

Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung von Reinzuchthefen für die Weinbereitung

PETER STADLWIESER¹, KONRAD JOHANN DOMIG², BEATRIX KÖGLER², WOLFGANG KNEIFEL^{2,3}, KARIN SILHAVY¹ und KARIN MANDL¹

¹ Höhere Bundeslehranstalt für Wein- und Obstbau
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
E-mail: Karin.Mandl@hblawo.bmlfuw.gv.at

² Universität für Bodenkultur, Department Lebensmittelwissenschaften und -technologie
Abteilung Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene
A-1180 Wien, Gregor Mendel-Straße 33

³ Universität für Bodenkultur, Department Lebensmittelwissenschaften und -technologie
Abteilung Lebensmittelqualitätssicherung
A-1190 Wien, Muthgasse 18

60 Reinzuchthefen verschiedener kommerzieller Anbieter wurden auf ihre biochemischen und molekularbiologischen Eigenschaften hin untersucht und charakterisiert. Die biochemische Untersuchung, basierend auf der Kohlenhydratverwertung der Hefen, erfolgte mit Hilfe des semiautomatischen Systems MicroLog. Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden mittels Contour-clamped Homogeneous Electric Field Pulsed-Field Gel Electrophoresis (CHEF-PFGE), Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) der mitochondrialen DNA (mtDNA) und mit der PCR-basierten Fingerprint-Methode der δ -Elemente durchgeführt. Eine eindeutige Identifizierung auf Spezies- und Stammenebene war anhand der biochemischen Eigenschaften erwartungsgemäß nicht möglich. Zwischen den *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* und var. *bayanus* konnte allerdings differenziert werden. Ein Dendrogramm-Vergleich der molekularbiologisch erfassten Daten zeigte, dass die Methode des RFLP der mtDNA sehr selektive und individuelle Ergebnisse liefert. Am besten eignete sich die schnell und einfach durchzuführende PCR-Fingerprintmethode der δ -Elemente, deren Differenzierungsgrad jedoch nicht für die Unterscheidung aller Stämme ausreicht. Ein eindeutiges genetisches Profil für jeden Stamm erhält man durch die Kombination mit den Daten der RFLP der mtDNA oder den Daten der CHEF-PFGE Technik.

Schlagwörter: *Saccharomyces cerevisiae*, Karyotypisierung, mtDNA, RFLP, PCR, CHEF-PFGE, δ -Elemente, Weinhefen

Biochemical and molecular-biological characterisation of selected dry yeasts for wine production. 60 active dry yeasts of different commercial suppliers were examined and characterised based on their biochemical and molecular-biological qualities. The biochemical investigation was based on the carbohydrate utilization of the yeasts and was examined with the semiautomatic MicroLog system. The molecular-biological investigations were carried out by means of Contour-clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of the mitochondrial DNA (mtDNA) and the PCR fingerprinting-method of the δ -elements. As expected, no clear identification on species and strain level based on the metabolic fingerprints was obtainable. However, strains belonging to the *Saccharomyces cerevisiae* subspecies *cerevisiae* and *bayanus* could be differentiated. When comparing the dendrograms of the RFLP from mtDNA very individual patterns and thereby a high discrimination level are found. The fast and easily to perform PCR fingerprint-method of the δ -elements displayed the best discrimination, but could not distinguish all strains. In combination with the results of the RFLP of the mtDNA, or with the CHEF-PFGE method distinctive strain-related datasets are created.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Karyotyping, mtDNA, RFLP, PCR, CHEF-PFGE, δ -elements, wine yeasts

*La caractérisation par la biochimie et la biologie moléculaire de levures sélectionnées destinées à la vinification. 60 levures sélectionnées de différents fournisseurs commerciaux ont été examinées et caractérisées en vue de déterminer leurs caractéristiques du point de vue de la biochimie et de la biologie moléculaire. L'examen biochimique, basé sur la mise en valeur des hydrates de carbone par les levures, a été effectué à l'aide du système semi-automatique MicroLog. Les examens relevant de la biologie moléculaire ont été effectués à l'aide de la méthode Contour-clamped Homogeneous Electric Field Pulsed-Field Gel Electrophoresis (CHEF-PFGE), du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) de l'ADN mitochondrial (ADNmt) et à l'aide de la technique "fingerprinting par PCR" des éléments δ . Comme prévu, une identification sans ambiguïté au niveau de l'espèce et de la souche n'a pas été possible en s'appuyant sur les caractéristiques biochimiques. Il a cependant été possible de différencier entre les sous-espèces du *Saccharomyces cerevisiae*, *cerevisiae* et *bayanus*. La comparaison des dendrogrammes des données saisies à l'aide des techniques de la biologie moléculaire a montré que la méthode du RFLP de l'ADNmt fournit des résultats très sélectifs et individuels. La méthode la plus appropriée était la technique "fingerprinting par PCR" des éléments δ dont le degré de différenciation ne suffit pourtant pas pour la distinction de l'ensemble des souches. Il est possible d'obtenir un profil génétique clair de chaque souche à l'aide de la combinaison avec les données du RFLP de l'ADNmt ou avec les données de la méthode CHEF-PFGE.*

Mots clés : *Saccharomyces cerevisiae*, caryotypage, ADNmt, RFLP, PCR, CHEF-PFGE, éléments δ , levures de vinification

Die Verwendung von ausgewählten Reinzuchthefen der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* zur Weinbereitung hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Dieser Trend wird sich auch in den nächsten Jahren fortsetzen. Dies ist auf die vielen Vorteile der Reinzuchthefen und das immer größer werdende Angebot an selektierten und gentechnisch modifizierten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen zurückzuführen (MILLIES, 1994). Durch das mittlerweile schwer zu überschauende Angebot der auf dem Markt befindlichen Hefen ist es notwendig geworden, die Stämme sowohl biochemisch als auch genetisch zu charakterisieren und ihre Ähnlichkeit darzustellen.

