

Maturaarbeit im Fach Biologie
Gymnasium Neufeld

betreut von

Ursula Jenelten, Gymnasium Neufeld

Prof. Dr. Torsten Ochsenreiter, Universität Bern

Wildhefen aus Fruchtsäften: Isolation,
molekularbiologische Bestimmung sowie
Analyse des Wachstums im Hinblick auf die
Verwertung verschiedener Zuckerarten



Oktober 2016

Joel Imhof

Vorwort

Im Frühsommer 2015 durfte ich auf dem Rebgut der Stadt Bern in La Neuveville ein zweiwöchiges Praktikum absolvieren. Dort habe ich die Reb- und Kellerarbeit kennengelernt. Besonders der Einsatz der verschiedenen Hefekulturen interessierte mich. Gebräuchliche Hefen, wie etwa die Bäckerhefe „*Saccharomyces cerevisiae*“, sind sehr gut erforscht und werden für die Herstellung von Wein, Bier und Brot kultiviert. Sie haben eine grosse wirtschaftliche Bedeutung. Ich habe mich gefragt, welche Hefepilze in einer bestimmten natürlichen Umgebung vorhanden sein könnten und wie es möglich wäre, spezifische Eigenschaften festzustellen und mögliche Nutzungspotenziale herzuleiten. Aus diesen Gedanken heraus ist nach und nach das konkrete Projekt für meine Maturaarbeit entstanden.

Dank

Ich danke allen, die mich bei der Maturaarbeit unterstützt haben. Besonders danke ich Frau Ursula Jenelten herzlich für die umfassende Betreuung. Dank den von ihr gesetzten Eckpunkten im Arbeitsablauf und der wertvollen Standortgespräche gelang es mir, jederzeit die Übersicht zu behalten und effizient zu arbeiten. Einen ganz besonderen Dank richte ich an Herrn Prof. Dr. Torsten Ochsenreiter für seine massgebliche Unterstützung beim Versuchsaufbau und bei der -durchführung. Er unterbreitete mir Vorschläge zur Erreichung der Forschungsziele, zeigte mir Methoden und begleitete mich bei den Laborarbeiten. Auch ermöglichte mir Herr Prof. Dr. Ochsenreiter die Benützung des Labors am Institut für Zellbiologie der Universität Bern und stellte mir alle benötigten Hilfsmittel und Chemikalien zur Verfügung. Ebenfalls danke ich meinem Bruder Julian, der mich bei der Textgestaltung unterstützt hat.

Abstract

Hefen sind einzellige, eukaryotische Pilze, welchen für den Menschen besonders in der Lebensmittelindustrie wichtige Bedeutung zukommt. In der vorliegenden Arbeit wurden aus fünf verschiedenen Fruchtsäften Wildhefen isoliert, drei dieser Hefen ausgewählt und ihr Wachstum in den Zuckern Fruktose, Glukose, Galaktose und Saccharose getestet und analysiert, um spezifische Eigenschaften beschreiben zu können. Die getesteten Wildhefen stammten aus den Säften der Früchte Birne, Kaki und Pflaume. Zum Vergleich wurde der Versuch ebenfalls mit einer kultivierten Bäckerhefe durchgeführt. Zudem wurden die getesteten Wildhefen morphologisch und molekularbiologisch untersucht. Die Hefen aus dem Kaki- und Pflaumensaft konnten eindeutig als Hefe *Hanseniaspora uvarum* bestimmt werden; es handelte sich also um die gleiche Hefeart. Die Hefe aus dem Birnensaft konnte phylogenetisch nicht eindeutig zugeordnet werden. Sie gehört entweder zur Gattung *Metschnikowia* oder *Candida*. Die Zucker Fruktose und Glukose konnten von den Wildhefen am besten verwertet werden, Saccharose etwas schlechter. Umgekehrt war es bei der Bäckerhefe; diese konnte Saccharose am besten verwerten. Die Hefen aus dem Kaki- und Pflaumensaft hatten ein deutlich grösseres Wachstum als die Hefe aus dem Birnensaft. Das Wachstum in Galaktose war bei allen Hefen am langsamsten. Es konnte gezeigt werden, dass jede Hefe ein individuelles Potential hat, und dass gerade auch Wildtypen spezialisiert sind.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	1
2.1	Hefe - eine Übersicht	1
2.2	Geschichte von Hefe und Gärung	1
2.3	Taxonomie von Hefepilzen	2
2.3.1	Morphologische und physiologische Klassifizierung	2
2.3.2	Art-Identifizierung über die ribosomale DNA	2
2.4	Stoffwechsel der Hefen	3
2.5	Wachstum und Zellteilung	5
2.5.1	Zellzyklus	5
2.5.2	Wachstumsbedingungen	6
2.5.3	Wachstumsphasen	7
2.5.4	Definition von Begriffen der photometrischen Wachstumsbestimmung	8
2.5.5	Mathematische Beschreibung des Wachstums	9
3	Zielsetzung und Fragestellungen	10
4	Hypothesen	10
5	Material	11
5.1	Früchte und Honig	11
5.2	Laborgeräte	11
5.3	Labormaterial	12
5.4	Chemikalien und Lösungen	12
5.5	Flüssigmedien	12
5.6	DNA-Aufreinigungs-Kit	13
5.7	Online Analyseprogramme	13
6	Methoden	13
6.1	Herkunft, Isolation und Reinkulturgewinnung von Wildhefen	13
6.1.1	Vorbereitung Fruchtsäfte und Honigwasser	14
6.1.2	Isolation der Hefen	14
6.1.3	Reinzuchtgewinnung der Hefen	14
6.2	Morphologische Charakterisierung	15
6.3	Wachstumsversuch der Wildhefen in Glukose, Fruktose, Galaktose und Saccharose	15
6.3.1	Herstellung und Vorbereitung der Flüssigkulturen	15

6.3.2	Inkubation der Flüssigkulturen	16
6.3.3	Photometrische Wachstumsbestimmung	16
6.3.4	Mathematische Beschreibung des Wachstums	16
6.4	Molekularbiologische Bestimmung der Wildhefestämme	17
6.4.1	Extraktion der genomischen DNA (gDNA)	17
6.4.2	Qualitäts- und Mengenmessung der DNA	17
6.4.3	Amplifizierung eines Abschnitts des 18s rRNA Gens mit einer Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	17
6.4.4	Gel-Elektrophorese der PCR-Produkten	18
6.4.5	Aufreinigung des PCR-Produkts	19
6.4.6	Sequenzierung des aufgereinigten PCR-Produktes	19
6.4.7	Sequenzbearbeitung	19
6.4.8	Artbestimmung und Stammbaum von H-Birne, H-Kaki und H-Pflaume	19
7	Resultate	19
7.1	Isolation und Auswahl der Wildhefen	19
7.2	Morphologische Charakterisierung	21
7.3	Wachstumsversuch	24
7.4	Phylogenie von H-Birne, H-Kaki und H-Pflaume	34
8	Diskussion	35
8.1	Isolation der Wildhefen	35
8.2	Wachstumsversuch	36
8.2.1	Wachstum von H-Birne, H-Kaki und H-Pflaume und Bäckerhefe in den verschiedenen Zuckern	36
8.2.2	Vergleich unter den Wildhefen und der Bäckerhefe	38
8.2.3	Vergleich H-Kaki und H-Pflaume - die gleiche Hefe	38
8.2.4	Fehlerquellen und Probleme	39
8.2.5	Weiterführende Überlegungen	39
8.3	Phylogenie von H-Birne, H-Kaki und H-Pflaume	39
9	Schlusswort	40
10	Literatur	40
11	Abbildungsverzeichnis	42
12	Tabellenverzeichnis	43
	Anhänge I-VII, Seite 43 ff.	43

1 Einleitung

Hefe ist der wahrscheinlich bekannteste Mikroorganismus bei der Produktion von Lebensmitteln. Hefen werden für die verschiedenen Verwendungen gezielt entwickelt und industriell hergestellt. Die herausgezüchteten Eigenschaften dieser Kulturhefen gewähren optimale Produktionsprozesse. Das Potential vieler Wildtyp-Hefen ist nicht genau erforscht. Hier könnte eine Ressource liegen für die Entwicklung von Naturprodukten oder auch moderner Nahrungsergänzungsmitteln.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Hefe - eine Übersicht

Wird im Alltag von Hefe gesprochen, so denken alle sofort an die allgemein bekannte Bäckerhefe, welche das Brot aufgehen lässt oder massgeblich an der Herstellung von Bier und Wein beteiligt ist. Biologisch gesehen sind Hefen einzellige, eukaryotische, durchschnittlich 10 Mikrometer grosse Pilze, von denen über 60 Gattungen und 700 verschiedene Arten in unterschiedlichen Grössen, Farben, Formen und Oberflächenbeschaffenheiten, bekannt sind. [5] Hefen werden entweder zu den Schlauchpilzen oder zu den Ständerpilzen eingeteilt. [5] Die Diversität der Hefepilze wird anhand der Vielzahl an unterschiedlichen Lebensräumen ersichtlich, an die sich die Hefen im Laufe der Evolution angepasst haben. [16] Am häufigsten kommen sie auf Pflanzenoberflächen, wie Blättern, Blüten und Früchten vor. Dort ernähren sie sich von natürlich ausgeschiedenen Substraten. Aber auch im Boden, im Wasser und sogar in der Luft kommen Hefepilze vor. [15] Neben den nützlichen Hefen gibt es auch solche, welche krank machen können, wenn sie sich z. B. im Darm von Menschen einnisten.

Hefen haben einen grossen industriellen Nutzen. Neben dem Einsatz in der Lebensmittelindustrie ist die Hefe ebenfalls in der Tierfutterindustrie von Bedeutung und spielt in der Gentechnik und der Pharmaproduktion eine wichtige Rolle. Hefe wird zur Herstellung von Impfstoffen verwendet. Auch bei der Produktion von Bioethanol wird Hefe eingesetzt [20].

