gehalte an höheren Alkoholen über 100 mg/l wie bei den genannten Stämmen können den Biergeschmack beeinträchtigen, angestrebt werden 60-90 mg/l (Kunze, 2004).

Vorstufen für die gute, aber auch schlechte Geschmacksausbildung im Bier sind nicht nur schwefelhaltige Aminosäuren, sondern auch Seitenkettenamino-säuren wie Valin, Leucin und Isoleucin (Hazelwood *et al.*, 2008). Aus diesen Aminosäuren werden über Desaminierung und Decarboxylierung über den Ehrlich-Stoffwechsel höhere Alkohole gebildet, die noch weiter zu Estern reagieren können (Dickinson *et al.*, 2000). So wird aus Valin Isobutanol (Methylpropanol), aus Leucin Isoamylalkohol (3-Methylbutanol) und aus Isoleucin aktiver Amylalkohol (2-Methylbutanol) gebildet (Hazelwood *et al.*, 2008). Höhere aliphatische Alkohole vermitteln einen süßlichen Geschmack und haben einen großen Einfluss auf den Geschmack des Bieres (Schoondermark-Stolk *et al.*, 2006). Außerdem werden höhere Alkohole verstärkt produziert, sobald die Aminosäurekonzentration in der Würze abnimmt (Erklärung siehe weiter unten). So wird mehr Isoamylalkohol bei Leucinmangel, hingegen mehr Isobutanol bei fehlendem Valin gefunden (Kunze, 2004). Derrick und Large (1993) konnten letzteres mit Valin als limitierte Stickstoffquelle bestätigen.

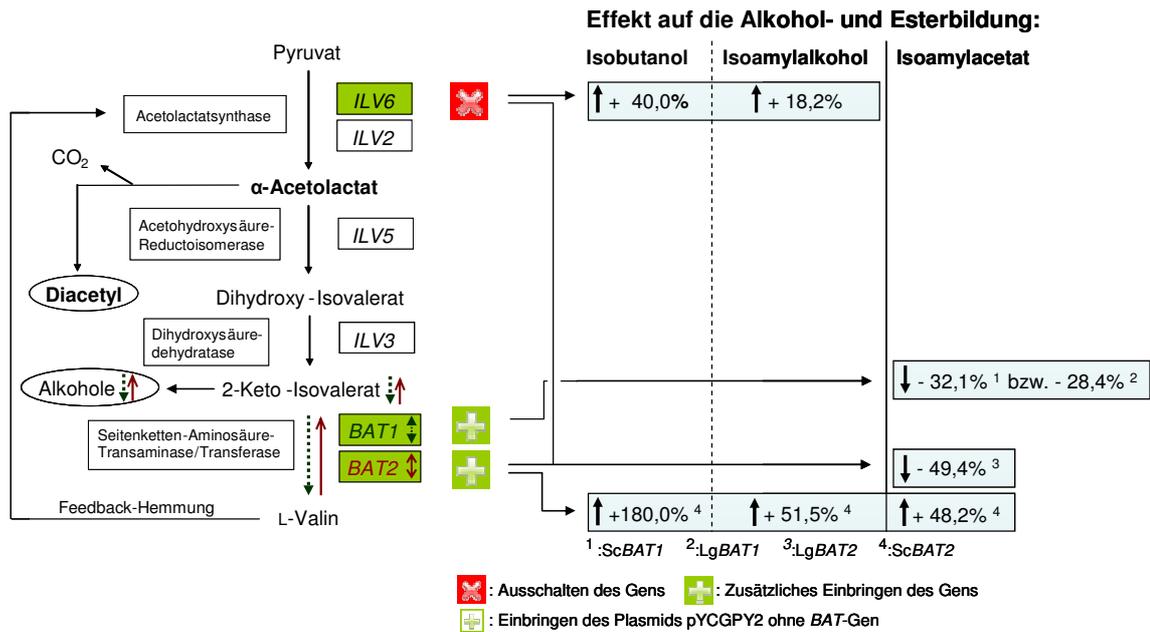
Veränderungen der *BAT*-Gene beeinflussten sowohl die Alkoholproduktion (Isobutanol und Isoamylalkohol) als auch das Zellwachstum. So haben Lilly und Mitarbeiter (2006b) herausgefunden, dass eine Deletion von *BAT1* zu langsamem Wachstum führte oder die Zelldichte der stationären Phase um 30% im Vergleich zum Wildtyp reduziert wurde (Dickinson und Norte, 1993). Die Doppeldeletionsmutante  $\Delta bat1\Delta bat2$  war in ihrem Wachstum sehr stark eingeschränkt, da diese für die Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin auxotroph ist (Kispal *et al.*, 1996). Die Stämme, deren Aktivität der *BAT*-Gene im Rahmen dieser Arbeit erhöht wurde, zeigten kein signifikant verändertes Wachstum verglichen mit dem Wildtyp (siehe 3.4.1). Es wurde aber ein direkter Effekt auf die Isobutanol- und Isoamylalkoholproduktion festgestellt, nachdem die *BAT*-Gene einzeln oder in Kombination ausgeschaltet wurden (Lilly *et al.*, 2006b). Eine Single-Deletion des *BAT2* resultierte in einer starken Abnahme der Isoamylalkoholproduktion (Lilly *et al.*, 2006b). Nachdem *BAT2* inaktiviert wurde, vermerkten Eden *et al.* (2001) einen drastischen Reduktionseffekt in der Isobutanolproduktion der Hefe. Sobald das *BAT1*-Gen einzeln oder *BAT1* und *BAT2* zusammen ausgeschaltet vorlagen, wurde außerdem festgestellt, dass andere Transaminasen die Funktionen der fehlenden Enzyme übernehmen. Dabei ist

auffallend, dass es keine Überregulation weiterer Transaminasen gibt, sofern *BAT2* nicht mehr aktiv ist. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass das Genprodukt von *BAT1* für die Alkoholbildung nicht relevant ist, jenes von *BAT2* aber eine große Rolle hierbei spielt (Schoondermark-Stolk *et al.*, 2005).

Es wurde bereits erläutert, dass die Stämme LSc und LSe die höchsten Gehalte an höheren Alkoholen aufwiesen. Auch die Isobutanolproduktion war in diesen Stämmen stark erhöht, nachdem das *BAT2* überexprimiert wurde. So produzierte der Stamm LSe das 2,1fache und der Stamm LSc sogar das 2,8fache an Isobutanol im Vergleich zum Wildtyp. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Erhöhung der *BAT2*-Aktivität einen Anstau der korrespondierenden Vorstufe der jeweiligen Aminosäure bewirkt. Es resultiert eine geringere Menge der Aminosäure, was wiederum die Alkoholbildung verstärkt (Abbildung 29). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die geringeren Alkoholgehalte bei Deletion des *BAT2*-Gens (Eden *et al.*, 2001; Lilly *et al.*, 2006b) bzw. die erhöhten Werte bei Überexpression der *BAT2*-Gen-Aktivitäten (eigene Arbeiten) korrelieren.

Katalysiert von Acetyltransferasen (ATF) werden aus Alkoholen (siehe oben) und Acetyl-CoA die entsprechenden Ester gebildet (Fukuda *et al.*, 1998). So entsteht aus Valin Isobutylacetat (Essigsäure-2-Methylpropylester), aus Leucin Isoamylacetat (Essigsäure-3-Methylbutylester) und aus Isoleucin 2-Methylbutylacetat (Essigsäure-2-methylbutylester) (Hazelwood *et al.*, 2008). Für die fruchtige Komponente des Bieres spielen allerdings neben den genannten Estern noch Ethylacetat sowie Phenylethylacetat eine Rolle, obwohl ca. 60 verschiedene Ester gebildet werden (Lilly *et al.*, 2006a). Hohe Esterkonzentrationen können jedoch einen unangenehmen Geschmack im Bier verursachen (Kunze, 2004).