Es steht eine Vielzahl von Methoden mit unterschiedlicher Differenzierungstiefe für die Charakterisierung zur Verfügung. Die biochemische Charakterisierung von Hefen basiert auf der unterschiedlichen Verwertung von Kohlenhydratquellen. Mit Hilfe semiautomatischer Systeme, wie beispielsweise des MicroLog-Systems, kann die Assimilation und Oxidation von 95 Kohlenhydraten relativ einfach analysiert werden. In weiterer Folge kann auf Basis einer im System hinterlegten Datenbank eine Identifizierung durchgeführt werden. Aus Nahrung und Getränken isolierte Hefen, darunter auch *Saccharomyces cerevisiae*, wurden mit diesem System in den meisten Fällen richtig identifiziert (PRAPHAILONG et al., 1997).

In den letzten Jahren wurden verschiedene molekularbiologische Methoden entwickelt, mit denen sich unterschiedliche Hefestämme üblicherweise eindeutig voneinander unterscheiden lassen. Methoden, die auf Chromosomenpolymorphismus basieren, werden als Karyo-

typisierung (Karyotyping) bezeichnet. Die ersten Versuche dazu wurden von SCHWARTZ und CANTOR (1984) und CARLE und OLSON (1985) mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) durchgeführt. Heute zählt die Karyotypisierung mit der (CHEF-PFGE) zu den Standardmethoden der molekularbiologischen Charakterisierung von Weinhefen (VEZINHET et al., 1990; SCHÜTZ und GAFNER, 1993; HAYFORD und JESPERSEN, 1999; MITTERDORFER et al., 2002).

Der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) der mitochondrialen DNA (mtDNA) bedient sich des Polymorphismus von DNA-Abschnitten mit hohem Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C). Mit der von QUEROL et al. (1992) entwickelten Analysemmethode wurde diese Möglichkeit zur Charakterisierung von Weinhefestämmen der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* wesentlich verbessert. Die Methode besteht aus der Isolierung der gesamten DNA (QUEROL et al., 1992) und der Verwendung von an GC-reichen Sequenzen schneidenden Restriktionsenzymen, welche die genomische DNA sehr häufig, die mtDNA jedoch sehr selten schneiden (SABATÉ et al., 1998; LOPEZ et al., 2001). Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine weitere Schnellmethode dar, deren Funktionsprinzip auf der Amplifikation ausgewählter DNA-Abschnitte beruht. Das *Saccharomyces cerevisiae*-Genom enthält repetitive DNA-Sequenzen, zum Beispiel die δ -Elemente (CAMERON et al., 1979). Die Anzahl und die mitunter sehr hohe Variabilität dieser Elemente ermöglicht eine sehr gute Differenzierung innerhalb der Spezies. Diese PCR-basierte Fingerprint-Methode ist sehr gut für die Unterscheidung von kommerziell erhältlichen Rein-

zuchthefestämmen der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* geeignet (LAVALLÉE et al., 1994).

Ziel vorliegender Arbeit war die Erstellung einer Datenbank zur eindeutigen Erkennung von Hefestämmen. Unter anderem soll damit künftig das langwierige und kostenintensive Austesten und Selektionieren von bereits am Markt befindlichen Stämmen vermieden werden. Weiters erlaubt diese Datenbank den Vergleich von Hefen mit ähnlichen Gärungseigenschaften mittels Genom-basierter Daten aus den eingesetzten Fingerprint-Techniken.

Material und Methoden

Hefestämme

Für diese Studie wurden 60 verschiedene Reinzuchthefestämme verwendet. In Tabelle 1 sind die untersuchten Hefen mit ihrer Herstellerbezeichnung, ihrer taxonomischen Zuordnung und dem Hersteller aufgelistet. Die Reinzuchthefen wurden rehydriert, mittels Glukose-Hefeextrakt-Pepton (GYP)-Medium kultiviert und in Form von Stockkulturen (Glycerol 25% v/v) bei minus 80 °C gelagert (VERSAVAUD et al., 1995).

Oxidations- und Assimilationstests mit dem MicroLog-System (Biolog)

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte auf Basis der Arbeitsanleitung der Firma Biolog (BIOLOG, 1999). Die Hefen wurden auf Biolog Universal Yeast (BUY)-Agar (70005 Biolog Inc., Hayward, USA) bei 28 °C für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden eine Hefesuspension mit geforderter Trübung hergestellt und die YT-Mikrotiterplatten (Biolog Inc., Hayward, USA) mit 100 µl Inokulum beimpft. Die YT-Mikrotiterplatten wurden 72 Stunden bei 28 °C bebrütet. Die Trübung bzw. Verfärbung der Wells wurde alle 24 Stunden mit der Mikrotiterplatten-Photometer-Microstation (Biolog Inc., Hayward, USA) detektiert. Die Identifizierung der untersuchten Hefen erfolgte dann auf Basis der Hefedatenbank (Yeast Data Base Version YT 4.01A) des MicroLog-Systems von Biolog (BIOLOG, 2005).

Karyotyping

Die Hefezellen wurden auf GYP-Agarplatten für 24 Stunden bei 28 °C angezüchtet und anschließend in GYP-Bouillon für 48 Stunden bei 28 °C am Rotationschüttler bebrütet. Die Chromosomen wurden entsprechend dem Protokoll der Firma Bio-Rad mit Hilfe des

CHEF Yeast Genomic DNA-Kit gereinigt (BIO-RAD, 2003). Anschließend wurden die Chromosomen in einem 1% igen Agarosegel mit der CHEF DRIII PFGE-Apparatur (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) unter folgenden Bedingungen getrennt: 0,5 x TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer, 13,5 °C, 120 V für 15 h bei einer Pulsdauer von 60 s und 9 h bei einer Pulsdauer von 90 s. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid 1 h gefärbt, 5 min entfärbt und mit Hilfe des Auto Chem-Systems (UVP Inc., Cambridge, UK) photographiert.

Reinigung der mtDNA

Die Hefezellen wurden auf GYP-Agar 24 Stunden bei 28 °C angezüchtet und anschließend in GYP-Bouillon über Nacht bei 28 °C am Rotationsschüttler inkubiert. Die Reinigung wurde in modifizierter Form nach QUEROL et al. (1992) durchgeführt. Die Inkubation auf Eis wurde auf zehn Minuten reduziert. Nach der Fällung mit der 1,5-fachen Menge an Isopropanol erfolgte die Zugabe von 300 µl TE2-Puffer (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) und anschließend die Zugabe von 40 µg/ml RNase. Es erfolgte eine neuerliche Fällung mit Isopropanol und ein Waschen des Niederschlags mit Ethanol (95%). Die gefällte DNA wurde in 35 µl TE2-Puffer gelöst.