2.2 Geschichte von Hefe und Gärung

Die Hefepilze gelten als ältester vom Mensch genutzter Mikroorganismus. 5000 Jahre alte Hieroglyphen aus dem alten Ägypten mit Zeichnungen von Brot und alkoholischen Getränken bewiesen, dass bereits zu dieser Zeit die Fähigkeit von Hefen, Alkohol und Kohlenstoffdioxid (CO₂) herzustellen, genutzt wurde, ohne dass die Menschen den Organismus kannten. Die Herstellung von Brot und alkoholischen Getränken zu dieser Zeit war auf die Wirkung

von in den verwendeten Rohstoffen natürlich vorkommenden Wildtyp-Hefen zurückzuführen. Hefe wurde durch Abschöpfen auf der Oberfläche von gebrautem Bier gewonnen, später aus Getreidemaische [20]. Erst mit der Entwicklung des Mikroskops und der Arbeit von Louis Pasteur, der 1857 nachgewiesen hat, dass die Hefe ein lebendiger Organismus ist, konnte die Funktionsweise der Hefe beschrieben werden. Kurze Zeit später wurden bereits Hefen aus der Natur isoliert und für die Herstellung von Lebensmitteln verwendet. [6]

2.3 Taxonomie von Hefepilzen

2.3.1 Morphologische und physiologische Klassifizierung

Früher erfolgte die Einteilung der Hefen vor allem anhand morphologischer Beschreibungen wie Grösse, Farbe, Form und Oberfläche. Diese Kriterien sind aber oft nicht ausreichend, um nahe verwandte Hefen zu unterscheiden, da die Unterschiede dieser Merkmale zwischen den einzelnen Arten zu gering sind. Als weitere Methode werden Hefen nach ihren physiologischen Fähigkeiten unterschieden. [22] Dabei werden die Hefen meist durch Anzucht auf verschiedenen Nährböden auf die Toleranz diverser abiotischer Faktoren wie Temperatur und pH-Wert sowie hinsichtlich ihrer Nährstoffansprüche geprüft.

2.3.2 Art-Identifizierung über die ribosomale DNA

Heute erfolgt die Klassifizierung der Hefen hauptsächlich über DNA-Sequenzvergleiche. Dazu wird häufig eine Sequenz der ribosomalen DNA (rDNA) verwendet. Diese befindet sich im Kernkörperchen im Zellkern. Die rDNA ist in Tandem Repeats (Sequenzwiederholungen) aufgebaut und enthält die Gene für die ribosomale RNA (rRNA). Die Tandem Repeats 18S (Small subunit SSU), 5.8S, 25-28S (Large subunit LSU) und 5S sind die für die Ribosomen codierenden Gen-Sequenzen. Zwischen den codierenden Gensequenzen befinden sich Spacer (Internal transcribed spacer (ITS) zwischen SSU/5.8S/LSU und intergenetic spacer (IGS) zwischen LSU/5S/SSU) [13]. Die Spacer werden aus dem Transkript wieder herausgeschnitten. Grafische Darstellung siehe Abb. 1, Seite 3.

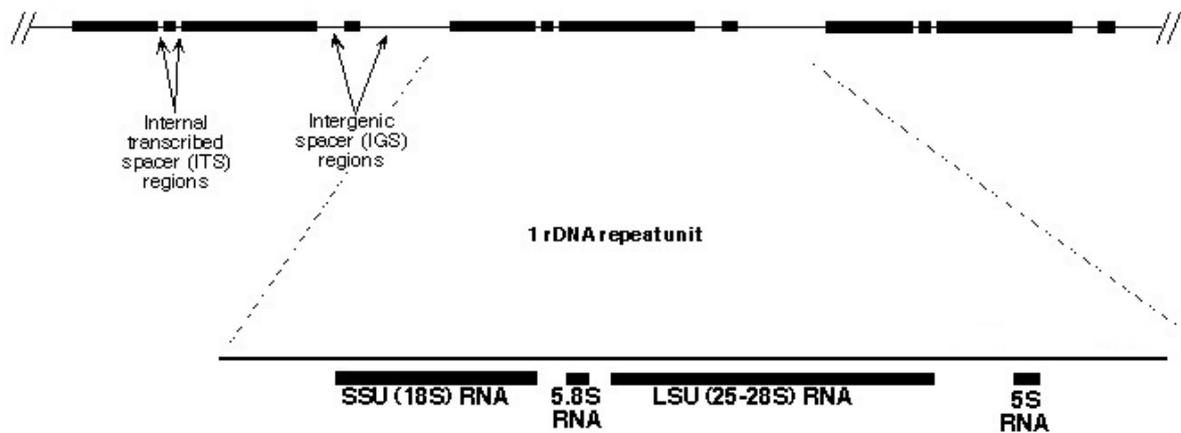


Abbildung 1: Darstellung der rDNA mit den Tandem Repeats. Quelle: [4], leicht verändert

Die Sequenz des 18S rRNA-Gens wird häufig für phylogenetische Untersuchungen verwendet. Grund dafür ist, dass die 18S rDNA hochkonservierte Regionen besitzt, aber trotzdem genug Unterschiede aufweist, um Arten zu identifizieren. Dank den hoch konservierten Regionen können für die Polymerasekettenreaktion (PCR) universelle Primer verwendet werden, um die 18S rDNA erfolgreich zu vervielfältigen [18] [22].

2.4 Stoffwechsel der Hefen

Die Hefen sind in der Lage, zwei verschiedene Stoffwechsel durchzuführen: die Zellatmung und die Fermentation (alkoholische Gärung). Die Hefe ist somit ein fakultativ anaerober Organismus, was bedeutet, dass er bei vorhandenem Sauerstoff Zellatmung betreibt und bei eintretendem Sauerstoffmangel in den anaeroben Stoffwechsel wechselt. Zur Energiegewinnung und für die Zellvermehrung werden Nährstoffe in der Form von bestimmten Zuckern benötigt. Nicht alle in der Natur vorkommenden Zucker können von den Hefen genutzt werden. Weiter ist die Fähigkeit zur Zuckerverwertung je nach Hefeart unterschiedlich [16]. Saccharose wird in den Zellen in Glukose und Fruktose gespalten, die Fruktose wird durch die Enzyme Fructokinase und Aldolase B in Glycerinaldehyd überführt, welches dann als Glycerinaldehyd-3-phosphat in die Glykolyse eingespiessen wird. Galaktose wird über mehrere Stufen mit Enzymen zu Glukose-6-phosphat umgewandelt. Die Zucker werden in der Glykolyse in mehreren Schritten zu Pyruvat (ein C3-Körper) umgewandelt. Dabei werden zwei Moleküle Nicotinamadenin-dinukleotid (NAD) in der oxidierten Form NAD^+ zu zwei Molekülen NADH (reduzierte Form von NAD) reduziert. Pro Glukosemolekül entstehen zwei Pyruvatmoleküle. Bei der Glykolyse werden ebenfalls bereits pro Glukosemolekül zwei Moleküle Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen, was die Hefezelle als chemische Energie nutzen kann. Das Pyruvat wird je nach

Stoffwechselweg unterschiedlich verwendet.

- *Aerober Stoffwechsel*: In Anwesenheit von Sauerstoff wird das Pyruvat im Prozess der oxidativen Decarboxylierung zu Acetyl-CoA oxidiert. Dadurch entsteht die sogenannte aktivierte Essigsäure, die dann in den Citratzyklus eintritt und unter Regeneration von NADH enzymatisch zu Kohlenstoffdioxid (CO_2) oxidiert wird. Anschliessend folgt die Endoxidation, in welcher Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O) reduziert wird. Aus diesem Vorgang gewinnt die Zelle chemische Energie in Form von ATP (Oxidative Phosphorylierung). Bei der Zellatmung können die Nährstoffe effizient verwertet und endoxidiert werden. [7] Vereinfachte, zusammengefasste Gleichung:

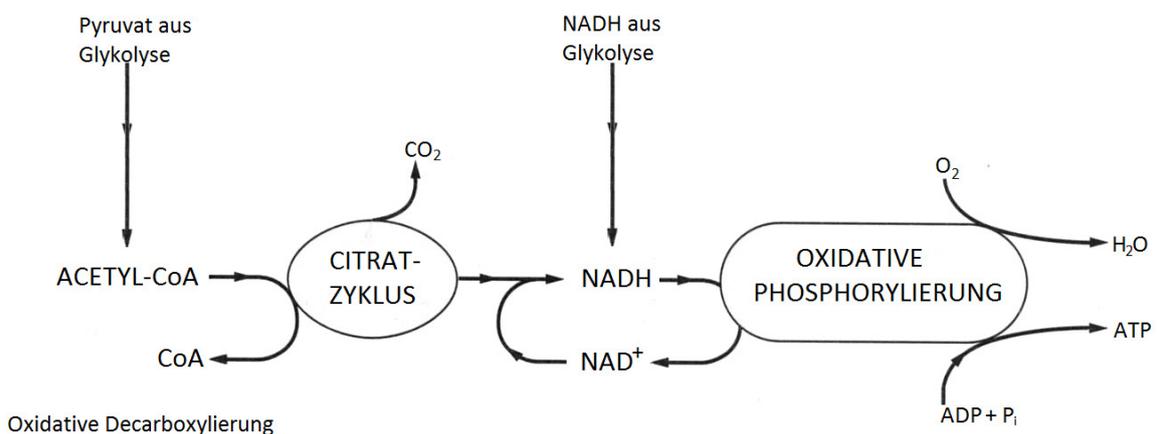
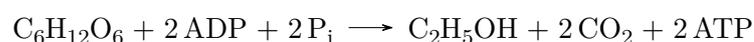


Abbildung 2: Schematische Darstellung des aeroben Stoffwechsels ab oxidativer Decarboxylierung [7]. Nach ALBERTS et al., 1997

- *Anaerober Stoffwechsel (Gärung)*: Bei der Gärung wird Zucker zu Ethanol und CO_2 abgebaut. Das Pyruvat, das aus der Glykolyse stammt, wird zu Ethanol umgebildet. Bei dieser Umbildung wird NADH, das während der Glykolyse entsteht, zu NAD^+ oxidiert, welches dann in der Glykolyse erneut eingesetzt werden kann. So ist es möglich, dass die Zelle auch ohne Sauerstoff ATP bilden kann. [7] Vereinfachte, zusammengefasste Gleichung:



Die Stoffwechselaktivität ist einerseits von der Sauerstoffverfügbarkeit und andererseits von dem Nahrungssubstrat abhängig.