Durch die Erhöhung der Aktivität des Gens *BAT2* konnte eine Steigerung der Isoamylacetatproduktion erzielt werden (Yoshimoto *et al.*, 2002a). Auch bei eigenen Messungen von Isoamylacetat konnte festgehalten werden, dass dieses nach der Überexpression von *BAT2* im Verhältnis zum Wildtyp anstieg. Dagegen wurde bei der Überexpression der *BAT1*-Gene der gegenteilige Effekt festgestellt. Diese Beobachtungen bestätigen abermals, dass gesteigerte Enzymkonzentrationen in Folge einer erhöhten *BAT2*-Aktivität die Bildung der jeweiligen  $\alpha$ -Ketosäure fördern, sodass zunächst mehr Alkohol und anschließend mehr Ester resultieren. Das zusätzliche Einbringen von *BAT1* in Hefe bewirkt den gegenteiligen Effekt und lässt daher die Aussage zu, dass diese Transaminase die Synthese in Richtung des Valins katalysiert (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Valinbiosynthese von Hefen. Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhefestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von 8% bzw. 6% geerntet (Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Signifikant differentiell exprimierte Gene wurden farbig unterlegt. Erläuterungen der Gene siehe Abbildung 2.

Fermentationen mit den zehn verwendeten, genetisch veränderten Brauhefestämmen LSA-LSe, LSA-LSE. Stammmamen siehe Tabelle 11. Dargestellt sind die Effekte der genetischen Veränderungen auf die Alkohol- (Isobutanol, Isoamylalkohol) und Esterbildung (Isoamylacetat) (gemessen nach 4 Wochen Lagerung bei 0 °C) bei folgenden Stämmen: LSb, LSc, LSd und LSe. Die farbig markierten bzw. gepunkteten oder offenen Pfeile geben die Wirkrichtung im Stoffwechselweg bzw. die Auswirkungen des entsprechenden Genprodukts auf die Bildung der erwähnten Alkohole/des Esters und die  $\alpha$ -Ketosäure des Valinstoffwechsels an.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass Transkriptomanalysen Korrelationen zwischen den Genotypen und Phänotypen erlauben und tatsächlich gute Ergebnisse bei der Auffindung differentiell exprimierter Gene liefern können. Am Beispiel der Kandidatengene *BAT1* und *ILV6*, die im direkten Zusammenhang mit der Diacetylproduktion stehen, konnte dies bestätigt werden. Durch deren Veränderung in Hefe konnte die Diacetylproduktion positiv beeinflusst werden. Um weitere fundierte Kenntnisse des Hefestoffwechsels, besonders aber im Hinblick auf die Valinbiosynthese zu erhalten, sollte die Ebene des Transkriptoms noch für weitere, relevante Gärzeitpunkte (z.B. Es = 4%, stationäre Phase) betrachtet werden. Außerdem sollten weiterführende Arbeiten bezüglich der Veränderung der Aktivität von den genannten Genen angesetzt werden. Beispielsweise könnten die *BAT*-Gene des jeweiligen Hefegenoms ebenfalls deletiert und anschließend mit den hier erstellten Plasmiden kombiniert werden, um die Effekte auf phänotypische Merkmale der Hefe zu

messen. Eine Kombination der  $\Delta ilv6$ -Mutante mit der jeweiligen Deletion  $\Delta bat1$  bzw.  $\Delta bat2$  ist ebenfalls denkbar. Auch hier müssten im Anschluss Fermentationen folgen, die Nebenproduktanalysen beinhalten, um die Qualität der Biere besonders im Hinblick auf geschmacksbeeinflussende Bierkomponenten zu überprüfen. Außerdem wäre es sinnvoll, Testreihen für genannte Nebenprodukte während brauereirelevanter Fermentationen auch nach Zugabe verschiedener Aminosäuren wie z.B. Valin und Leucin aufzunehmen, um die aufgestellten Thesen für Brauereimaßstäbe zu bekräftigen und noch tiefere Einblicke in den Hefemetabolismus zu erhalten.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung von Brauhefen mit Hilfe des *Inverse Metabolic Engineering*. Im Vordergrund stand die Frage, ob physiologische Differenzen von verschiedenen Brauhefen mit dem Expressionslevel der am jeweiligen Stoffwechsel beteiligten Gene korreliert werden können. Weiterhin sollte geklärt werden, ob das gewonnene Wissen auf einen Brauhestamm übertragen werden kann. Das *proof of concept* sollte am Beispiel der Diacetylproduktion erbracht werden, da die Senkung des Diacetylgehalts im Jungbier von großem Interesse ist.

Zunächst wurden verschiedene Brauhestämme auf ihre brauereirelevanten Merkmale untersucht. Nach Aufzeigen der entsprechenden genetischen Basis der jeweiligen Hefen konnten Kandidatengene identifiziert werden, die anschließend den Ausgangspunkt für genetische Veränderungen bezüglich der Diacetylreduktion darstellten. Diese Gene waren *ILV3*, *ILV6*, *BAT1* und *BAT2* des Valinstoffwechsels. Nachdem die beiden letztgenannten Gene zusätzlich in eine brauereirelevante Hefe und die  $\Delta\Delta ilv6$ -Mutante, der bereits die *ILV6*-Gene fehlten, eingebracht wurden, folgten wiederum Nebenproduktanalysen, um eventuelle, messbare Konzentrationsunterschiede bezüglich des Diacetyls festzustellen. Durch die Modifizierungen konnte die Diacetylproduktion um 14% (Überexpression des *BAT1* in einer brauereirelevanten Hefe) bzw. um ca. 40% (Überexpression des *BAT1* in der  $\Delta\Delta ilv6$ -Mutante) am Ende der Fermentation im Vergleich zum Wildtyp reduziert werden. Dabei wurden aber keine Unterschiede im Gärverhalten bezüglich des Wachstums, der Fermentationsdauer oder anderer Nebenprodukte festgestellt, die ebenfalls zum Geschmack des Bieres beitragen. Diese Senkung des im Bier am meisten störenden Nebenprodukts macht es damit Brauereien möglich, ihre eigenen Produktionsstämme mit positiven Eigenschaften anderer Stämme „nachzurüsten“. Der große praktische Nutzen liegt darin, dass der zeitliche Aufwand, um das Diacetyl in Nachgärungen abzubauen, nun wegfällt. Die gewonnene Kenntnis von Genen, deren Aktivität mit der erwünschten Gäreigenschaft korreliert, erlaubt es außerdem, im Rahmen der klassischen Stammoptimierung aufwändige Versuchsgärungen durch ein einfaches Screening der Kandidatengene zu ersetzen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aebersold, R. und Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422, 198-207.
- Akada, R. (2002) Genetically modified industrial yeast ready for application. *J Biosci Bioeng*, 94, 536-544.
- Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R. und Dopazo, J. (2004) FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*, 20, 578-580.
- Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R. und Dopazo, J. (2005a) Discovering molecular functions significantly related to phenotypes by combining gene expression data and biological information. *Bioinformatics*, 21, 2988-2993.
- Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Vaquerizas, J. M., Conde, L. und Dopazo, J. (2005b) BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucl. Acids Res.*, 33, W460-464.
- Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Tarraga, J., Montaner, D., Alloza, E., Vaquerizas, J. M., Conde, L., Blaschke, C., Vera, J. und Dopazo, J. (2006) BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Res*, 34, W472-476.
- Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Tarraga, J., Medina, I., Alloza, E., Montaner, D. und Dopazo, J. (2007) FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucl. Acids Res.*, 35, W91-96.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. und Sherlock, G. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25, 25-29.
- Azumi, M. und Goto-Yamamoto, N. (2001) AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast*, 18, 1145-1154.
- Bailey, J. E., Birnbaum, S., Galazzo, J. L., Khosla, C. und Shanks, J. V. (1990) Strategies and Challenges in Metabolic Engineering a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 589, 1-15.
- Bailey, J. E., Sburlati, A., Hatzimanikatis, V., Lee, K., Renner, W. A. und Tsai, P. S. (2002) Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. *Biotechnol Bioeng*, 79, 568-579.
- Benjamini, Y. und Yekutieli, D. (2005) Quantitative trait Loci analysis using the false discovery rate. *Genetics*, 171, 783-790.
- Beranova-Giorgianni, S. (2003) Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strenghts and limitations. *Trends in Analytical Chemistry* 22, 273-281.
- Blieck, L., Toye, G., Dumortier, F., Verstrepen, K. J., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M. und Van Dijck, P. (2007) Isolation and Characterization of Brewer's Yeast Variants with Improved Fermentation Performance under High-Gravity Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 815-824.
- Bond, U., Neal, C., Donnelly, D. und James, T. (2004) Aneuploidy and copy number breakpoints in the genome of lager yeasts mapped by microarray hybridisation. *Current Genetics*, 45, 360-370.
- Boucherie, H., Dujardin, G., Kermorgant, M., Monribot, C., Slonimski, P. und Perrot, M. (1995) Two-dimensional protein map of *Saccharomyces cerevisiae*: construction of a gene-protein index. *Yeast*, 11, 601-613.