Restriktionsabbau und Elektrophorese der mtDNA

Zu jeweils 5 µl der gereinigten DNA wurden 2 µl des jeweiligen Restriktionsenzym-puffers, 2 µl Rinderserumalbuminlösung 10 x (BSA), 5 µl ddH₂O und das jeweilige Restriktionsenzym (*CfoI* oder *RsaI*) zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die geschnittene DNA wurde auf ein 2% iges Agarosegel aufgetragen, das mit Ethidiumbromid (1 µl einer 1%igen Lösung/100 ml Agaroselösung) versetzt war. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V über 14 h in einem 0,5 x TBE-Puffer. Das Gel wurde nach dem Ende des Laufes mit dem Auto Chem-System (UVP Inc., Cambridge, UK) photographiert.

PCR der δ-Elemente

Die PCR der δ-Elemente wurde mit dem Primerpaar δ1 (3'-CAA AAT TCA CCT ATA TTC TCA-5') und δ2 (5'-GTG GAT TTT TA TTC CAA CA-3') am Mastercycler Gradient (Eppendorf) nach ESPINOSA et al. (2002) durchgeführt. Der Prämix hatte folgende Zusammensetzung: 5 µl 10 x Puffer, 10 µl dNTPs (1 mmol) je 4 µl

Tabelle 1: Liste der untersuchten Hefestämme

Nr.	Bezeichnung I	Bezeichnung II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> variants	Hersteller
1	Col. Cepage	Cabernet Sauvignon	<i>cerevisiae</i>	DSM
2	Col. Cepage	Chardonnay	<i>cerevisiae</i>	DSM
3	Col. Cepage	Merlot	<i>cerevisiae</i>	DSM
4	Col. Cepage	Sauvignon	<i>cerevisiae</i>	DSM
5	Enoferm	M2	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
6	Enoferm	T306	unbekannt	Lallemand
7	Fermiblanc	Arom	<i>cerevisiae</i>	DSM
8	Fermiblanc	Extract	<i>cerevisiae</i>	DSM
9	Fermicru	4F9	<i>cerevisiae</i>	DSM
10	Fermicru	AR2	<i>cerevisiae</i>	DSM
11	Fermicru	LS2	<i>bayanus</i>	DSM
12	Fermicru	LVCB	<i>bayanus</i>	DSM
13	Fermicru	Primeur	<i>cerevisiae</i>	DSM
14	Oenoferm	Interdry	<i>bayanus</i>	Erbslöh
15	Fermicru	VR5	<i>cerevisiae</i>	DSM
16	Fermifin	-	<i>cerevisiae</i>	DSM
17	Fermirouge	-	<i>cerevisiae</i>	DSM
18	Filtraferm	Arom	<i>cerevisiae</i>	Begerow
19	Filtraferm	C	<i>cerevisiae</i>	Begerow
20	Filtraferm	Rot	<i>cerevisiae</i>	Begerow
21	Hansen	V442	<i>cerevisiae</i>	Chr. Hansen
22	Hefix	2000	<i>bayanus</i>	Chr. Hansen
23	Lalvin	1033	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
24	Lalvin	71B	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
25	Lalvin	AMH	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
26	Lalvin	Côtes-du-Rhône 2056	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
27	Lalvin	CY 3079 Bourgoblanc	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
28	Lalvin	Demalicante 432	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
29	Lalvin	EC 1118	<i>bayanus</i>	Lallemand
30	Lalvin	EGH2 Pannonia	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
31	Lalvin	IVC D47	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
32	Lalvin	K1 V1116	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
33	Lalvin	R2	<i>bayanus</i>	Lallemand
34	Lalvin	RC 212 Bourgorouge	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
35	Lalvin	R-HAST	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
36	Maurivin	AWRI 52	<i>bayanus</i>	Maurivin
37	Maurivin	AWRI 350	<i>cerevisiae</i>	Maurivin
38	Oenoferm	Bouquet	<i>bayanus</i>	Erbslöh
39	Oenoferm	Color	<i>bayanus</i>	Erbslöh
40	Oenoferm	Freddo	<i>bayanus</i>	Erbslöh
41	Fermicru	VB1	<i>cerevisiae</i>	DSM
42	Oenoferm	Klosterneuburg	<i>cerevisiae</i>	Erbslöh
43	Oenoferm	Pinot Type	<i>bayanus</i>	Erbslöh
44	Oenoferm	IOC Prise de Mousse	<i>bayanus</i>	Erbslöh
45	Oenoferm	Rosé	<i>bayanus</i>	Erbslöh
46	Oenoferm	Rouge	<i>cerevisiae</i>	Erbslöh
47	Oenoferm	Tipico	<i>cerevisiae</i>	Erbslöh
48	Oenoferm	Veltliner	<i>bayanus</i>	Erbslöh
49	Uvaferm	299	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
50	Uvaferm	CEG	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
51	Uvaferm	CS2	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
52	Uvaferm	NEM	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
53	Viniflora	Novi Ferm	<i>cerevisiae</i>	Chr. Hansen
54	Viniflora	Rubi Ferm	<i>bayanus</i>	Chr. Hansen
55	Zymaflora	VL1	<i>cerevisiae</i>	Laffort
56	Zymaflora	VL3	<i>bayanus</i>	Laffort
57	Fermichamp	-	<i>bayanus</i>	DSM
58	Lalvin	Simi White	<i>cerevisiae</i>	Lallemand
59	Uvaferm	43	<i>bayanus</i>	Lallemand
60	Uvaferm	BDX	<i>cerevisiae</i>	Lallemand

Primer (5 pmol) und 26,5 µl ddH₂O. Dem Prämix wurden 0,5 µl Taq Polymerase (5 units/µl) zugesetzt. Mit einer sterilen Pipette wurden von einer 24 Stunden alten Hefekolonie Zellen entnommen und in den PCR-Ansatz geimpft. Die PCR der δ-Elemente wurde nach folgendem Programm durchgeführt: 1 min Denaturierung bei 94 °C, gefolgt von 30 Zyklen mit je 1 min Denaturierung bei 94 °C, 2 min Annealing bei 50 °C und 1 min Elongation bei 72 °C. Zum Schluss erfolgte ein finaler Elongationsschritt bei 72 °C (SUGITA und NISHIKAWA, 2003).