2.5 Wachstum und Zellteilung

Als Wachstum wird die Zunahme an Biomasse einzelner Hefezellen durch Vergrößerung der Zellen vor der Zellteilung einerseits und die Zunahme der Zellzahl einer Hefekultur andererseits bezeichnet. An der Zunahme von Biomasse einer Zelle ist massgeblich die Synthese von Proteinen zum Aufbau von Zellstrukturen in der Hefe beteiligt. Für die Zunahme der Zellzahl ist die an den Zellzyklus gebundene Zellteilung verantwortlich [19]. Das Wachstum der Hefen folgt zu grossen Teilen dem Modell des exponentiellen Wachstums (siehe Abb. 4, Seite 8).

2.5.1 Zellzyklus

Unter optimalen Bedingungen vermehren sich eine Vielzahl der Hefen meist vegetativ, d. h. ungeschlechtlich durch Sprossung. Zunächst bildet die Mutterzelle eine kleine Sprosse aus, die später zur Tochterzelle wird. Während die Sprosse grösser wird, verdoppeln sich die Chromosomen der Mutterzelle, bevor sich der Nukleus der Mutterzelle in zwei Zellkerne aufteilt, von denen der eine in die Sprosse übergeht. Im Anschluss trennt sie sich von der genetisch identischen Mutterzelle durch Knospung. Nach der Trennung besitzt die Tochterzelle eine Geburtsnarbe und die Mutterzelle eine Sprossnarbe. Dort kann kein weiterer Spross gebildet werden [16]. Die Sprossung kann monopolar (an nur einem Zellende), bipolar (an beiden Zellenden) oder multilateral (an der gesamten Zelloberfläche) erfolgen. Es gibt ebenfalls Hefearten, die sich statt durch Sprossung durch Spaltung fortpflanzen. Dabei bildet die Mutterzelle Querwände, welche die Mutterzelle in zwei Zellen aufteilen. Manche Hefen können sich bei ungünstigen Wachstumsbedingungen auch sexuell durch Fusionierung haploider Zellen verschiedener Kreuzungstyps zu einer diploiden Zelle vereinigen. Aus der diploiden Zelle keimen Sporen, woraus wieder haploide Nachkommen erzeugt werden können [7]. Grafische Darstellung siehe Abb. 3, Seite 6.

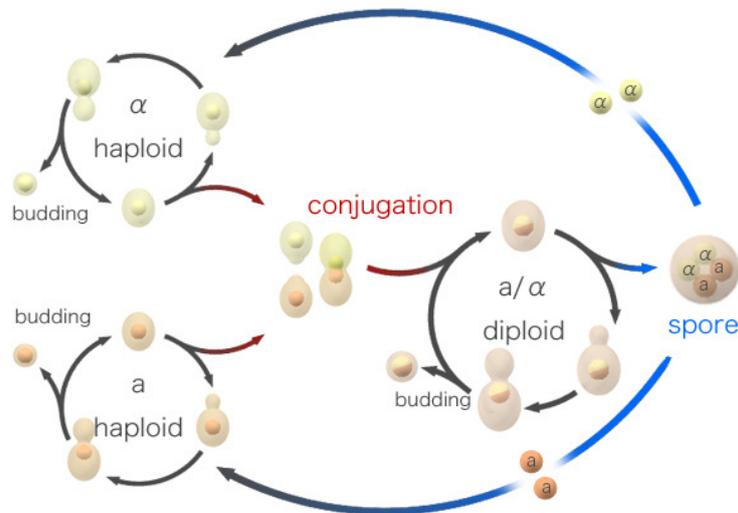


Abbildung 3: Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae* [23]

2.5.2 Wachstumsbedingungen

- *Medium*: Die Hefen benötigen für das Wachstum eine Kohlenstoff- und Energiequelle, meist Zucker. Glukose ist für die Hefe am besten zugänglich. Werden Hefen gezüchtet wird deshalb standardmässig Glukose verwendet. Glukose ist ein Monosaccharid. Neben der Kohlenstoff- und Energiequelle benötigen die Hefen für das Wachstum Stickstoff, Phosphate, Mineralstoffe, Vitamine und Spurenelemente. [7]
- *Sauerstoff*: Während die Hefe beim aeroben Stoffwechsel aus einem Molekül Glukose 38 Moleküle ATP gewinnt, entstehen beim anaeroben Stoffwechsel aus einem Molekül Glukose nur 2 Moleküle ATP [7]. Die Energieausbeute ist beim aeroben Stoffwechsel somit wesentlich grösser. Wenn nicht die Gewinnung von Fermentationsprodukten beabsichtigt wird, sind aerobe Bedingungen für das Wachstum der Hefen viel idealer.
- *Temperatur*: Bei einer Temperatur von 20 - 30 °C wachsen die meisten Hefepilze am besten. Temperatur Ober- und Untergrenzen variieren von Hefe zu Hefe. Ab einer Temperatur von ca. 45 °C beginnen die meisten Hefen ihr Wachstum einzustellen und sterben langsam ab. Bei Temperaturen unter 4 °C wird ihre Stoffwechselaktivität eingestellt.
- *pH-Wert*: Der ideale Wert liegt für die Mehrzahl der Hefen zwischen pH 4,5 und 6,5. Ein Wachstum ist von pH 3-8 möglich. [7]

2.5.3 Wachstumsphasen

Wachsen die Hefen in einem „geschlossenen“ System, d. h. wenn während dem Wachstum weder Nährstoffe hinzugefügt noch Stoffwechselprodukte weggenommen werden, kann das Wachstum in 6 Phasen unterteilt werden:

- A) Lag-Phase: Kommen die Hefen in eine neue Umgebung, müssen sie sich an die neuen Bedingungen anpassen. Die Umstellungen geschehen in der Lag-Phase (Anlaufphase). Je grösser die Unterschiede zwischen den vorherigen und den neuen Bedingungen sind, desto länger dauert diese Phase oder kann ganz wegfallen. In der Lag-Phase findet wenig bis kein Wachstum statt.
- B) Beschleunigungsphase: Die Teilungsgeschwindigkeit nimmt zu. Erste Zellteilungen erfolgen.
- C) Exponentielle Phase: In dieser Phase wächst die Kultur am schnellsten, weist also die höchste Wachstumsrate und die minimale Generationszeit auf.
- D) Verzögerungsphase: Die Wachstumsgeschwindigkeit nimmt mangels Nährstoffangebot bereits wieder ab. Weitere Gründe für den Rückgang der Wachstumsrate sind die hohe Populationsdichte verbunden mit einer Häufung von Abfallstoffen und Sauerstoffmangel.
- E) Stationäre Phase: Die Anzahl Zellteilungen und das Absterben der Zellen halten sich die Waage. Das Wachstum stagniert, die maximale Zellzahlkonzentration ist erreicht. Die Hefen bilden zum Teil Sporen aus.
- F) Absterbephase: Die Lebendzahl nimmt infolge Nährstoffmangel und toxischer Abfallprodukte ab. Es entstehen weniger neue Zellen als absterben.

[5], [21]

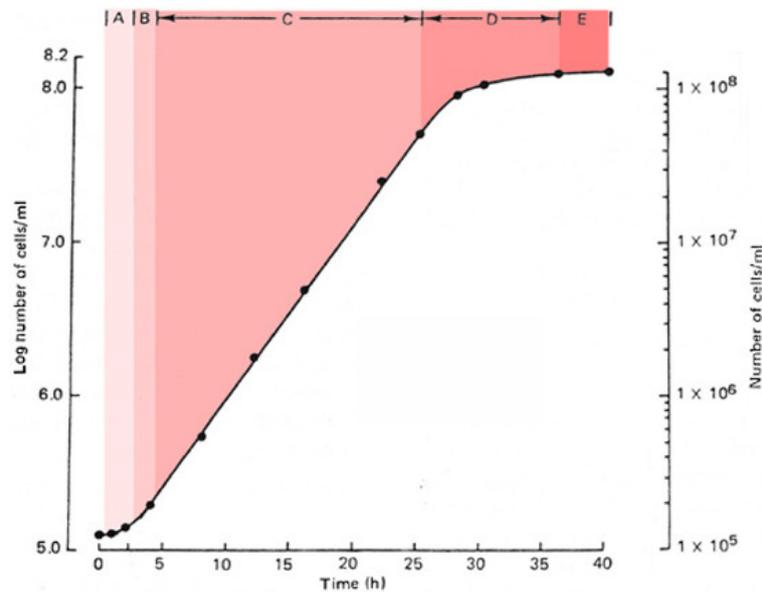


Abbildung 4: Darstellung der beschriebenen Wachstumsphasen anhand einer logarithmierten Wachstumskurve [21]

2.5.4 Definition von Begriffen der photometrischen Wachstumsbestimmung

Extinktion: Das Fotometer misst, wie stark der Lichtstrahl beim Durchdringen der Flüssigkultur geschwächt wird, respektive wie viel Licht absorbiert wird. Dieser Wert wird als Extinktion E bezeichnet. Er ist definiert als der Logarithmus des in die Probe einfallenden Lichts (I_0) geteilt durch das aus der Probe ausfallenden Lichts (I) [25]:

$$E = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

Je grösser der Extinktionswert ist, desto mehr Hefezellen befinden sich folglich im Flüssigmedium, da mehr Licht absorbiert wurde.