- Bracher, F. (2003) Wirkstoffe und Wirkprinzipien: Angriffspunkt Ergosterolbiosynthese. *Pharmazie in unserer Zeit*, 32, 118-123.
- Brejning, J., Arneborg, N. und Jespersen, L. (2005) Identification of genes and proteins induced during the lag and early exponential phase of lager brewing yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 261-271.
- Bro, C. und Nielsen, J. (2004) Impact of 'ome' analyses on inverse metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 6, 204-211.
- Bro, C., Knudsen, S., Regenber, B., Olsson, L. und Nielsen, J. (2005) Improvement of Galactose Uptake in *Saccharomyces cerevisiae* through Overexpression of Phosphoglucomutase: Example of Transcript Analysis as a Tool in *Inverse Metabolic Engineering*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 6465-6472.
- Casaregola, S., Nguyen, H. V., Lapathitis, G., Kotyk, A. und Gaillardin, C. (2001) Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 1607-1618.
- Cordier, H., Mendes, F., Vasconcelos, I. und François, J. M. (2007) A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. *Metabolic Engineering*, 9, 364-378.
- Daran-Lapujade, P., Daran, J.-M., Kötter, K., Petit, T., Piper, M. D. W. und Pronk, J. T. (2003) Comparative genotyping of the *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains S288C and CEN.PK113-7D using oligonucleotide microarrays. *FEMS Yeast Research*, 4, 259-269.
- de Barros Lopes, M., Bellon, J. R., Shirley, N. J. und Ganter, P. F. (2002) Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Research*, 1, 323-331.
- de Nobel, H., Lawrie, L., Brul, S., Klis, F., Davis, M., Alloush, H. und Coote, P. (2001) Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 18, 1413-1428.
- Dequin, S. (2001) The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 577-588.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. und Brown, P. O. (1997) Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science*, 278, 680-686.
- Dickinson, J. R. und Norte, V. (1993) A study of branched-chain amino acid aminotransferase and isolation of mutations affecting the catabolism of branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 326, 29-32.
- Dickinson, J. R., Harrison, S. J., Dickinson, J. A. und Hewlins, M. J. E. (2000) An Investigation of the Metabolism of Isoleucine to Active Amyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 275, 10937-10942.
- Dietvorst, J., Londesborough, J. und Steensma, H. Y. (2005) Maltotriose utilization in lager yeast strains: MTT1 encodes a maltotriose transporter. *Yeast*, 22, 775-788.
- Donalies, U., Nguyen, H., Stahl, U. und Nevoigt, E. (2008) Improvement of *Saccharomyces* Yeast Strains Used in Brewing, Wine Making and Baking. In *Food Biotechnology*, pp. 67-98.
- Doniger, S., Salomonis, N., Dahlquist, K., Vranizan, K., Lawlor, S. und Conklin, B. (2003) MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data. *Genome Biology*, 4, R7.
- dos Santos, M. M., Gombert, A. K., Christensen, B., Olsson, L. und Nielsen, J. (2003) Identification of In Vivo Enzyme Activities in the Cometabolism of Glucose and Acetate by *Saccharomyces cerevisiae* by Using <sup>13</sup>C-Labeled Substrates. *Eukaryotic Cell*, 2, 599-608.
- Dunn, B. und Sherlock, G. (2008) Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Research*, 18, 1610-1623.

- Duong, C. T. (2009) Improving brewers' yeast by means of *inverse metabolic engineering*. . PhD Thesis
- Eden, A., Simchen, G. und Benvenisty, N. (1996) Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *J Biol Chem*, 271, 20242-20245.
- Eden, A., Van Nederveelde, L., Drukker, M., Benvenisty, N. und Debourg, A. (2001) Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55, 296-300.
- Ehsani, M. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced ethanol yield: control of acetoin formation in glycerol overproducing wine yeast strains. . Dissertation
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. und Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14863-14868.
- Förster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B. O. und Nielsen, J. (2003) Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metaboloc network. *Genome Research* 13, 244-253.
- Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y. und Hamachi, M. (1994) Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2786-2792.
- Fukuda, K., Yamamoto, N., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y. und Kimura, A. (1998) Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Appl Environ Microbiol*, 64, 4076-4078.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. und Brown, P. O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, 11, 4241-4257.
- Gentechnikgesetz (1990. Letzte Änderung vom 01.04.2008) Gesetz zur Regelung der Gentechnik. .
- Gevaert, K. und Vandekerckhove, J. (2009) Reverse-Phase Diagonal Chromatography for Phosphoproteome Research. In *Phospho-Proteomics*, pp. 219-227.
- Gill, R. T. (2003) Enabling inverse metabolic engineering through genomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 484-490.
- Gjermansen, C., Nilsson-Tillgren, T., Petersen, J. G., Kielland-Brandt, M. C., Sigsgaard, P. und Holmberg, S. (1988) Towards diacetyl-less brewers' yeast. Influence of *ilv2* and *ilv5* mutations. *Journal of Basic Microbiology*, 28, 175-183.
- Goelling, D. und Stahl, U. (1988) Cloning and expression of an acetolactatdecarboxylase gene from *Streptococcus lactis* supsp. *diacetylactis* in *Escherichia coli*. *Appl. & Environm. Microbiol.*, 54, 1889-1891.
- Gombert, A. K., Moreira dos Santos, M., Christensen, B. und Nielsen, J. (2001) Network Identification and Flux Quantification in the Central Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under Different Conditions of Glucose Repression. *J. Bacteriol.*, 183, 1441-1451.
- Gonzalez, S. S., Barrio, E. und Querol, A. (2008) Molecular Characterization of New Natural Hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in Brewing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 2314-2320.
- Gorsich, S., Dien, B., Nichols, N., Slininger, P., Liu, Z. und Skory, C. (2006) Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 339-349.
- Graves, P. R. und Haystead, T. A. J. (2002) *Molecular Biologist's Guide to Proteomics*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 39-63.

- Griffin, J. L. (2006) Review. The Cinderella story of metabolic profiling: does metabolomics get to go to the functional genomics ball? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361, 147-161.
- Griffin, T. J., Gygi, S. P., Ideker, T., Rist, B., Eng, J., Hood, L. und Aebersold, R. (2002) Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*, 1, 323-333.
- Gueldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. und Hegemann, J. H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl. Acids Res.*, 24, 2519-2524.
- Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y. und Aebersold, R. (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 9390-9395.
- Hammond, J. R. M. (1995) Genetically-modified Brewing Yeasts for the 21st Century. *Progress to Date. YEAST*, 1, 1613-1627.
- Hansen, J. und Kielland-Brandt, M. C. (1996) Inactivation of MET10 in brewer's yeast specifically increases SO<sub>2</sub> formation during beer production. *Nat Biotech*, 14, 1587-1591.
- Haynes, P. A. und Yates, J. R. I. (2000) Proteome profiling - pitfalls and progress. *Yeast*, 17, 81-87.
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J., Pronk, J. T. und Dickinson, J. R. (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol*, 74, 2259-2266.
- Heidlas, J. und Tressl, R. (1990) Purification and characterization of a (R)-2,3-butanediol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.*, 154, 267-273.
- Herrero, J., Vaquerizas, J. M., Al-Shahrour, F., Conde, L., Mateos, A., Diaz-Uriarte, J. S. und Dopazo, J. (2004) New challenges in gene expression data analysis and the extended GEPAS. *Nucleic Acids Res*, 32, W485-491.
- Higgins, V. J., Beckhouse, A. G., Oliver, A. D., Rogers, P. J. und Dawes, I. W. (2003a) Yeast Genome-Wide Expression Analysis Identifies a Strong Ergosterol and Oxidative Stress Response during the Initial Stages of an Industrial Lager Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4777-4787.
- Higgins, V. J., Rogers, P. J. und Dawes, I. W. (2003b) Application of Genome-Wide Expression Analysis To Identify Molecular Markers Useful in Monitoring Industrial Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 7535-7540.
- James, T. C., Campbell, S., Donnelly, D. und Bond, U. (2003) Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 432-448.
- Jansen, R. und Gerstein, M. (2000) Analysis of the yeast transcriptome with structural and functional categories: characterizing highly expressed proteins. *Nucl. Acids Res.*, 28, 1481-1488.
- Jin, Y.-S., Alper, H., Yang, Y.-T. und Stephanopoulos, G. (2005) Improvement of Xylose Uptake and Ethanol Production in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through an Inverse Metabolic Engineering Approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8249-8256.
- Joubert, R., Brignon, P., Lehmann, C., Monribot, C., Gendre, F. und Boucherie, H. (2000) Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts. *Yeast*, 16, 511-522.
- Joubert, R., Strub, J.-M., Zugmeyer, S., Kobi, D., Carte, N., Van Dorsselaer, A., Boucherie, H. und Jaquet-Gutfreund, L. (2001) Identification by mass spectrometry of two-dimensional gel electrophoresis-separated proteins extracted from lager brewing yeast. *ELECTROPHORESIS*, 22, 2969-2982.

- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y. und Hattori, M. (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res*, 32, D277-280.
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B. und Lander, E. S. (2003) Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, 423, 241-254.
- Khatri, P. und Draghici, S. (2005) Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics*, 21, 3587-3595.
- King, O. D., Foulger, R. E., Dwight, S. S., White, J. V. und Roth, F. P. (2003) Predicting Gene Function From Patterns of Annotation. *Genome Research*, 13, 896-904.
- Kispal, G., Steiner, H., Court, D. A., Rolinski, B. und Lill, R. (1996) Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. *J Biol Chem*, 271, 24458 - 24464.
- Kobi, D., Zugmeyer, S., Potier, S. und Jaquet-Gutfreund, L. (2004) Two-dimensional protein map of an "ale"-brewing yeast strain: proteome dynamics during fermentation. *FEMS Yeast Research*, 5, 213-230.
- Kodama, Y., Fukui, N., Ashikari, T. und Shibano, Y. (1995) Improvement of maltose fermentation efficiency: Constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 53, 24-29.
- Kodama, Y., Omura, F. und Ashikari, T. (2001) Isolation and characterization of a gene specific to lager brewing yeast that encodes a branched-chain amino acid permease. *Appl Environ Microbiol*, 67, 3455-3462.
- Kodama, Y., Kielland-Brandt, M. und Hansen, J. (2006) Lager brewing yeast. In *Comparative Genomics*, pp. 145-164.
- Koffas, M., Roberge, C., Lee, K. und Stephanopoulos, G. (1999) Metabolic Engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1, 535-557.
- Kolkman, A., Slijper, M. und Heck, A. J. (2005) Development and application of proteomics technologies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biotechnol.* , 23, 598-604.
- Kristan, G. (2009) Stammoptimierung von Brauhefestämmen am Beispiel der Bildung von Sulfit und geschmacksaktiver Ester. Dissertation.
- Kunze, W. (2004) Technology Brewing and Malting. , VLB Berlin
- Lafaye, A., Junot, C., Pereira, Y., Lagniel, G., Tabet, J.-C., Ezan, E. und Labarre, J. (2005) Combined Proteome and Metabolite-profiling Analyses Reveal Surprising Insights into Yeast Sulfur Metabolism. *J. Biol. Chem.*, 280, 24723-24730.
- Lashkari, D. A., DeRisi, J. L., McCusker, J. H., Namath, A. F., Gentile, C., Hwang, S. Y., Brown, P. O. und Davis, R. W. (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 13057-13062.
- Lilly, M., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., Swiegers, J. H., Cozzolino, D. und Pretorius, I. S. (2006a) The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, 23, 641-659.
- Lilly, M., Bauer, F. F., Styger, G., Lambrechts, M. G. und Pretorius, I. S. (2006b) The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Research*, 6, 726-743.
- Liti, G., Carter, D. M., Moses, A. M., Warringer, J., Parts, L., James, S. A., Davey, R. P., Roberts, I. N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I. J., Bergman, C. M., Bensasson, D., O'Kelly, M. J. T., van Oudenaarden, A., Barton, D. B. H., Bailes, E., Nguyen, A. N., Jones, M., Quail, M. A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R. und Louis, E. J. (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*.

- Liu, Z., Zhang, G. und Liu, S. (2004) Constructing an amylolytic brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* suitable for accelerated brewing. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98, 414-419.
- Marti, J., Piquemal, D., Manchon, L. und Combes, T. (2002) Transcriptomes for serial analysis of gene expression. *J Soc Biol.*, 196, 303-307.
- Meudt, H. M. und Clarke, A. C. (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.*, 12, 106-117.
- Mifflin, B. J. (1971) Cooperative feedback control of barley acetohydroxyacid synthetase by leucine, isoleucine, and valine. *Arch Biochem Biophys*, 146, 542-550.
- Mithieux, S. M. und Weiss, A. S. (1995) Tandem integration of multiple ILV5 copies and elevated transcription in polyploid yeast. *Yeast*, 11, 311-316.
- Naumova, E. S., Naumov, G. I., Masneuf-Pomarède, I., Aigle, M. und Dubourdiou, D. (2005) Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast*, 22, 1099-1115.
- Nevoigt, E., Pilger, R., Mast-Gerlach, E., Schmidt, U., Freihammer, S., Eschenbrenner, M., Garbe, L. und Stahl, U. (2002) Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEMS Yeast Res*, 2, 225-232.
- Nevoigt, E. (2008) Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72, 379-412.
- Nie, L., Wu, G. und Zhang, W. (2008) Statistical Application and Challenges in Global Gel-Free Proteomic Analysis by Mass Spectrometry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28, 297 - 307.
- Nielsen, J. (2001) Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55, 263-283.
- Olesen, K., Felding, T., Gjermansen, C. und Hansen, J. (2002) The dynamics of the *Saccharomyces carlsbergensis* brewing yeast transcriptome during a production-scale lager beer fermentation. *FEMS Yeast Research*, 2, 563-573.
- Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B. und Baganz, F. (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.*, 16, 373-378.
- Oliver, S. G. (2002) Functional genomics: lessons from yeast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357, 17-23.
- Olsson, L. und Nielsen, J. (2000) The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. *Enzyme Microb Technol*, 26, 785-792.
- Onnela, M.-L., Suihko, M.-L., Penttilä, M. und Keränen, S. (1996) Use of a modified alcohol dehydrogenase, ADH1, promoter in construction of diacetyl non-producing brewer's yeast. *Journal of Biotechnology*, 49, 101-109.
- Ostergaard, S., Olsson, L. und Nielsen, J. (2000) Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 34-50.
- Pandey, A. und Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405, 837-846.
- Pang, S. S. und Duggleby, R. G. (1999) Expression, Purification, Characterization, and Reconstitution of the Large and Small Subunits of Yeast Acetohydroxyacid Synthase. *Biochemistry*, 38, 5222-5231.
- Pang, S. S. und Duggleby, R. G. (2001) Regulation of yeast acetohydroxyacid synthase by valine and ATP. *Biochem J*, 357, 749-757.
- Penttilä, M. (2001) Metabolic engineering approaches-opportunities for brewing. *Proc. 28th EBC Congress Budapest*
- Perrot, M., Sogliocco, F., Mini, T., Monribot, C., Schneider, U., Shevchenko, A., Mann, M., Jenö, P. und Boucherie, H. (1999) Two-dimensional gel protein database of *Saccharomyces cerevisiae* (update 1999). *Electrophoresis*, 20, 2280-2298.
- Perrot, M., Guieysse-Peugeot, A.-L., Massoni, A., Espagne, C., Claverol, S., Monteiro, R., Silva, S., Jenö, P., Santos, M., Bonneau, M. und Boucherie, H. (2007) Yeast proteome map (update 2006). *PROTEOMICS*, 7, 1117-1120.