Erstellung der Dendrogramme

Die Gele wurden mittels Lab Works-Software (Version 4.5; UVP Inc., Cambridge, UK) ausgewertet. Die Dendrogramme wurden mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 12.0; SPSS Inc., Chicago, USA) erstellt, wobei Algorithmen der hierarchischen Clusteranalyse eingesetzt wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Oxidations- und Assimilationstests mit dem MicroLog-System (Biolog)

Die Kohlenhydratquellen D-L-Glucose, Maltose, Raffinose und Saccharose wurden von allen Stämmen verwertet. Trehalose und Turanose wurden von 95% der Stämme metabolisiert. Stachiose konnten mehr Stämme assimilieren als oxidieren. Galaktose wurde von 73% der Stämme verwertet, wobei dieser Anteil den 18 *S. bayanus*-Reinzuchthefestämmen entsprach. Dextrin und Maltotriose wurden von 30% der Stämme oxidiert, Dextrin von 30% und Maltotriose von 43% assimiliert. Nur wenige Stämme waren in der Lage, Palazitose und Melezitose zu verwerten. Weiters wurde Amygdalin von 63%, Malitol von 48% und D-Ribose von 7% assimiliert. Die Mischung aus D-Galactose und D-Xylose wurde zu 73% assimiliert.

In Abbildung 1 ist das Dendrogramm der Zuckerverwertung der 60 Hefestämme dargestellt. Das Identifizierungssystem des MicroLog-Systems (Biolog) eignete sich für eine grobe Gruppierung der Stämme, basierend auf ihrer Fähigkeit zur Oxidation und Assimilation unterschiedlicher Kohlenhydratquellen. Erwähnenswert ist, dass alle als *Saccharomyces cerevisiae* variation *bayanus* gekennzeichneten Stämme vom MicroLog-System (Biolog) als *Pichia*- oder *Kluveromyces*-Stämme identifiziert wurden. Im Dendrogram sind sie im Cluster A1 zu finden (Abb. 1). Die Variation *bayanus*

wurde vom MicroLog-System (Biolog) nicht als solche erkannt (Yeast Data Base Version: YT 4.01A). Wie bereits durch KREGER VAN RIJ (1984) festgestellt, unterscheiden sich *Saccharomyces cerevisiae* variation *bayanus* und *Saccharomyces cerevisiae* variation *cerevisiae* durch die Verwertung unterschiedlicher Kohlenhydratquellen. So können *Saccharomyces cerevisiae* variation *bayanus*-Stämme im Unterschied zu *Saccharomyces cerevisiae* variation *cerevisiae*-Stämmen Galaktose nicht verwerten (BARNET et al., 2000).

Es wurde bereits in einigen anderen Studien (VAN DER VOSSEN und HOFTRA, 1996) aufgezeigt, dass eine auf morphologischen und biochemischen Methoden basierende phänotypische Identifizierung zu Fehlinterpretationen führen kann. Dies ist offenbar dadurch bedingt, dass Hefen sehr oft Mutationen und Deletionen ihrer Chromosomen unterliegen. Es kann somit jede charakteristische Eigenschaft eines Stammes der Variation *saccharomyces* unter bestimmten Bedingungen nicht aktiv sein. Beispielsweise kann die Galaktoseverwertung der Variation *cerevisiae* nicht aktiviert sein. Dies führt somit zu einer falschen Zuordnung eines *Saccharomyces cerevisiae* variation *cerevisiae*-Stammes zu der Variation *bayanus* (VAN DER WALT, 1987).

Zu beobachten war dies bei dieser Arbeit am Beispiel des Stammes Oenoferm Rosé, der als Variation *bayanus* bestimmt wurde, sich aber im Oxidationstest von den anderen *bayanus* Variationen unterschied.

CHEF-PFGE-Karyotyping

Die Chromosomengröße von allen untersuchten Stämmen lag zwischen 200 kb und 1900 kb. Polymorphismus konnte sowohl in der Größe der Chromosomen als auch in der Anzahl der Banden beobachtet werden. *Saccharomyces cerevisiae* besitzt 16 Chromosomen. Bei keinem Stamm waren alle 16 Chromosomen als Einzelbanden sichtbar. Die Bandenzahl variierte zwischen 11 und 15. Am häufigsten waren Chromosomen XII und IV, VII und XV, XVI und XIII, V und VII als Doppelbanden aufgetrennt. Es gab aber auch Dreifachbanden II, XIV und X, ebenso wie zwischen den drei Chromosomen III, IV und I. Am seltensten konnten die Chromosomen V und VIII voneinander getrennt werden.

In Abbildung 2 ist das Dendrogramm der CHEF-PFGE abgebildet. Aus dieser Abbildung lässt sich auf Grund der geringen Übereinstimmungen zwischen einzelnen Stämmen erkennen, dass die CHEF-PFGE eine sehr gute und verlässliche Methode zur Differenzierung verschiedener Reinzuchthefestämme ist. Diese Methode ist auf Grund der Chromosomenreinigung und der lan-