Ist die Extinktion höher als 0,7 muss die Probe mit destilliertem Wasser verdünnt werden, um gegenseitige Schattenwürfe der Hefen zu vermeiden, welche die Messresultate verfälschen. Der gemessene Extinktionswert muss dann mit dem Aliquotierungsfaktor multipliziert werden. Der erhaltene Wert wird als *Optical Density Wert (OD-Wert)* bezeichnet [10]. Bei einem Aliquotierungsfaktor von 1 entspricht er logischerweise dem gemessenen Extinktionswert. Der OD-Wert wird mit zunehmender Zellzahl und Zellmasse grösser und ist daher ein relatives Mass für die Zellzahl/Zellmasse.

2.5.5 Mathematische Beschreibung des Wachstums

Das Wachstum von Hefen lässt sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine Zelle sich jeweils in einem gewissen Zeitraum in zwei neue aufteilt (Mitose). Allgemein sieht ein Wachstumsmodell für Hefen wie folgt aus:

$$H(t) = H_0 \times e^{\lambda t}$$

Wobei:

- $H(t)$: Anzahl der Hefezellen zur Zeit t
- H_0 : Anzahl der Hefezellen zu Beginn ($t = 0$)
- λ : Wachstumskonstante
- e : die Eulersche Zahl

Des Weiteren erreicht jede Zelle im Verlauf ihres Wachstums eine bestimmte Masse. Daraus folgt, dass die Zellanzahl sich proportional zur Gesamtzellmasse verhält und es gilt:

$$H(t) \sim MH(t)$$

Wobei:

- $MH(t)$: Gesamtzellmasse zur Zeit t

Da der OD-Wert ein relatives Mass für die Zellzahl/Zellmasse ist, gilt:

$$H(t) \sim MH(t) \sim OD(t)$$

Wobei:

- $OD(t)$: Optische Dichte zur Zeit t

Eine Form zur Modellierung des Wachstums ist die Regression. Die Regression ist eine Ausgleichsrechnung, aus welcher eine Linie resultiert, die eine optimale Annäherung einer Wachstumsfunktion an alle gemessenen Werte darstellt. Das Bestimmtheitsmass (R^2) gibt an, wie gross die Abweichungen der OD-Werte zu der exponentiellen Regression sind. Wäre R^2 gleich 1 würde dies bedeuten, dass sich alle OD-Werte exakt auf der exponentiellen Regression befinden und somit ideal exponentiell nach der Wachstumsfunktion gewachsen wären. [3]

Die Zeit, die für die Verdoppelung der Zellmasse benötigt wird, heisst Verdoppelungszeit. Die Verdoppelungszeit hängt unmittelbar mit der Wachstumsrate zusammen, das heisst, aus beiden Grössen geht die gleiche Aussage bezüglich Wachstum hervor. Deshalb und weil bei der Berechnung der Verdoppelungszeit allfällige Messfehler und negative Werte zu einer Verfälschung führen, wurden die Berechnungen der Verdoppelungszeit nicht in die Arbeit aufgenommen.

3 Zielsetzung und Fragestellungen

Ziel meiner Arbeit ist es, Wildhefen von den ausgewählten Früchten und dem ausgewählten Honig zu isolieren, morphologisch und molekularbiologisch zu bestimmen und das aerobe Wachstum der Hefen in Glukose, Fruktose, Galaktose und Saccharose zu testen, zu analysieren und schliesslich miteinander zu vergleichen und als spezifische Eigenschaft zu beschreiben. Zusätzlich werde ich einen Vergleich mit einer kultivierten Bäckerhefe vornehmen. Aufgrund der Verhalten der Hefen zu den Zuckerarten kann ich die Wildhefen spezifisch charakterisieren und einen Anhaltspunkt bezüglich ihrer Triebkraft erhalten.

Forschungsfragen:

- Wie ist das Wachstum mit den verschiedenen Zuckern und wie schneiden die isolierten Wildhefen im Vergleich zur kultivierten Bäckerhefe ab?
- Kann zwischen den Zuckerarten, die in den Früchten vorkommen und der Besiedelung der Hefen ein Zusammenhang bei der Verwertung dieser Zuckerarten festgestellt werden?
- Können Hefearten isoliert werden, die deutlich vorherrschen und solche, die nur vereinzelt vorhanden sind? Es interessieren vor allem diejenigen Hefen mit der höchsten und diejenigen mit der niedrigsten Häufigkeitszahl. Dies hat zwei Gründe: Einerseits könnte ev. eine Angepasstheit festgestellt werden und andererseits besteht die Möglichkeit, eine seltene Hefeart zu finden.
- Wie sind die stammesgeschichtlichen Verwandtschaftsbeziehungen zueinander?

4 Hypothesen

Isolation der Wildhefen: Es wird angenommen, dass sich auf den Früchten eine grosse Anzahl Hefezellen von verschiedenen Hefearten befinden, da die zuckerhaltigen Oberflächen der Früchte ideale Lebensräume darstellen. Zudem wird angenommen, dass die isolierten Hefen besonders häufig in spontan vergärenden Säften auftreten, und dass einzelne Hefen vorherrschen.

Wachstumsversuch: Die verwendeten Früchte enthielten hauptsächlich Fruktose und Glukose und daneben wenig Saccharose. Es wird daher angenommen, dass:

- Fruktose und Glukose besonders gut von den Wildhefen verwertet werden können und sogar spezifisch nach dem Zuckergehalt der Früchte,
- Saccharose weniger schnell umgesetzt werden kann, da es sich um ein Disaccharid aus Glukose und Fruktose handelt, welches vor der Einspeisung in die Glykolyse enzymatisch

gespalten werden muss,

- Galaktose am schlechtesten verwertet werden kann, da Galaktose über mehrere Stufen umgewandelt werden muss, bevor die Einspeisung in die Glykolyse erfolgen kann,
- dass die Bäckerhefe (Presshefe) alle Zucker tendenziell schneller verwerten kann als die Wildhefen.

5 Material

5.1 Früchte und Honig

Je 1 Kilo der Früchte:

- Apfel (Boskoop)
- Birne (Kaiser Alexander)
- Kaki (Triumph)
- Pfirsich (Red Haven)
- Pflaume (Black Pearl)
- Traube (Dauphine)

100g Blütenhonig

5.2 Laborgeräte

- Saftpresse
- Inkubator
- Kühlschrank und Gefrierschrank
- Analysewaage
- Autoklav (Gerät für die Sterilisation mittels Überdruck und Temperaturerhöhung)
- Vortexmischer
- Schüttler
- Photometer
- Nanodrop Fotospektrometer
- Zentrifuge
- Wärmeblock
- Thermocycler (Gerät zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR))
- Mikrowelle
- Gel-Elektrophoresen-Gerät (Gerät zur Trennung von DNA-Fragmenten)
- Gel-Dokumentationssystem (Sichtbar machen und Fotografieren der Bande)
- Lichtmikroskop

5.3 Labormaterial

- Impföse
- Bunsenbrenner
- Pipetten (1000, 200, 20, 10, 1 Mikroliter) und passende Pipettenspitzen
- Reagenzgläser mit Deckel
- Messzylinder 250 ml
- Bechergläser 250 ml
- Tubes 2 ml
- PCR Tubes 50 Mikroliter
- Handschuhe

5.4 Chemikalien und Lösungen

- Ethanol 70 % und 96 %
- Glukose, Fruktose, Saccharose, Galaktose
- Pepton
- Yeast Extract
- Agarose
- destilliertes Wasser und entionisiertes Wasser
- 200mM Lithiumacetat 1% Natriumlaurylsulfat-Lösung (LiOAC,1%SDS-Lösung)
- Taq-Puffer 10X
- Taq-Polymerase
- Primer NS1 und NS 2
- Nukleotide (dNTP)
- TAE-Puffer 0.5X
- Ethidiumbromid
- Loading Dye
- Bäckerhefe in der Form von Presshefe

5.5 Flüssigmedien

- YEPD-Medium
Auf 1 Liter Volumen: 950ml Destilliertes Wasser, 24 g Bacto Agar, 20 g Bacto Pepton, 10 g Yeast Extract, 50 ml 40 % (w/v) Glukose-Lösung
- YEP-Flüssigmedien
Glukose: 20 g Pepton, 20 g Glukose, 10 g Yeast Extract, 1000 ml Wasser
Fruktose: 20 g Pepton, 20 g Fruktose, 10 g Yeast Extract, 1000 ml Wasser

Saccharose: 20 g Pepton, 20 g Saccharose, 10 g Yeast Extract, 1000 ml Wasser

Galaktose: 20 g Pepton, 20 g Galaktose, 10 g Yeast Extract, 1000 ml Wasser

5.6 DNA-Aufreinigungs-Kit

- QIAquick® PCR Purification Kit

5.7 Online Analyseprogramme

- Vergleich Sequenzen:
Basic Local Alignment Search Tool (Blast)
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Bearbeitung Sequenzen:
<http://www.bioinformatics.org>
- Erstellung Stammbaum:
www.phylogeny.fr
- Software zum Nanodrop-Fotospektrometer:
<http://www.nanodrop.com>

6 Methoden

6.1 Herkunft, Isolation und Reinkulturgewinnung von Wildhefen

Zur Gewinnung der Wildhefen wurden Fruchtsäfte von Äpfeln (Iffwil, CH), Birnen (Herkunft Kanton Wallis, CH), Kaki (Herkunft Israel), Pfirsichen (Herkunft Spanien), Pflaumen (Herkunft Südafrika) und Trauben (Herkunft Südafrika) sowie Blütenhonig vom Gymnasium Neufeld verwendet. Die Auswahl der Früchte erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Gehalt der verschiedenen Zucker
- verschiedene Herkunftsorte

,

Tabelle 1: Zuckergehalte Früchte pro 100g [9]

Früchte	Fruktose in g	Glukose in g	Saccharose in g
Apfel	5.74	2.04	2.55
Birne	6.75	1.67	1.81
Kaki	8.00	7.04	0.96
Pfirsich	1.24	1.04	5.73
Pflaume	2.02	3.38	3.39
Traube	7.63	7.33	0.44

6.1.1 Vorbereitung Fruchtsäfte und Honigwasser

Aus den ungewaschenen Früchten, die aus einem konventionellen Anbau stammten, wurde mit einem Entsafter je 250 ml Fruchtsaft gewonnen. Die Fruchtsäfte wurden je in einen 1-Liter Glasbehälter abgefüllt. Die Deckel der Gläser wurden locker aufgelegt, damit keine Verunreinigung des Safts entstehen, jedoch von den Wildhefen produziert CO₂ austreten konnte. Die Säfte wurden vier Tage lang bei 21 °C - 22 °C stehen gelassen, damit eine spontane Gärung einsetzen konnte. Der Blütenhonig wurde im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und während 14 Tagen bei 21 °C angesetzt. Anschliessend folgte eine mikroskopische Untersuchung der Säfte resp. des Honigwassers. Mit zehnfach- und vierzigfacher Vergrößerung wurde das Vorkommen einzelner Wildhefen festgestellt.