- Petersen, E. E., Mensour, N. A., Margaritis, A., Stewart, R. J. und Pilkington, P. H. (2004) The effects of wort valine concentration on the total diacetyl profile and levels late in batch fermentations with brewing yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 62, 131-139.
- Petersson, A., Almeida, J. R. M., Modig, T., Karhumaa, K., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M. F. und Lidén, G. (2006) A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast*, 23, 455-464.
- Pfaffl, M. W. (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1, 92-95.
- Pham, T. K. und Wright, P. C. (2007) Proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Expert Review of Proteomics*, 4, 793-813.
- Pope, G. A., MacKenzie, D. A., Defernez, M., Aroso, M. A. M. M., Fuller, L. J., Mellon, F. A., Dunn, W. B., Brown, M., Goodacre, R., Kell, D. B., Marvin, M. E., Louis, E. J. und Roberts, I. N. (2007) Metabolic footprinting as a tool for discriminating between brewing yeasts. *Yeast*, 24, 667-679.
- Pugh, T., Dunn, B., Venteicher, A., Metzner, S., Bower, P., Bondre, C., Seabrooks, J., Ryder, D., Botstein, D. und Brown, P. O. (2002) Global analysis of yeast gene expression during a brewery fermentation. ASBC 2002 Annual Meeting, Savannah, Georgia
- Rainieri, S., Kodama, Y., Kaneko, Y., Mikata, K., Nakao, Y. und Ashikari, T. (2006) Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl Environ Microbiol*, 72, 3968-3974.
- Ray, S. S., Bandyopadhyay, S. und K., P. S. (2007) Gene ordering in partitive clustering using microarray expressions. *J. Biosci.*, 32, 1019-1025.
- Reiner, A., Yekutieli, D. und Benjamini, Y. (2003) Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics*, 19, 368-375.
- Rogowska-Wrzesinska, A., Larsen, P. M., Blomberg, A., Görg, A., Roepstorff, P., Norbeck, J. und Fey, S. J. (2001) Comparison of the Proteomes of Three Yeast Wild Type Strains: CEN.PK2, FY1679 and W303. *Comp Funct Genomics*, 2, 207-225.
- Rossouw, D., Naes, T. und Bauer, F. (2008) Linking gene regulation and the exometabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics*, 9, 530.
- Sauer, U. und Schlattner, U. (2004) Inverse metabolic engineering with phosphagen kinase systems improves the cellular energy state. *Metabolic Engineering*, 6, 220-228.
- Schacherer, J., Shapiro, J. A., Ruderfer, D. M. und Kruglyak, L. (2009) Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. und Brown, P. O. (1995) Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*, 270, 467-470.
- Schoondermark-Stolk, S. A., Tabernero, M., Chapman, J., Schure, E. G., Verrips, C. T., Verkleij, A. J. und Boonstra, J. (2005) Bat2p is essential in *Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol. *FEMS Yeast Research*, 5, 757-766.
- Schoondermark-Stolk, S. A., Jansen, M., Verkleij, A., Verrips, C., Euverink, G.-J., Dijkhuizen, L. und Boonstra, J. (2006) Genome-wide transcription survey on

- flavour production in *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22, 1347-1356.
- Shakoury-Elizeh, M., Tiedeman, J., Rashford, J., Ferea, T., Demeter, J., Garcia, E., Rolfes, R., Brown, P. O., Botstein, D. und Philpott, C. C. (2004) Transcriptional Remodeling in Response to Iron Deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell, 15, 1233-1243.
- Shalon, D., Smith, S. J. und Brown, P. O. (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. Genome Research, 6, 639-645.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 13207-13212.
- Skoneczna, A. (2006) Decade of genomics-methods for genome investigation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Postepy Biochem., 52, 435-447.
- Smedsgaard, J. und Nielsen, J. (2005) Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. J. Exp. Bot., 56, 273-286.
- Steensma, H. Y. und ter Linde, J. J. M. (2001) Plasmids with the Cre-recombinase and the dominant *nat* marker, suitable for use in prototrophic strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* Yeast 18, 469-472.
- Stephanopoulos, G. (1999) Metabolic fluxes and metabolic engineering. Metab Eng., 1, 1-11.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S. und Mesirov, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 15545-15550.
- Tamai, Y., Momma, T., Yoshimoto, H. und Kaneko, Y. (1998) Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. Yeast, 14, 923-933.
- Tang, T., Francois, N., Glatigny, A., Agier, N., Mucchielli, M.-H., Aggerbeck, L. und Delacroix, H. (2007) Expression ratio evaluation in two-colour microarray experiments is significantly improved by correcting image misalignment. Bioinformatics, 23, 2686-2691.
- ter Linde, J. J. M., Liang, H., Davis, R. W., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P. und Pronk, J. T. (1999) Genome-Wide Transcriptional Analysis of Aerobic and Anaerobic Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol., 181, 7409-7413.
- van Damme, P., Impens, F., Vandekerckhove, J. und Gevaert, K. (2008) Protein Processing Characterized by a Gel-Free Proteomics Approach. In Functional Proteomics, pp. 245-262.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G. und Verachtert, H. (2003) Bioflavoring and beer refermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 62, 140-150.
- Vaquerizas, J. M., Conde, L., Yankilevich, P., Cabezon, A., Minguez, P., Diaz-Uriarte, R., Al-Shahrour, F., Herrero, J. und Dopazo, J. (2005) GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data. Nucleic Acids Res, 33, W616-620.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M. A., Bassett, D. E. J., Hieter, P., Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1997) Characterization of the yeast transcriptome. Cell., 88, 243-251.

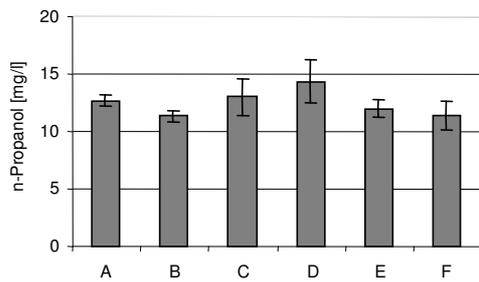
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. v. d., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. und Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, 23, 4407-4414.
- Watanabe, T., Murata, Y., Oka, S. und Iwahashi, H. (2004) A new approach to species determination for yeast strains: DNA microarray-based comparative genomic hybridization using a yeast DNA microarray with 6000 genes. *Yeast*, 21, 351-365.
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L. und Hochstrasser, D. F. (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 14, 61-65.
- Winzler, E. A., Lee, B., McCusker, J. H. und Davis, R. W. (1999) Whole genome genetic-typing in yeast using high-density oligonucleotide arrays. *Parasitology*, 118, 73-80.
- Wu, J., Zhang, N., Hayes, A., Panoutsopoulou, K. und Oliver, S. G. (2004) Global analysis of nutrient control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during growth and starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 3148-3153.
- Yale, J. und Bohnert, H. J. (2001) Transcript Expression in *Saccharomyces cerevisiae* at High Salinity. *J. Biol. Chem.*, 276, 15996-16007.
- Yamagishi, H. und Ogata, T. (1999) Chromosomal structures of bottom fermenting yeasts. *Syst Appl Microbiol.*, 22, 341-353.
- Yamano, S., Kondo, K., Tanaka, J. und Inoue, T. (1994a) Construction of a brewer's yeast having [alpha]-acetolactate decarboxylase gene from *Acetobacter aceti* ssp. *xylum* integrated in the genome. *Journal of Biotechnology*, 32, 173-178.
- Yamano, S., Tanaka, J. und Inoue, T. (1994b) Cloning and expression of the gene encoding [alpha]-acetolactate decarboxylase from *Acetobacter aceti* ssp. *xylum* in brewer's yeast. *Journal of Biotechnology*, 32, 165-171.
- Yamano, S., Tomizuka, K., Tanaka, J. und Inoue, T. (1994c) High level expression of alpha -acetolactate decarboxylase gene from *Acetobacter aceti* subsp. *xylum* in brewing. *Journal of Biotechnology*, 37, 45-48.
- Yamano, S., Tomizuka, K., Sone, H., Imura, M., Takeuchi, t., Tanaka, J. und Inoue, T. (1995) Brewing performance of a brewer's yeast having [alpha]-acetolactate decarboxylase from *Acetobacter aceti* subsp. *xylum*. *Journal of Biotechnology*, 39, 21-26.
- Yoshida, S., Hashimoto, K., Shimada, E., Ishiguro, T., Minato, T., Mizutani, S., Yoshimoto, H., Tashiro, K., Kuhara, S. und Kobayashi, O. (2007) Identification of bottom-fermenting yeast genes expressed during lager beer fermentation. *Yeast*, 24, 599-606.
- Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oouchi, R., Sugihara, M., Imai, T., Ishiguro, T., Mizutani, S., Tomita, M., Soga, T. und Yoshimoto, H. (2008) Development of Bottom-Fermenting *Saccharomyces* Strains That Produce High SO<sub>2</sub> Levels, Using Integrated Metabolome and Transcriptome Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 2787-2796.
- Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T. und Sone, H. (2002a) Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, 501-508.
- Yoshimoto, H., Saltsman, K., Gasch, A. P., Li, H. X., Ogawa, N., Botstein, D., Brown, P. O. und Cyert, M. S. (2002b) Genome-wide Analysis of Gene Expression Regulated by the Calcineurin/Crz1p Signaling Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277, 31079-31088.