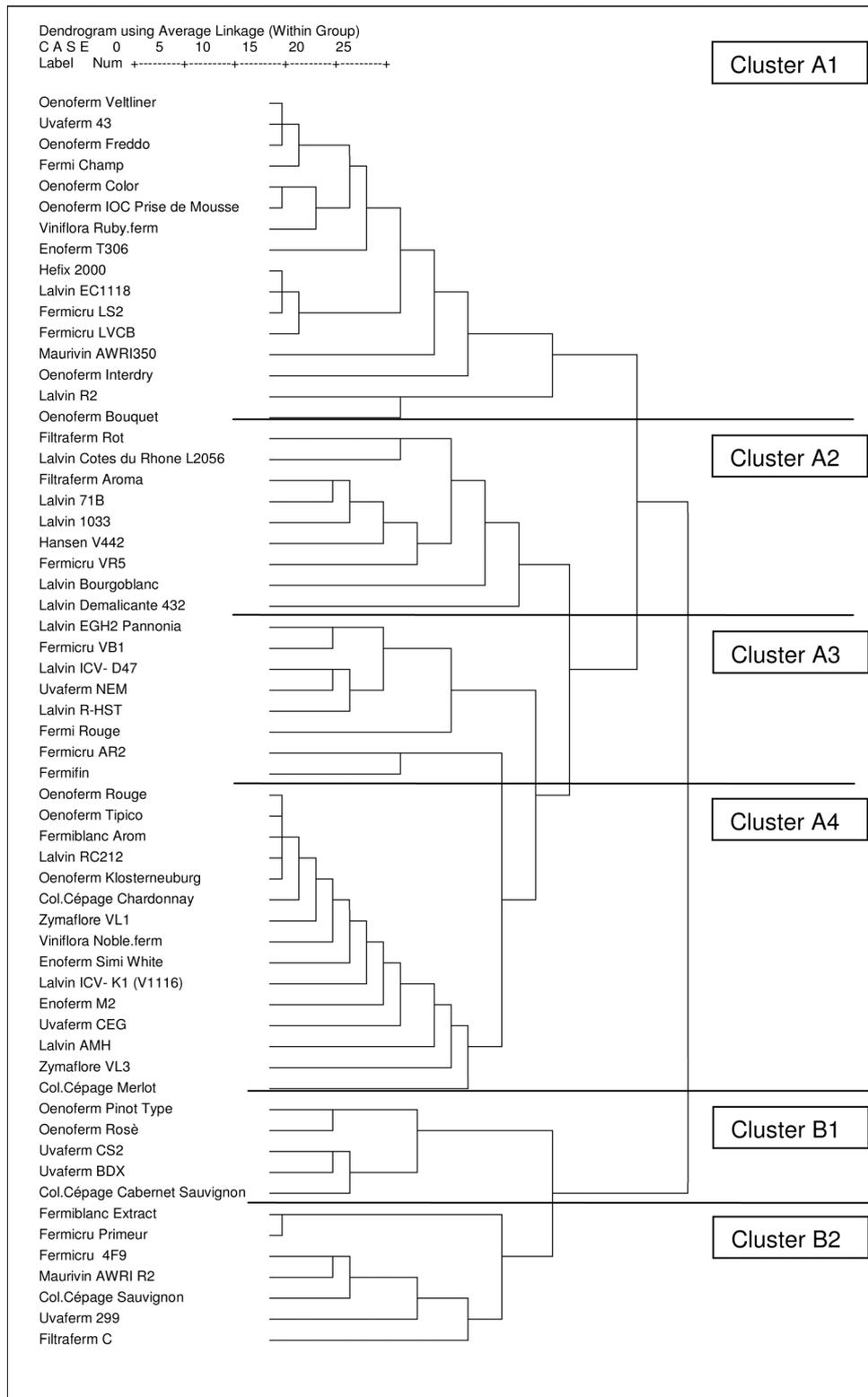


Abb. 1: Dendrogramm der Reinzuchthefestämme auf Basis der Oxidation- und Assimilationstests mit dem MicroLog System (Biolog).

gen Elektrophorese-dauer aber sehr zeitintensiv. CHEF-PFGE wird vielfach zur Karyotypisierung von in Lebensmitteln vorkommenden Hefe- und Bakterienstämmen sowie von pathogenen Stämmen verwendet (MONOD et al., 1990). Auf Grund der Variabilität der Chromosomenlänge, die auch innerhalb der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* gegeben ist, ist eine Unterscheidung innerhalb der Variationen und auch zwischen den Stämmen möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 59 verschiedene Karyotypen identifiziert. Nur zwei Karyotypen waren identisch, wobei der Stamm Oenoferm Rouge ein Klon des Stammes Oenoferm Klosterneuburg ist und somit identische Bandenmuster besitzt. Auch frühere Untersuchungen an Reinzuchthefestämmen führten zu einem ähnlichen Ergebnis (YAMAMOTO et al., 1991). Diese Methode bewährt sich nicht nur in der Differenzierung von Reinzuchthefestämmen, sondern sie lässt sich auch in der Untersuchung von aus Wein isolierten Stämmen