6.1.2 Isolation der Hefen

Von den spontan gärenden Fruchtsäften wurde je ein Dreiösenausstrich auf eine separate Yeast-Extract-Pepton-Dextrose-Agarplatte (YEPD-Agarplatte), die aus 1% Yeast Extract, 2% Pepton und 2% Glukose bestand, vorgenommen. Die YEPD-Agarplatten dienen als Nährmedium für die im ausgestrichenen Fruchtsaft enthaltenen Wildhefen. Danach wurden die Platten für 24 h bei 30 °C inkubiert. Aus zeitlichen Gründen wurden für die weiteren Versuche nur drei morphologisch möglichst verschiedene und gut entwickelte Hefen ausgewählt.

6.1.3 Reinzuchtgewinnung der Hefen

Von den drei ausgewählten Hefen wurde je die optisch am besten entwickelte Kolonie mit einer Impföse abgenommen und auf einer neuen Agarplatte mit einem Dreiösenausstrich ausgestrichen. Dieses Vorgehen wurde solange wiederholt, bis die Hefen von Bakterien befreit und in einer absolut reinen Form auf den Agarplatten vorlagen. Die isolierten Hefen wurden

nach ihren Früchten benannt (z. B. Hefe von der Frucht Kaki = H-Kaki). Bei 6 °C konnten die Hefen zwischengelagert werden.

6.2 Morphologische Charakterisierung

Die morphologischen Merkmale wurden mit blossem Auge und mit einem Lichtmikroskop bei bis zu 100facher Vergrößerung festgestellt. Die Hefen wurden nach folgenden Kriterien beurteilt:

- Farbe
- Form
- Grösse
- Vermehrungsart (polare, bipolare oder multilaterale Sprossung oder Spaltung)

6.3 Wachstumsversuch der Wildhefen in Glukose, Fruktose, Galaktose und Saccharose

Das Wachstum der isolierten Wildhefen H-Kaki, H-Birne und H-Pflaume wurde in Flüssigmedien mit den verschiedenen Zuckerarten Glukose, Fruktose, Galaktose (drei Monosaccharide) und Saccharose (ein Disaccharid) während der Dauer von 6 Stunden getestet. Mit kultivierter Bäckerhefe wurde der gleiche Test vorgenommen, um einen Vergleich mit den Wildhefen zu erhalten.

6.3.1 Herstellung und Vorbereitung der Flüssigkulturen

In vier 500 ml Erlenmeyerkolben wurden vier verschiedene Flüssigmedien mit einer Endkonzentration von 1 % Yeast Extract, 2 % Pepton und 2 % des entsprechenden Zuckers hergestellt und anschliessend mittels Autoklavierung bei 121 °C sterilisiert. Wie in der Tabelle 2 dargestellt, wurden danach 16 Plastikreagenzgläser mit 10 ml des entsprechenden Flüssigmediums und einer halben Impföse voll der entsprechenden Hefe befüllt.

Tabelle 2: Befüllung der Reagenzgläser (RG) mit Hefe und Flüssigmedien

	Glukose	Fruktose	Saccharose	Galaktose
H-Birne	RG 1	RG 5	RG 3	RG 4
H-Kaki	RG 2	RG 6	RG 7	RG 8
H-Pflaume	RG 3	RG 7	RG 11	RG 12
Bäckerhefe	RG 4	RG 8	RG 15	RG 16

Die Reagenzgläser wurden mit einem lockeren Deckel abgedeckt, um eine Verunreinigung der Flüssigkultur zu vermeiden und den Zugang des für das Wachstum der Hefen benötigten Sauerstoffs trotzdem sicherzustellen.

6.3.2 Inkubation der Flüssigkulturen

Die Flüssigkulturen wurden in der Reihenfolge 1 Glukose, 2 Fruktose, 3 Saccharose, 4 Galaktose in Abständen von 5 Min. gestaffelt für die Dauer des gesamten Wachstumsversuchs von 6 Stunden im Schüttler inkubiert.

6.3.3 Photometrische Wachstumsbestimmung

Das Wachstum der Wildhefen in den verschiedenen Zuckern wurde photometrisch bestimmt. Die erste Messung erfolgte beim Start des Versuchs und dann in exakt stündlichen Abständen. Zu Beginn der Messungen war immer eine Küvette mit dem Flüssigmedium, dessen entsprechende Flüssigkulturen danach gemessen wurden, in die Messkammer des Photometers eingesetzt worden, um den Leerwert zu ermitteln, der dann bei der Messung in Abzug gebracht wurde. Für die Messungen wurde im Inkubator je 1 ml der Flüssigkulturen aus den Plastikreagenzgläser in Küvetten überführt, die danach in die Messkammer des Fotometers gestellt wurden. Bei der Messung geht ein monochromatisches Licht von 600 nm Wellenlänge durch die Flüssigkulturen in der Küvette. Der gemessene Extinktionswert wurde aufgeschrieben. Bei einem Extinktionswert grösser als 0.7 wurde die Probe mit destilliertem Wasser (ddH₂O) verdünnt. Der gemessene Extinktionswert musste dann mit dem Aliquotierungsfaktor multipliziert werden, um den OD-Wert zu erhalten.

6.3.4 Mathematische Beschreibung des Wachstums

Die mathematische Beschreibung erfolgte mit einem Regressionsmodell, das im Programm Microsoft Excel erstellt wurde. Durch die automatische Funktion Trendlinie wurden die Parameter H_0 sowie die Wachstumskonstante λ automatisch gesetzt. Die *Wachstumsrate je Zeiteinheit* wurde aus der Wachstumskonstante berechnet und beträgt: e^λ

Mit der Wachstumsrate je Zeiteinheit wird angegeben, um welchen Faktor der OD-Wert pro Zeiteinheit wächst. Die unterschiedlichen OD-Anfangswerte spielen bei der Regression keine Rolle, da nur die Steigung relevant ist. Einzelne vorhandene Messfehler wirken sich nicht in relevanter Weise aus. Hat die Wachstumskonstante und damit auch die Wachstumsrate einen grossen Wert, ist die Steigung der Regression und somit die der einzelnen OD-Werte gross und das Wachstum schnell. Bei einer kleinen Steigung ist die Wachstumsgeschwindigkeit

entsprechend langsam. Die Länge der Lag-Phase kann bei einer möglichen Verwendung der Hefen von grosser Bedeutung sein. Deshalb wird diese Phase in die Berechnungen einbezogen.

6.4 Molekularbiologische Bestimmung der Wildhefestämme

6.4.1 Extraktion der genomischen DNA (gDNA)

Für die DNA-Extraktionen wurden die Wildhefen H-Kaki, H-Birne und H-Pflaume von den entsprechenden Glukoseflüssigkulturen entnommen. Die gDNA-Extraktion erfolgte gemäss dem Protokoll von BioTechniques [8] (siehe Anhang III), welche ein einfaches und kostengünstiges Verfahren zur DNA-Isolation entwickelt haben. Die extrahierte DNA wurde dann als Template (Vorlage für die PCR) bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

6.4.2 Qualitäts- und Mengemessung der DNA

Die Reinheit der DNA und die Menge der DNA in ng pro Mikroliter wurde mit dem Nanodrop-Fotospektrometer und der dazugehörigen Software gemessen.

6.4.3 Amplifizierung eines Abschnitts des 18s rRNA Gens mit einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als Vortest und zur Evaluation der Primerpaare wurden mit den Wildhefen H-Kaki, H-Birne und H-Pflaume je zwei PCR durchgeführt; einmal mit dem Primerpaar NS1 (forward primer) und NS2 (reverse Primer) und einmal mit dem Primerpaar NS2 (forward primer) und NS8 (reverse Primer). Mit der definitiven PCR wurden von den Wildhefen H-Kaki, H-Birne und H-Pflaume je 640 Basenpaare der SSU (small-subunit) der ribosomalen DNA mit den Primern NS1 und NS2 amplifiziert. Hierfür wurde ein Mastermix mit allen benötigten Reaktanden für drei PCR hergestellt und danach auf drei PCR-Tubes verteilt. Bei allen drei Reaktionen wurde der PCR-Ansatz von 25 Mikroliter gemäss Tabelle 3 verwendet und die PCR's gemäss dem Programm auf Tabelle 4 durchgeführt.

Tabelle 3: PCR-Ansatz 25 Milliliter

PCR-Ansatz (25ul)	Menge
gDNA	1 μ L
Taq-Polymerase	2.5 μ L
Taq-Puffer	1 μ L
Primer NS1	1 μ L
Primer NS2	0.5 μ L
dNTPs	0.5 μ L
ddH ₂ O	18.5 μ L

Tabelle 4: PCR-Programm, gemäss Absprache mit Prof. Dr. Ochsenreiter

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	95 °C	2 Min.	1
Denaturierung	95 °C	30 Sek.	31
Anealing	55 °C	30 Sek.	
Elongation	72 °C	1 Min.	
Endelongation	72 °C	10 Min.	1
Lagerung	4 °C	inf.	-

6.4.4 Gel-Elektrophorese der PCR-Produkten

Mit einer Gel-Elektrophorese wurde getestet, ob die PCR funktioniert hat, und ob genügend DNA amplifiziert wurde. Dazu wurde ein 1%-Agarose-Gel aus 50 ml 0.5X TAE-Puffer und 0.5 g Agarose auf einen Träger gegossen. Für jedes PCR-Produkt wurden 4 Mikroliter ddH₂O mit 1 Mikroliter des PCR-Produkts mit ungefähr 3 Mikroliter Ladepuffer versetzt und in die Aussparungen im Gel pipettiert. In eine weitere Aussparung wurde ein DNA-Marker mit 600 Basenpaaren zum anschliessenden Vergleichen pipettiert. Bei 120 Volt (V) wurden die DNA-Fragmente der PCR-Produkte während 25 Min. in dem Gel laufen gelassen. Die negativ geladene DNA wanderte zum Pluspol. Das Gel wurde anschliessend 20 Min. in Ethidiumbromid gelegt, um in der Folge die DNA in der Gel-Dokumentationskammer unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die Gel-Banden wurden danach fotografiert.