- Zhang, J. N., He, X., Gouo, X. N., Liu, N. und Zhang, B. R. (2005) [Genetically modified industrial brewing yeast with high-glutathione and low-diacetyl production]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 21, 942-946.
- Zhang, Y., Wang, Z.-Y., He, X.-P., Liu, N. und Zhang, B.-R. (2008) New industrial brewing yeast strains with ILV2 disruption and LSD1 expression. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 18-24.

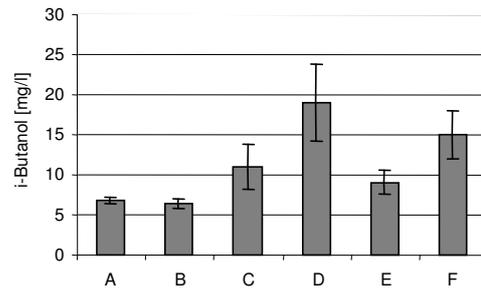
## 7. Anhang

**Abb. a-Abb. m:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhestämmen (A-F) mit gehopfter Bierwürze ( $T = 11\text{ °C}$ , Stammwürze: 11,5%) in 30 l-zylindronischen Tanks (ZKT). Gezeigt sind die Gehalte an jeweiligem Nebenprodukt (Höherer Alkohol, Ester, niedere Fettsäure) der sechs verwendeten Brauhestämme im gelagerten Bier (2 Wochen bei  $0\text{ °C}$ ). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Fermentationen. Die Gärbedingungen entsprachen denen in der Legende von Abbildung 3.

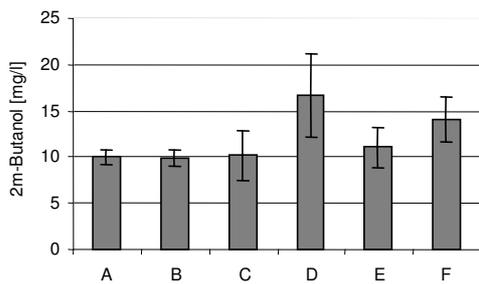
### Höhere Alkohole:



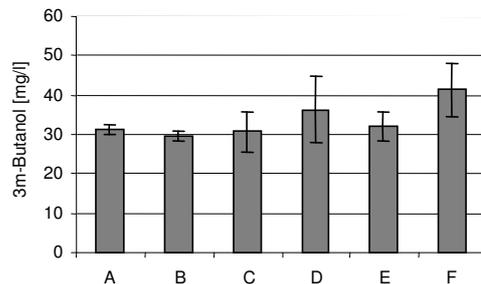
**Abb. a:** Gehalt an n-Propanol.



**Abb. b:** Gehalt an i-Butanol.

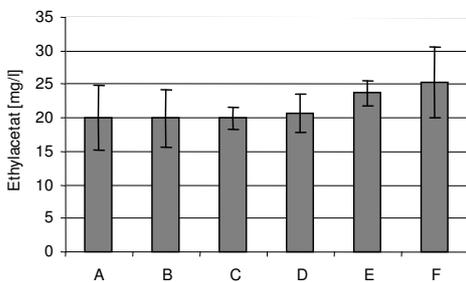


**Abb. c:** Gehalt an 2m-Butanol.

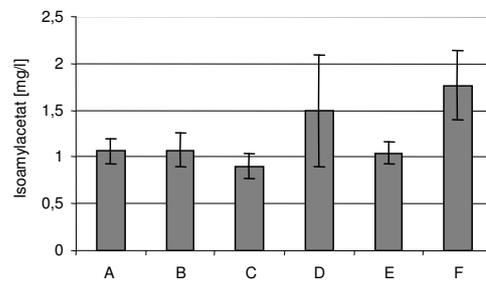


**Abb. d:** Gehalt an 3m-Butanol.

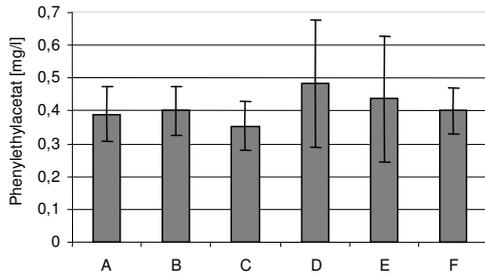
### Ester:



**Abb. e:** Gehalt an Ethylacetat.

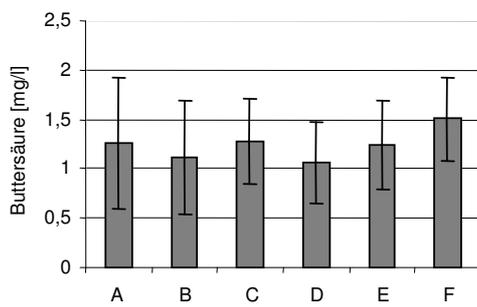


**Abb. f:** Gehalt an Isoamylacetat.

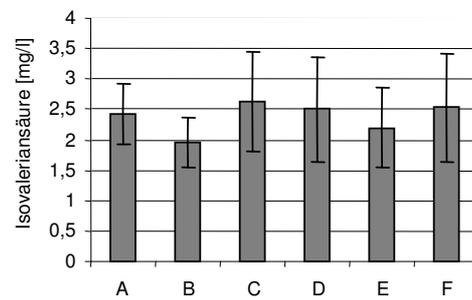


**Abb. g:** Gehalt an Phenylethylacetat.

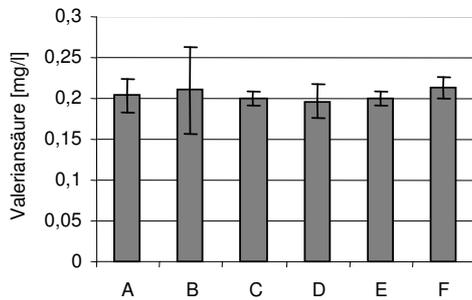
**Niedere Fettsäuren:**



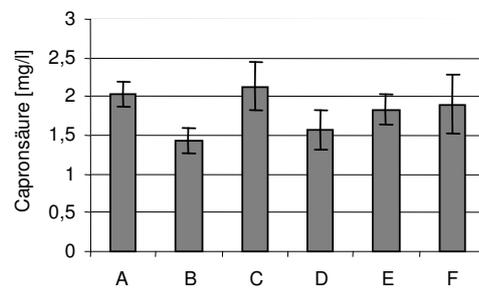
**Abb. h:** Gehalt an Buttersäure.



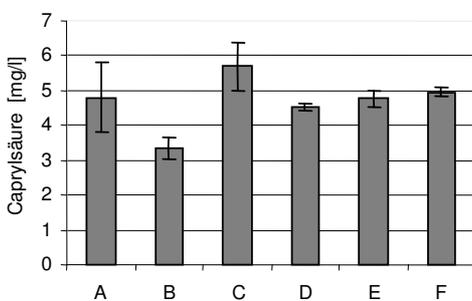
**Abb. i:** Gehalt an Isovaleriansäure.