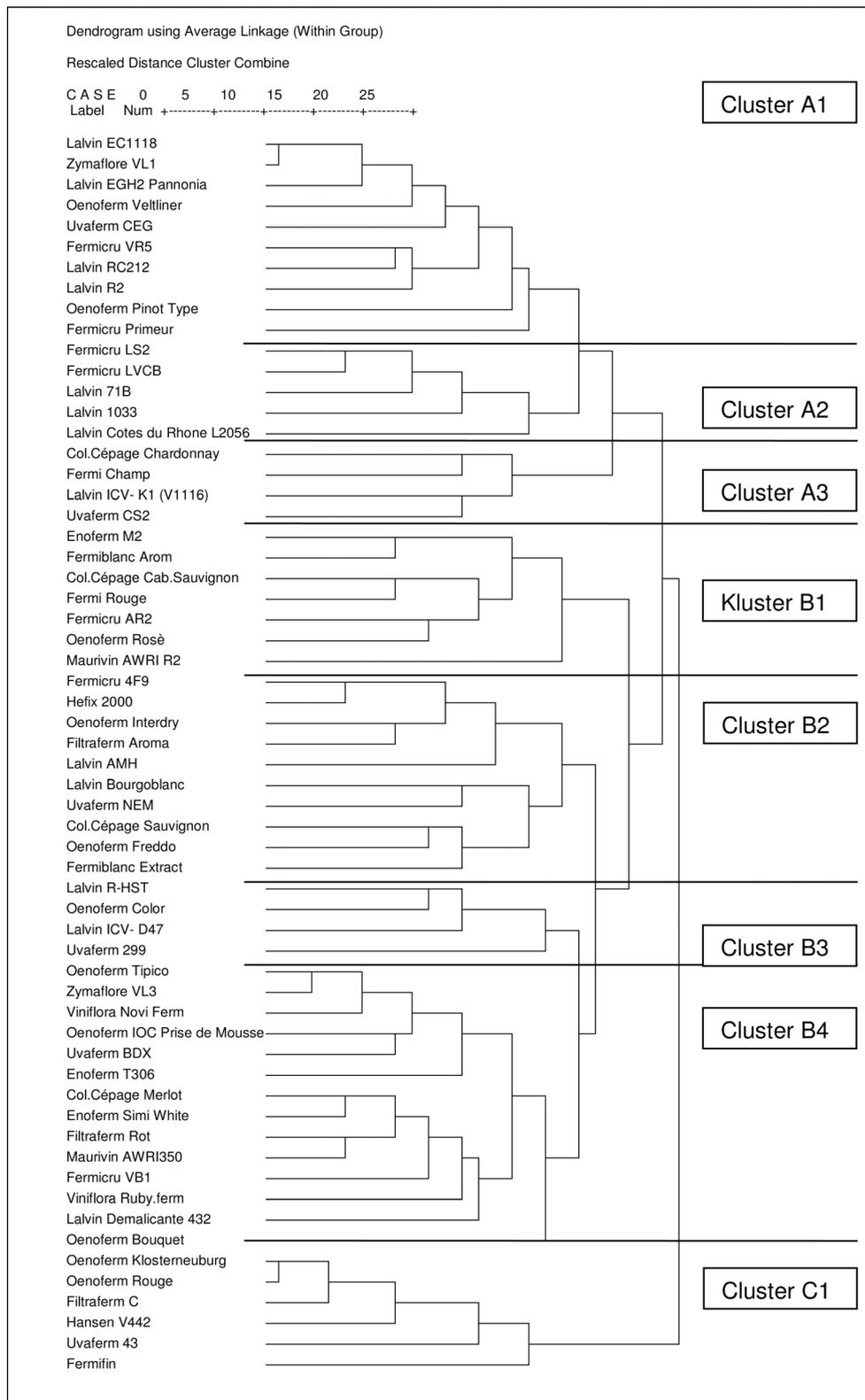


Abb. 2 : Dendrogramm der Hefestämme nach der Auftrennung der Chromosomen (Karyotyping) mittels CHEF-PFGE

erfolgreich einsetzen. VAN DER WESTHUIZEN (1992) untersuchte isolierte Hefestämme aus frisch vergorenem Wein und konnte dabei 20 verschiedene Karyotypen von 22 isolierten Stämmen ermitteln.

Der Polymorphismus der Banden lässt sich auf verschiedene Gründe zurückführen. Der Erste ist die Aneuploidie, d.h. eine Genmutation, bei welcher Chromosomen zusätzlich vorhanden sein können oder gänzlich fehlen (YAMAMOTO et al., 1991). Die Aneuploidie ließ sich an den Stämmen Fermiblanc Extrakt und Col. Cépage Merlot beobachten. Weiters wäre es auch möglich, dass diese Fragmente von einem Chromosom abgebrochen sind.

Ein anderer Grund für Polymorphismus ist das Überlappen der Banden. Dies wurde vor allem im Bereich hoher Molekülmassen beobachtet, wobei dies durch die geringe elektrophoretische Mobilität dieser Chromosomen bedingt ist (VEZINEHT et al., 1993).

Die größte Variabilität der Chromosomen besaß Chromosom XII. Dies ist eine besondere Eigenschaft

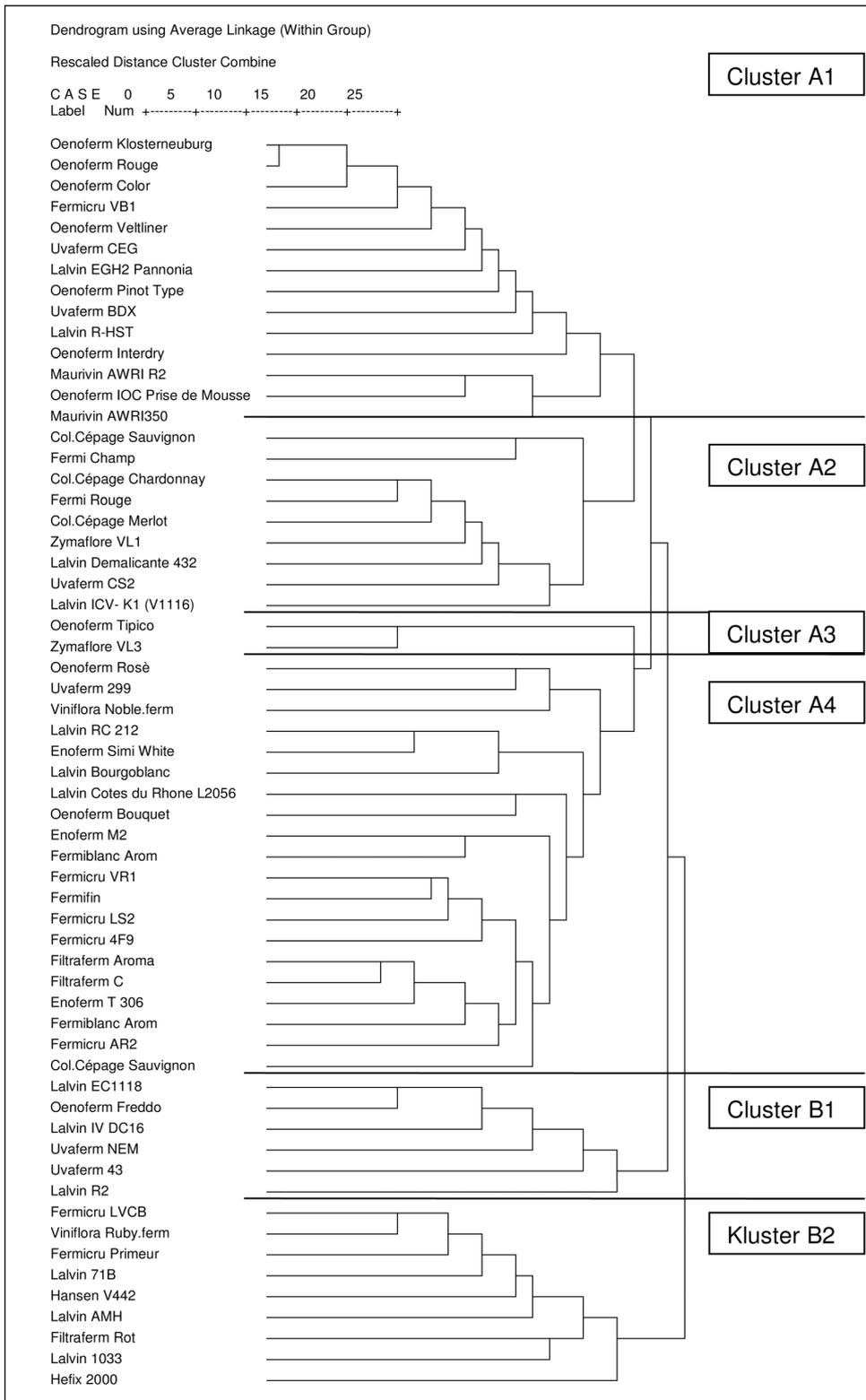


Abb. 3: Dendrogramm der Reinzuchthefestämme basierend auf der RFLP der mtDNA mit *CfoI*

der Spezies *Saccharomyces cerevisiae*, denn auf dem Chromosom XII liegen die für rDNA codierenden Gene. Die Zahl der Wiederholungen dieser Gene variiert von 20 bis zu 200. Weitere DNA-repetitive Sequenzen, wie das SUC-Gen und die transposonlike-elements TY1 und TY2, sind zum Teil für den Polymorphismus anderer Chromosomen verantwortlich (PETES, 1979).