6.4.5 Aufreinigung des PCR-Produkts

Die PCR-Produkte von H-Kaki, H-Birne und H-Pflaume wurden mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte gemäss *Quick-StartProtocol* der Firma Qiagen, Anhang IV [11].

6.4.6 Sequenzierung des aufgereinigten PCR-Produktes

Zwei Tubes wurden mit je einem unterschiedlichen Primer (N1 und N2), 15 ml ddH₂O und mit 100 ng der DNA befüllt und der Firma Mikrosynth, Bern zum Sequenzieren mittels Kapillarelektrophorese geschickt.

6.4.7 Sequenzbearbeitung

Die Sequenzen forward und reverse wurden auf der Website von bioinformatics [12] bearbeitet, indem von der Sequenz NS2 das Reverse Complement (rückwärts und mit komplementären Basen geschrieben) ermittelt und in der Folge die Sequenzen übereinstimmend zusammengefügt wurden.

6.4.8 Artbestimmung und Stammbaum von H-Birne, H-Kaki und H-Pflaume

Die bearbeiteten Sequenzen wurden auf der Webseite Blast [2] hochgeladen. Der Algorithmus von Nucleotidblast verglich die Sequenzen mit der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) und ordnete die Sequenzen der Wildhefen der bereits in der Datenbank gespeicherten Sequenzen nach prozentualer Übereinstimmung zu. Mit dem Algorithmus der Website www.pylogeny.fr [14] wurde ein Stammbaum erstellt.

7 Resultate

7.1 Isolation und Auswahl der Wildhefen

Zwei bis vier Tage nach der Herstellung der Fruchtsäfte setzte die spontane Gärung bei allen Säften ein (aufsteigende CO₂-Bläschen). Beim Honigwasser war auch nach zwei Wochen keine Gärung sichtbar.

Die Mikroskopierung der Säfte respektive des Honigwassers, welche vier Tage nach dem Ansetzen vorgenommen wurde, und die Kultivierung fielen wie folgt aus:

Apfelsaft:

- Zwei Tage nach dem Ansetzen des Saftes Schimmelpilzbefall auf der Oberfläche.
- Keine Hefen im Saft sichtbar.
- Auf Agarplatte überwiegend schleimige Bakterien. Dazwischen einzelne Hefepilze.

Birnensaft:

- Vereinzelt eine Hefe im Saft sichtbar.
- Hefe auf Agarplatte sehr gut gewachsen. Beim ersten Dreiösenausstrich noch einzelne Bakterien vorhanden. Nach dem zweiten Dreiösenausstrich Reinkultur, ohne Bakterien, erreicht.

Kakisaft:

- Vereinzelt eine Hefe im Saft sichtbar.
- Hefe auf Agarplatte sehr gut und bakterienfrei gewachsen.

Pflaumensaft:

- Einige Hefen im Saft sichtbar; morphologisch nicht unterscheidbar.
- Hefe auf Agarplatte sehr gut gewachsen. Beim ersten Dreiösenausstrich noch einzelne Bakterien vorhanden. Nach dem zweiten Dreiösenausstrich in Reinkultur.

Pfirsichsaft:

- Ein Tag nach dem Ansetzen des Saftes starker Schimmelpilzbefall.
- Keine Hefen im Saft sichtbar.
- Auf Agarplatte nur Bakterien gewachsen. Keine Hefepilze gewachsen.

Traubensaft:

- Vereinzelt eine Hefe im Saft sichtbar.
- Hefen auf Agarplatte sehr dünn und in unmittelbarer Nähe von Bakterien gewachsen.

Honigwasser:

- Keine Hefen im Honigwasser sichtbar.
- Agarplatte blieb leer.

Die Hefen aus dem Apfel- und Traubensaft wurden für die weiteren Versuche nicht mehr berücksichtigt. Die aus dem Birnensaft isolierte Hefe wurde H-Birne, die aus dem Kakisafte H-Kaki und die aus dem Pflaumensaft H-Pflaume benannt.



Abbildung 5: Isolierte Hefekulturen auf YEPD-Agarplatten von H-Birne (oben links), H-Kaki (unten) und H-Pflaume (oben rechts) vom 27.06.16.

7.2 Morphologische Charakterisierung

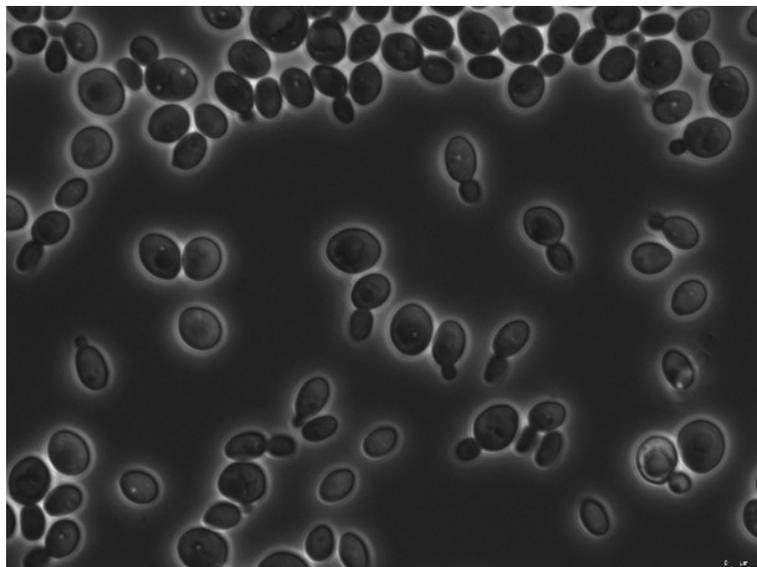


Abbildung 6: H-Birne: 100fache Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop.

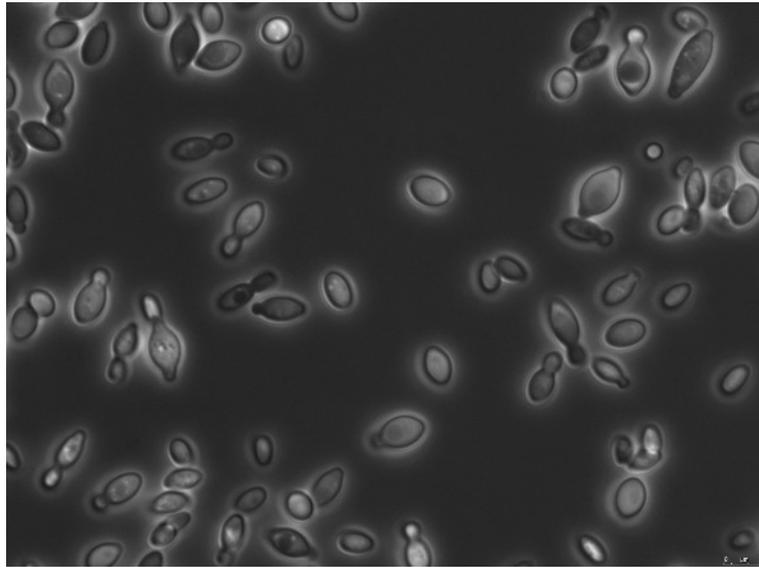


Abbildung 7: H-Kaki: 100fache Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop.

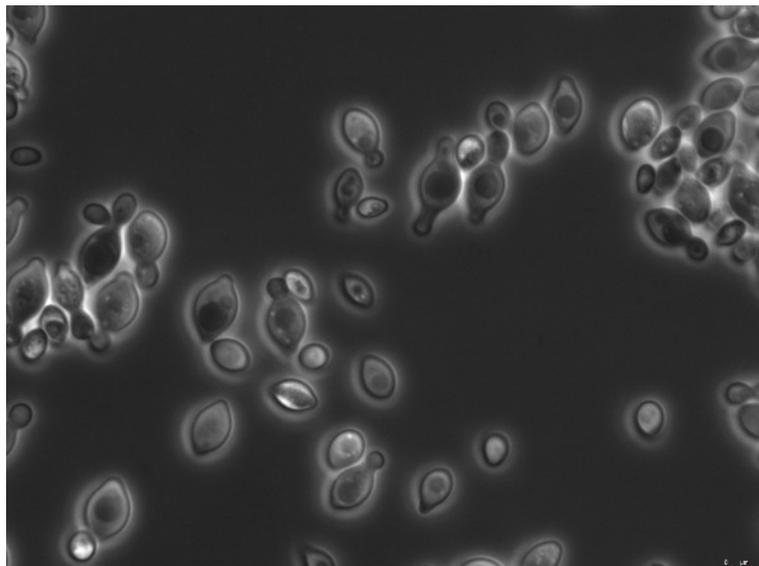


Abbildung 8: H-Pflaume: 100fache Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop.