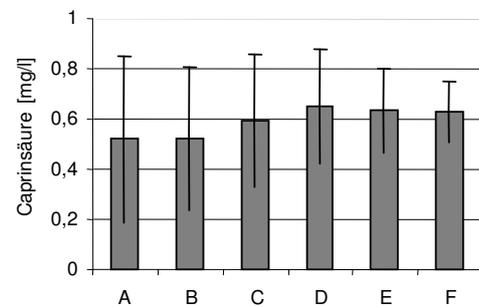
**Abb. j:** Gehalt an Valeriansäure.



**Abb. k:** Gehalt an Capronsäure.



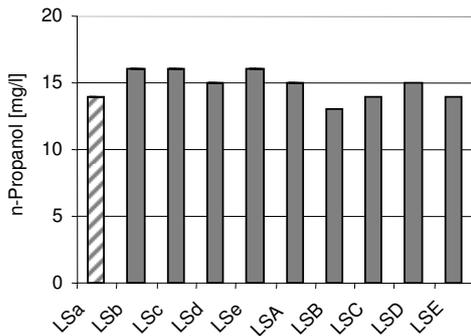
**Abb. l:** Gehalt an Caprylsäure.



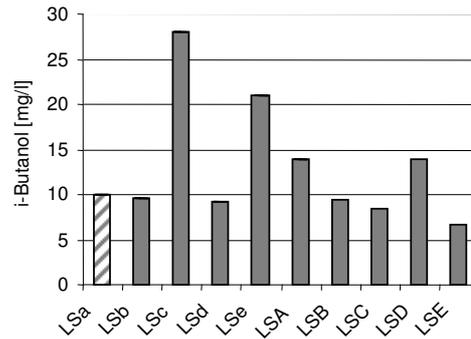
**Abb. m:** Gehalt an Caprinsäure.

**Abb. n-Abb. z:** Fermentationen mit den zehn verwendeten, genetisch veränderten Brauefestämmen LSA-LSE, LSA-LSE. Stammnamen siehe Tabelle 11. Der Wildtyp ist schraffiert dargestellt. Gezeigt sind die Gehalte an jeweiligem Nebenprodukt (Höherer Alkohol, Ester, niedere Fettsäure) im gelagerten Bier (4 Wochen bei 0 °C) während der Hauptgärung mit gehopfter Bierwürze (T = 11 °C, Stammwürze: 11,5%) in 30 I-ZKTs. Dargestellt sind die Werte aus einer Fermentation. Die Gärbedingungen entsprachen denen in der Legende von Abb. 23.

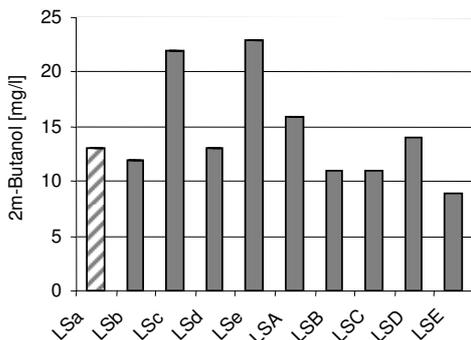
**Höhere Alkohole:**



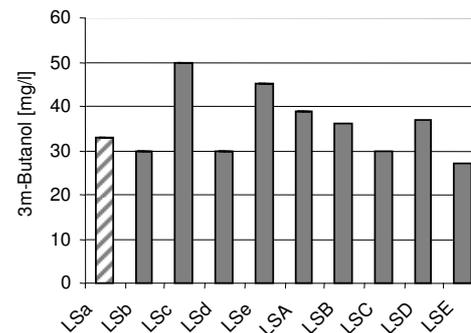
**Abb. n:** Gehalt an n-Propanol.



**Abb. o:** Gehalt an i-Butanol.

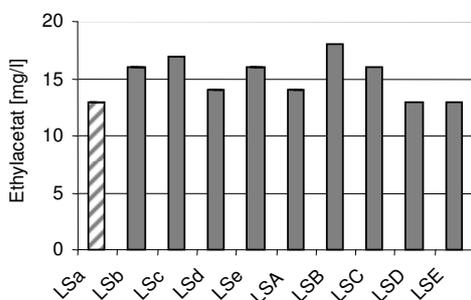


**Abb. p:** Gehalt an 2m-Butanol.

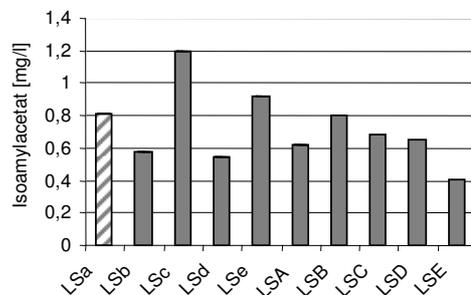


**Abb. q:** Gehalt an 3m-Butanol.

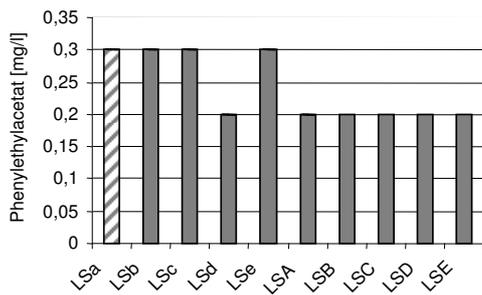
**Ester:**



**Abb. r:** Gehalt an Ethylacetat.

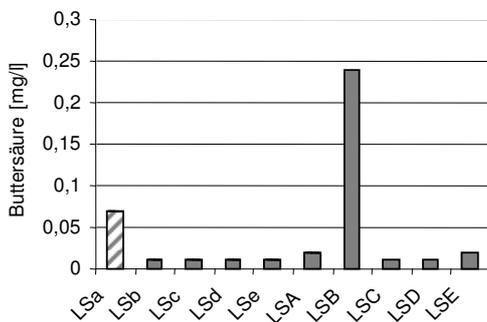


**Abb. s:** Gehalt an Isoamylacetat.

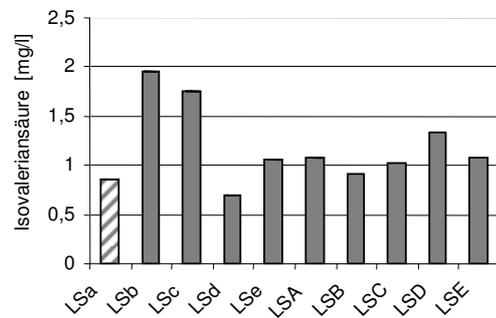


**Abb. t:** Gehalt an Phenylethylacetat.

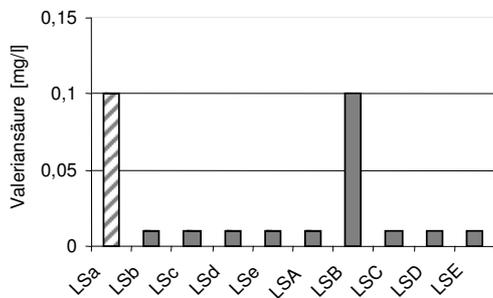
**Niedere Fettsäuren:**



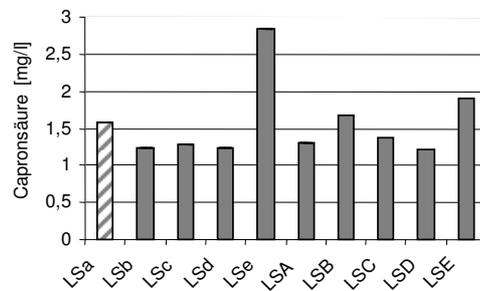
**Abb. u:** Gehalt an Buttersäure.