Ein weiterer Grund für den Polymorphismus kann mit einer strukturellen Reorganisation erklärt werden (BIDENNE et al., 1992). Die dadurch entstehenden Modifikationen konnten bisher nur bei homologen di- oder polyploiden Strängen beobachtet werden. Sie finden während der Mitose in einer relativ hohen Frequenz statt. Der Zeitraum, in dem diese Variationen in der Natur wiederholt auftreten, konnte noch nicht ermittelt werden. (LONGO und VEZINHET, 1993).

Restriktionsanalyse der mtDNA

Die mit dem Restriktionsenzym *CfoI* abgebaute mtDNA führte, wie in Abbil-

mit deren Hilfe die Stämme eindeutig voneinander unterschieden werden können. Auch diese Methode besitzt im Vergleich zu auf PCR basierenden Methoden den Nachteil einer zeitintensiven DNA-Vorbereitung sowie einer langen Elektrophoresedauer. Durch Modifikation der in der Literatur angegebenen Elektrophoresetrenndauer (14 h) (VERSAVAUD et al., 1995) wurde eine wesentlich bessere Auftrennung der Restriktionsfragmente erreicht, wodurch die Stämme besser voneinander getrennt werden konnten.

Es wurde berichtet, dass die mtDNA-Struktur als systematische Methode zur Unterteilung sehr ähnlicher *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme herangezogen werden kann, obwohl die Hauptstruktur des mitochondrialen Genoms innerhalb der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* als homogen beschrieben wird. Der Grund des Polymorphismus der einzelnen Stämme ist nicht eindeutig geklärt, aber es gibt mehrere Möglichkeiten, die zu diesem Polymorphismus führen können. Der beobachtete Polymorphismus entsteht vermutlich in erster Linie durch Punktmutationen und nicht durch große, schwer wiegende Neuarrangements des mitochondrialen Genoms (NADAL et al., 1996). Bei diesen Mutationen kommt es meist zu Deletionen, aber auch zu Insertionen, deren Häufigkeit durch die Anwesenheit von Alkohol und Acetaldehyd gefördert wird. Hierbei wird dem Alkohol ein wesentlich größerer Einfluss auf die Mutationsrate zugeschrieben, denn aus zuvor sterilisierten und anschließend mit einer einzigen Reinzuchtheife vergorenen Mosten konnten Stämme mit verschiedenen Bandenmustern isoliert werden (GUILLAMON et al., 1994).

Beide verwendeten Restriktionsenzyme ermöglichen es, zwischen 59 von 60 Stämmen zu differenzieren. Beim RFLP des *CfoI*-Restriktionsabbaus wurden 59 verschiedene Bandenmuster ermittelt. Lediglich die Banden der Stämme O. Klosterneuburg und O. Rouge waren erwartungsgemäß identisch. Beim *RsaI*-Restriktionsschnitt wiesen hingegen die Stämme Fermifin und Fermirouge, Hefix2000 und Lalvin EC1118 und wie erwartet O. Klosterneuburg und O. Rouge identische Bandenmuster auf.

PCR der δ -Elemente

Die PCR-Produkte der einzelnen Stämme unterscheiden sich stark, sodass viele sehr verschiedene Bandenmuster resultieren. Die meisten Stämme weisen Banden bei 500 bp, 720 bp und 990 bp auf. Große Unterschiede im Bandenmuster finden sich im Bereich > 1500 bp und im Bereich < 400 bp. In Abbildung 4 ist das Dendrogramm der PCR-basierten Typingmethode der δ -Ele-

mente dargestellt.

Mit der PCR-Fingerprint-Methode der δ -Elemente lassen sich sehr individuell unterschiedliche Bandenprofile erstellen. Diese Methode wird häufig zur Klassifizierung von Reinzuchthefestämmen und von aus Wein isolierten Stämmen angewendet. Die Vorteile liegen in der einfachen Handhabung der PCR und dem schnell erzielbaren Ergebnis. Von Nachteil ist die mitunter ungenügende Differenzierung zwischen Stämmen. So können einige Hefestämme auf Grund ihrer identischen Bandenmuster von gleicher Herkunft sein (EGLI et al., 1998). Ein weiteres Problem bei der Verwendung dieser Methode ist das mögliche Auftreten von unspezifischen PCR-Produkten (Geisterbanden). Dieses Problem kann durch Erhöhung der Annealing-Temperatur und durch Verringerung der auf das Gel aufzutragenden DNA-Menge gelöst werden (FERNANDEZ-ESPINAR et al., 2001).

Schlussfolgerungen

Die biochemische Untersuchung der Kohlenhydratverwertung mit Hilfe des Biolog-Systems ist sehr einfach durchzuführen. Nachteilig sind der hohe Zeitaufwand und die nur bedingte Verlässlichkeit des Biolog-Systems in Bezug auf die korrekte Identifizierung. Die Verwertung der Kohlenhydratquellen als Basis lieferte erwartungsgemäß wenig differenzierende Ergebnisse bei der Auswertung des Dendrogramms. Auffallend bei dieser Methode war, dass alle *Saccharomyces cerevisiae* variation *bayanus*-Stämme als *Pichia*-Stämme identifiziert wurden.

Die Methoden der CHEF-PFGE, der RFLP der mtDNA und der PCR der δ -Elemente lieferten sehr individuelle Bandenprofile. Die Dendrogramme der drei molekularbiologischen Methoden unterscheiden sich bedingt durch die unterschiedlichen Untersuchungskriterien beträchtlich.