Tabelle 5: Morphologische Charakterisierung

Hefe	Farbe	Form	Grösse in /micro/meter	Vermehrungsart
H-Birne	weiss	rund	ca. 5-7	multilaterale Sprossung
H-Kaki	beige	länglich, zugespitzt (zitronenförmig)	ca. 3-5	bipolare Sprossung
H-Pflaume	beige	länglich, zugespitzt (zitronenförmig)	ca. 3-5	bipolare Sprossung

7.3 Wachstumsversuch

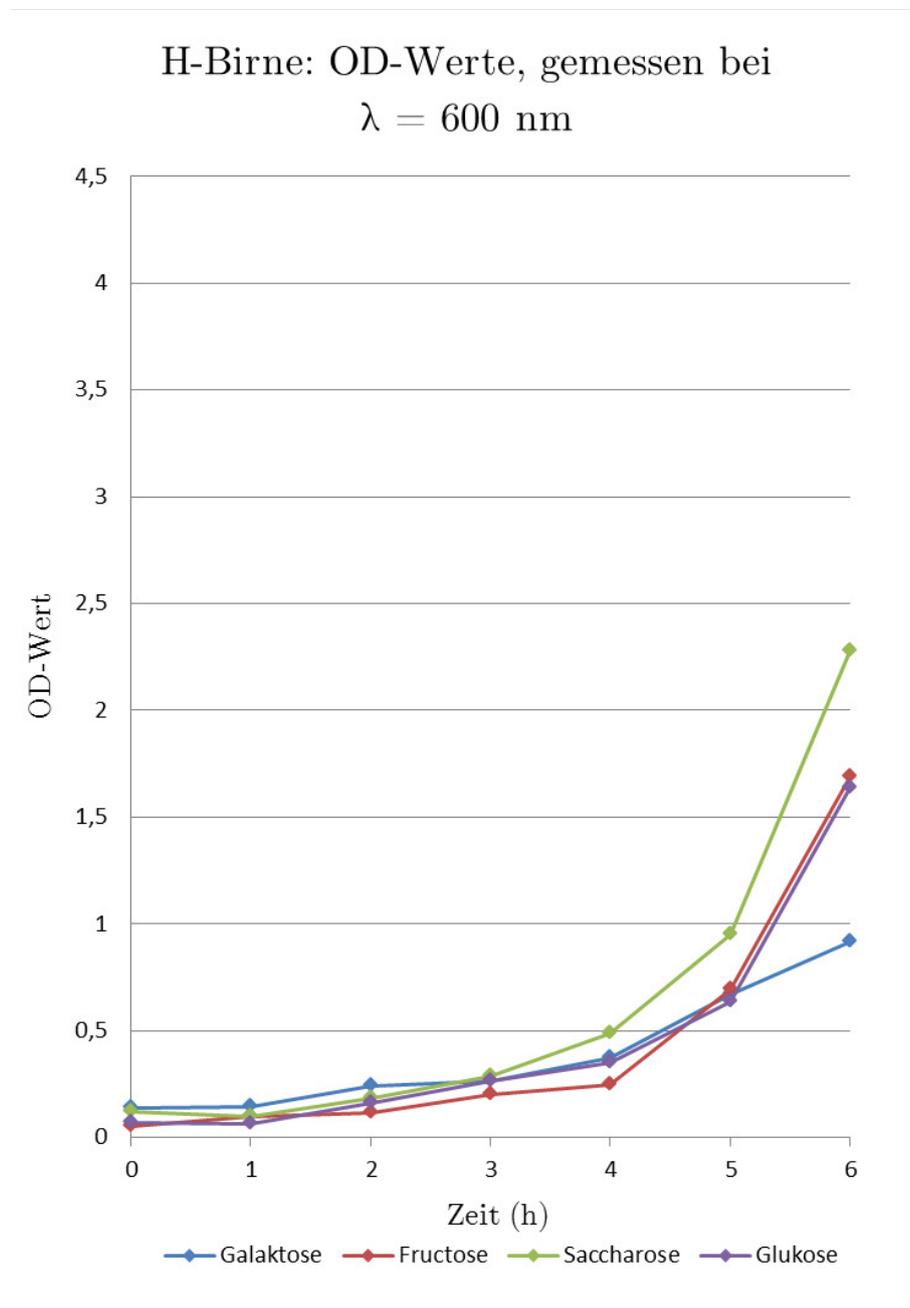


Abbildung 9: Wachstumskurve H-Birne

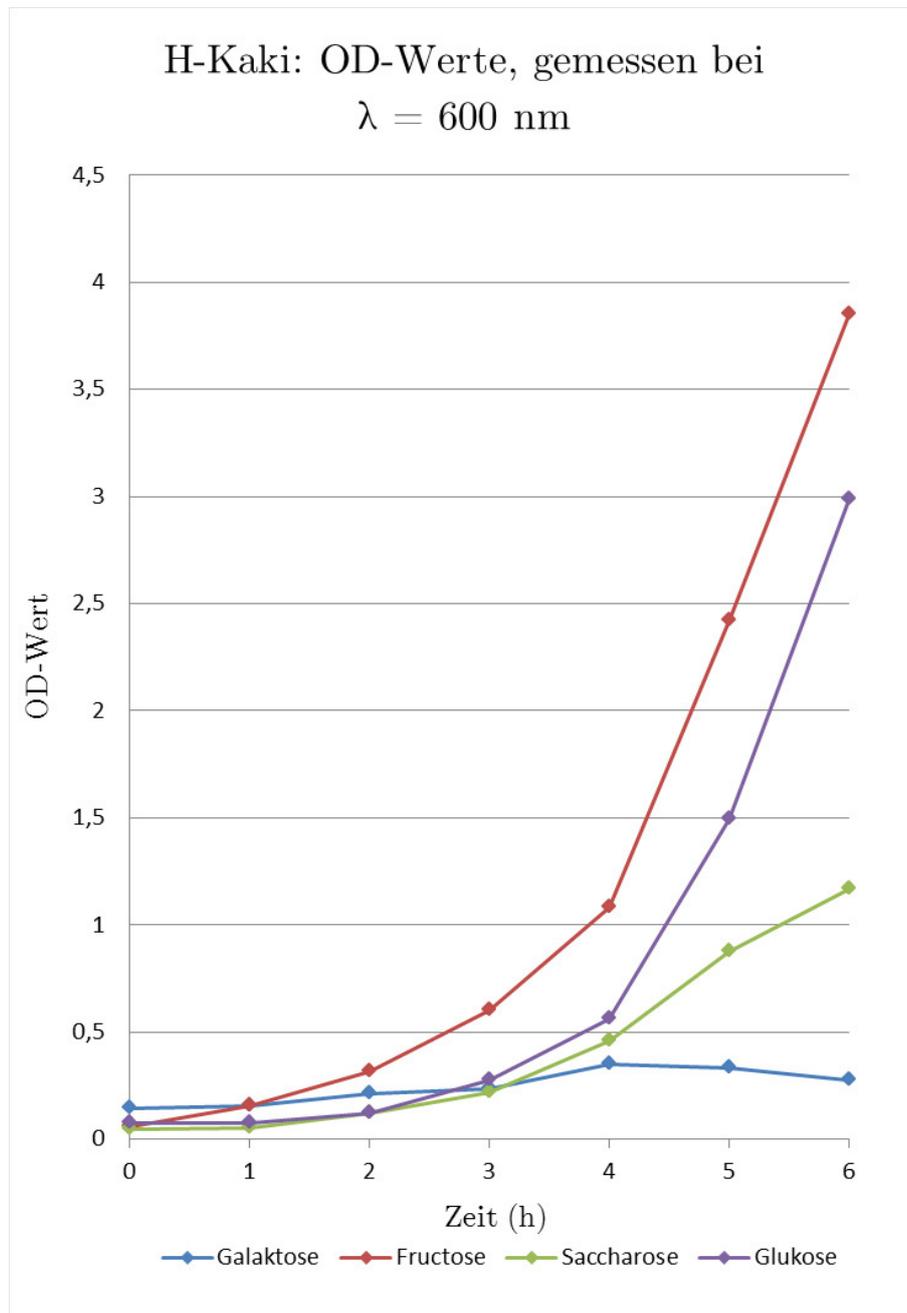


Abbildung 10: Wachstumskurve H-Kaki

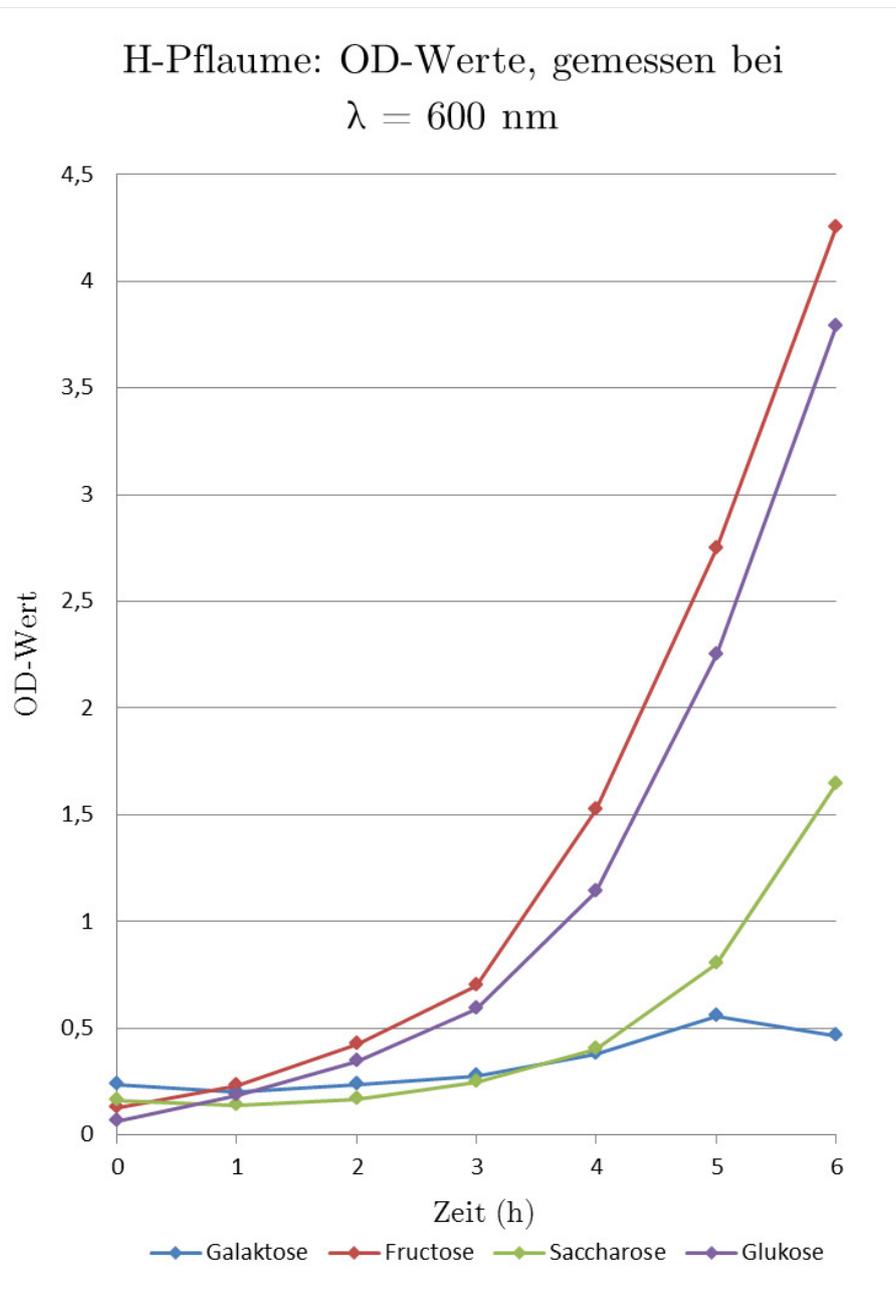


Abbildung 11: Wachstumskurve H-Pflaume