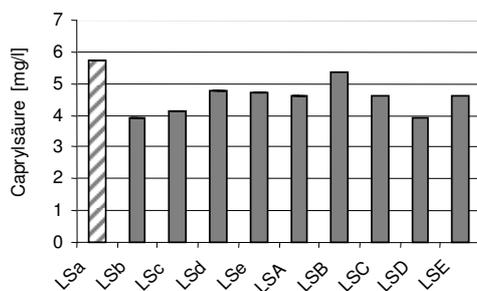
**Abb. v:** Gehalt an Isovaleriansäure.



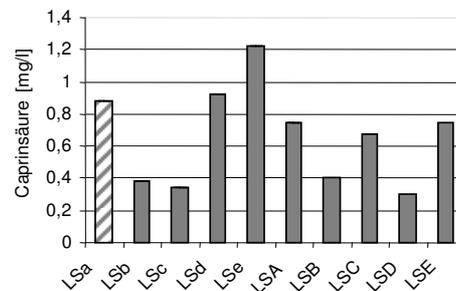
**Abb. w:** Gehalt an Valeriansäure.



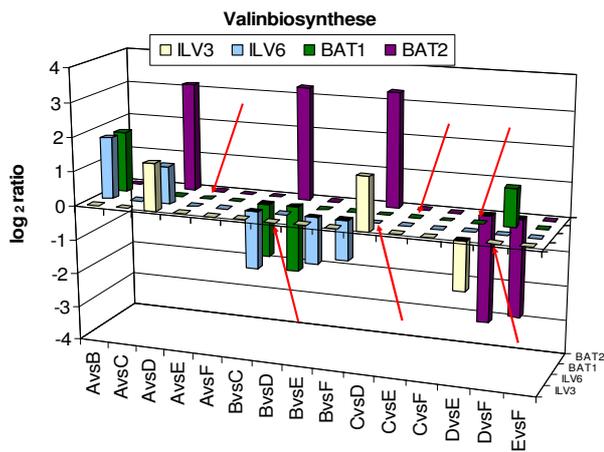
**Abb. x:** Gehalt an Capronsäure.



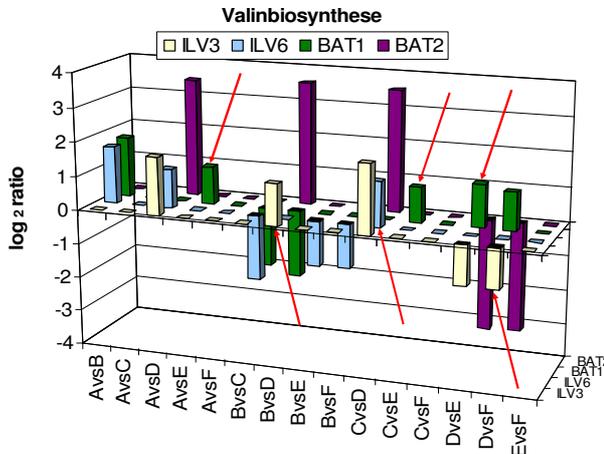
**Abb. y:** Gehalt an Caprylsäure.



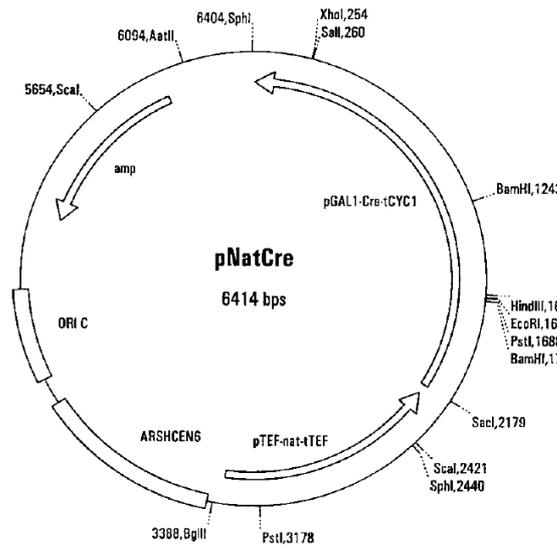
**Abb. z:** Gehalt an Caprinsäure.



**Abb. aa:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von **8%** geerntet (erreicht nach 2-3 Tagen während der Hauptgärung, Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Nach der ersten von zwei durchgeführten Transkriptomanalyse wurden signifikant differentiell exprimierte Gene des Valinstoffwechsels gefunden: *ILV3*, *ILV6*, *BAT1* und *BAT2*. Erläuterungen der Gene siehe Abbildung 2. Die Ergebnisse sind im paarweisen Stammvergleich dargestellt. Die eingezeichneten Pfeile signalisieren die zusätzlich bei Extrakt 6% als signifikant differentiell exprimiert gefundenen Gene.



**Abb. bb:** Fermentationen mit den sechs verwendeten untergärigen Brauhestämmen (A-F). Für die Transkriptomanalysen wurden die Zellen während der Hauptgärung bei einem Extrakt von **6%** geerntet (erreicht nach 4-5 Tagen während der Hauptgärung, Gärkonditionen siehe Legende Abbildung 3). Nach der ersten von zwei durchgeführten Transkriptomanalyse wurden signifikant differentiell exprimierte Gene des Valinstoffwechsels gefunden: *ILV3*, *ILV6*, *BAT1* und *BAT2*. Erläuterungen der Gene siehe Abbildung 2. Die Ergebnisse sind im paarweisen Stammvergleich dargestellt. Die eingezeichneten Pfeile signalisieren die zusätzlich bei Extrakt 6% als signifikant differentiell exprimiert gefundenen Gene.



**Abb. cc:** Aufbau des pNatCre-Plasmids.

**Tab. 1:** Aus drei Werten gemittelte Expressionsdaten der in die Valinbiosynthese involvierten Gene inkl. Standardabweichung.

Es=8%	A		B		C		D		E		F	
	MW	Stabwn										
ILV2	9,43567218	0,13612966	9,42476339	0,09832061	9,48329584	0,11185164	9,52143316	0,29037358	9,71151151	0,53743439	9,27712036	0,21664435
ILV3	9,1928219	0,10235121	8,76694256	0,24489539	9,34095892	0,12479164	7,81032641	0,09028387	9,22217113	0,3353885	8,53374896	0,16621313
ILV5	12,7010623	0,08276394	12,6993082	0,26038027	12,7556249	0,11583487	12,8603696	0,10375146	12,5291919	0,0756996	12,5164315	0,1777106
ILV6	11,156898	0,18805725	9,36041031	0,0887045	11,0337964	0,06281964	10,0647221	0,15337328	10,7235284	0,40185712	10,5123384	0,18446763
BAT1	10,7242716	0,25860828	8,97636005	0,19339009	10,6541318	0,02773992	10,8918738	0,3283826	9,64257506	0,23117676	9,79082238	0,2990799
BAT2	9,03991684	0,11358154	9,17594248	0,14164823	9,22553553	0,14101179	5,89489006	0,65555404	9,01600518	0,10485128	8,75887936	0,20663179

Es=6%	A		B		C		D		E		F	
	MW	Stabwn										
ILV2	9,86631302	0,28581135	9,60987	0,19679407	9,75148487	0,09898397	9,84509398	0,68733445	9,53459774	0,26930803	9,58784374	0,22001527
ILV3	9,59344809	0,18158145	9,12408321	0,36053371	9,9121608	0,1190587	7,90077227	0,31207031	9,06369725	0,06149482	9,05877777	0,15628958
ILV5	12,636552	0,11062553	12,5309433	0,26689718	12,9281453	0,01430159	12,8436996	0,23729539	12,6998407	0,15633707	12,831773	0,20268217
ILV6	11,1648449	0,19680364	9,49307251	0,02680247	11,3468562	0,0994056	10,0274743	0,22676324	10,7915761	0,25097272	10,7711985	0,0822991
BAT1	10,7242716	0,25860828	8,97636005	0,19339009	10,6541318	0,02773992	10,8918738	0,3283826	9,64257506	0,23117676	9,79082238	0,2990799
BAT2	9,3724366	0,02471091	9,50849728	0,16187852	9,46163367	0,05406681	5,93370624	0,24152415	9,14567582	0,18448672	9,08703728	0,09023874

**CD-ROM-Anhang:** Genexpressionsdaten für die sechs Hefestämme A - F jeweils für 8% bzw. 6% Extraktgehalt.