Die Methode der δ -Elemente differenzierte am schwächsten zwischen den Stämmen, zeichnete sich jedoch durch schnell verfügbare Ergebnisse und einen geringen Arbeitsaufwand aus. Hohe Selektivität wurde bei der CHEF-PFGE und der RFLP der mtDNA erreicht. Diese Methoden sind auf Grund der Notwendigkeit der Reinigung der Chromosomen bzw. der DNA und der langen Elektrophoresezeiten wesentlich zeit- und arbeitsaufwändiger.

Für eine möglichst vollständige molekularbiologische Charakterisierung von Reinzuchthefen empfiehlt sich eine Kombination der PCR-Fingerprint-Methode (δ -Elemente) mit der CHEF-PFGE oder der RFLP Methode der mtDNA.

Literatur

- BARNET, J.A., PAYNE, R.W. and YARROW, D. (2000): Yeasts-characteristics and identification. 3rd edition. - Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2000
- BIDENNE, C., BLONDIN, B., DEQUIN, S., VEZINHET, F. 1992: Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 22: 1-7
- BIOLOG (1999): YT micro plate instructions for use. - Hayward, CA: Biolog Inc., 1999
- BIOLOG (2005): Biolog YT MicroPlate, Yeast database, Release 3.5 (<http://www.biolog.com/>). - Hayward, CA: Biolog Inc., 2005
- BIO-RAD (2003): CHEF genomic DNA plug kits instruction manual. - Hercules, CA: Bio-Rad Laboratories Inc., 2003
- CAMERON, J.R., LOH, E.Y. and DAVIS, R.W. 1979: Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell* 16: 739-751
- CARLE, G.F. and OLSON, M.V. 1985: An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. National Acad. Sci. USA*: 82(11): 3756-3760
- EGLI, C.M., EDINGER, W.D., MITRAKUL, C.M. and HENICK-KLING, T. 1998: Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85: 779-789
- ESPINOSA, J.C., FERNANDEZ-GONZALEZ, M., UBEDA, J. and BRIONES, A. 2002: Identification of wine yeasts by PCR-RFLP without previous isolation on plate. *Food Technol. Biotechnol.* 40: 157-160
- FERNANDEZ-ESPINAR, M.T., LOPEZ, V., RAMON, D., BARTRA, E. and QUEROL, A. 2001: Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 1-10
- GUILLAMON, J.M., SANCHEZ, I. and HUERTA, T. 1994: Rapid characterisation of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 708-714
- HAYFORD, A.E. and JESPERSEN, L. 1999: Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome polymorphism, PCR and MAL genotyping. *J. Appl. Microbiol.* 86: 284-294.
- KREGER VAN RIJ, N.J.W. (1984): The yeasts - a taxonomic study. 3rd edition. - Amsterdam: Elsevier, 1984
- LAVALLÉE, F., SALVAS, Y., LAMY, S., THOMAS, D.Y., DEGRÉ, R. and DULAU, L. 1994: PCR DNA fingerprinting used as quality control in the production of wine yeast strains. *Am. J. Enol. and Vitic.* 45: 86-91
- LONGO, E. and VEZINHET, F. 1993: Chromosomal rearrangement during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 322-326
- LOPEZ, V., QUEROL, A., RAMON, D. and FERNANDEZ-ESPINAR, M.T. 2001: A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 68: 75-81
- MILLIES, K.D. 1994: Reinzucht Trockenhefen im Test. *Dt. Weinbau* 18: 65-71
- MITTERDORFER, G., MAYER, H.K., KNEIFEL, W. and VIERNSTEIN, H. 2002: Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular techniques. *J. Appl. Microbiol.* 93: 521-530
- MONOD, M., PORCHET, S., BAUDRAZ-ROSSELET, F. and FRENK, E. 1990: The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. *J. Medical Microbiol.* 32: 123-129
- NADAL, D., COLOMER, B. and PINA, B. 1996: Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1944-1950
- PETES, T.J. 1979: Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosomes. *Proc. National Acad. of Sci. USA* 76: 410-414
- PRAPHAILONG, W., VAN GESTEL, M., FLEET, G.H. and HEARD, G.M. 1997: Evaluation of the Biolog system for the identification of food and beverage yeasts. *Letters Appl. Microbiol.* 24: 455-459
- QUEROL, A., BARRIO, E., HUERTA, T. and RAMON, D. 1992: Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2948-2953
- SABATÉ, J., CANO, J., QUEROL, A. and GUILLAMÓN, J.M. 1998: Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentation: Analysis for two consecutive years. *Letters Appl. Microbiol.* 26: 452-465
- SCHÜTZ, M. and GAFNER, J. 1993: Analysis of yeast diversity during spontaneous fermentation and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 551-558
- SCHWARTZ, D.C. and CANTOR, R.C. 1984: Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75
- SUGITA, T. and NISHIKAWA, A. 2003: Fungal identification method based on DNA sequence analysis - Reassessment of the methods of the Pharmaceutical Society of Japan and the Japanese Pharmacopoeia. *J. Health Sci.* 49: 531-533
- VAN DER VOSSEN, J.B.M. and HOFTRA, H. 1996: DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage micro organisms : Development and implementation. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 35-49
- VAN DER WALT, J.P. (1987): The typological yeast species and its delimitation. In: Rose, E.R. and Harrison, A.H.: *Yeasts - Vol. 1: Biology of yeasts*, 2nd edition, pp. 95-122. - London: Acad. Press, 1987
- VAN DER WESTHUIZEN, T.J. and PRETORIUS, I.S. 1992: The value of electrophoresis fingerprinting and karyotyping in wine yeast breeding programmes. *Antoine van Leeuwenhoek* 61: 249-257
- VERSAVAUD, A., COURCOUX, P., ROULLAND, C., DULAU, L. and HALLET, J.N. 1995: Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine producing area Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3521-3529
- VEZINHET, F., BLONDIN, B. and HALLET, J.N. 1990: Chromosomal DNA patterns and mitochondrial polymorphism as a tool of oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 568-571
- YAMAMOTO, N., YAMAMOTO, N., AMEMIYA, H., YOKOMORI, Y., SHIMIZU, K. and TOTSUKA, A. 1991: Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(4): 358-363

Manuskript eingelangt am 7. Juli 2006