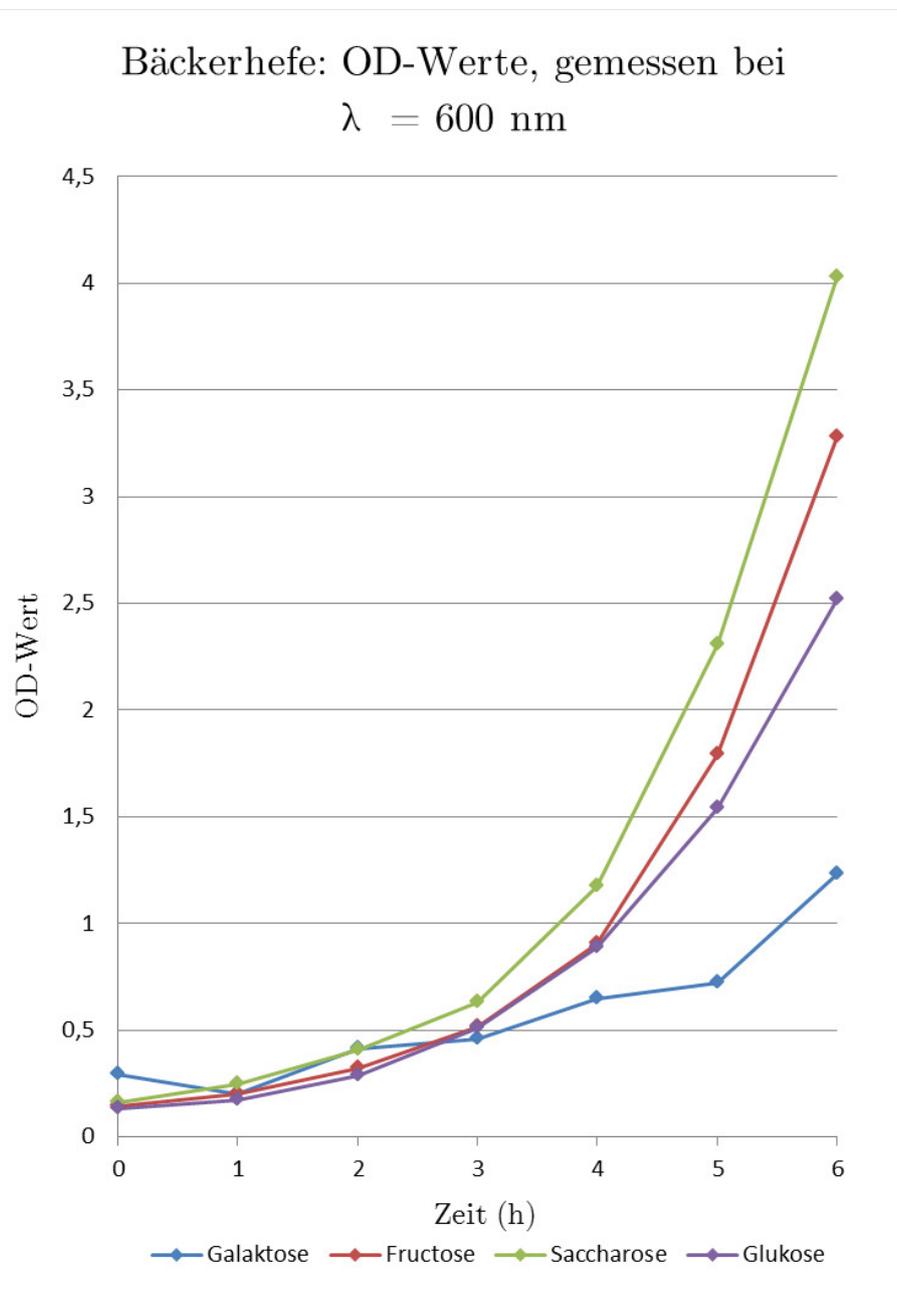
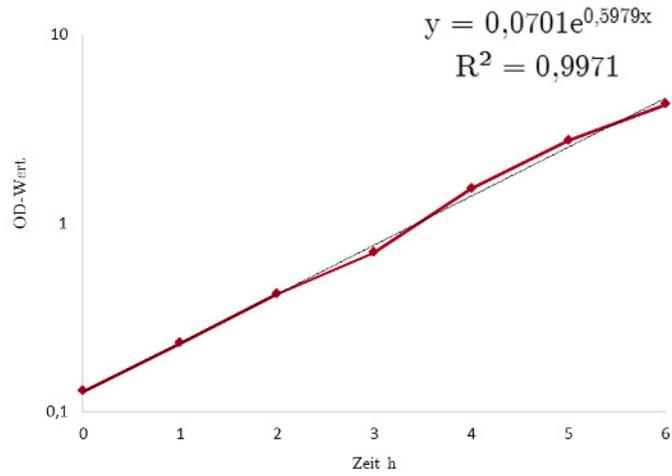
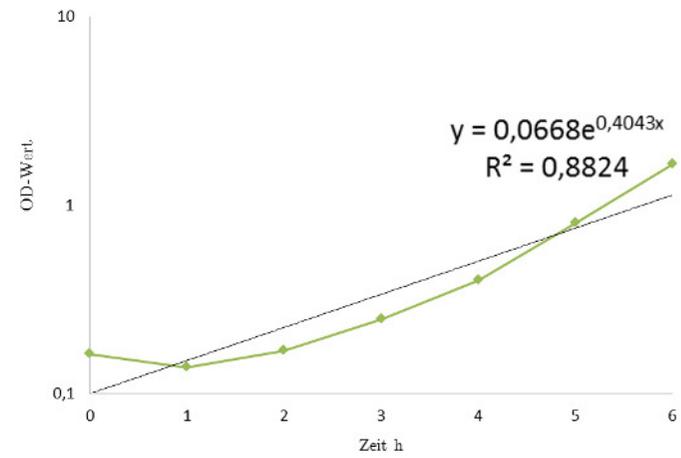


Abbildung 12: Wachstumskurve Bäckerhefe

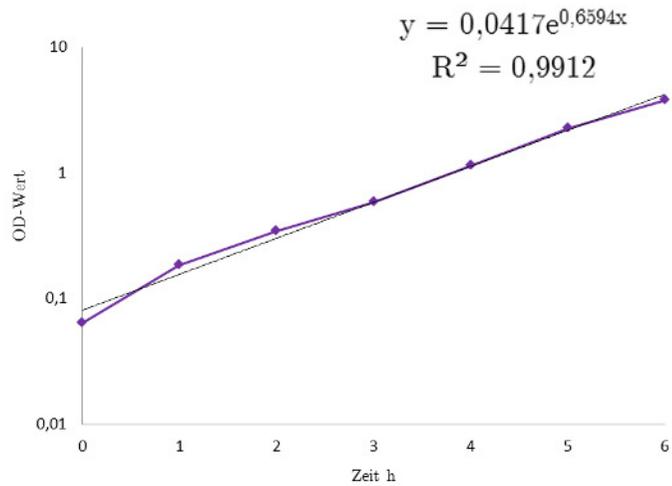
Regression der OD-Werte von H-Pflaume, gewachsen in Fruktose



Regression der OD-Werte von H-Pflaume, gewachsen in Saccharose



Regression der OD-Werte von H-Pflaume, gewachsen in Glukose



Regression der OD-Werte von Pflaume, gewachsen in Galaktose

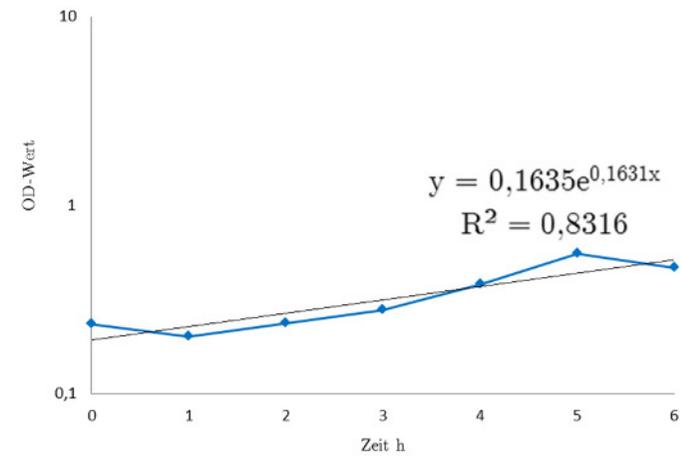


Abbildung 13: Wachstum H-Pflaume Regressionsmodell in logarithmischer Skala

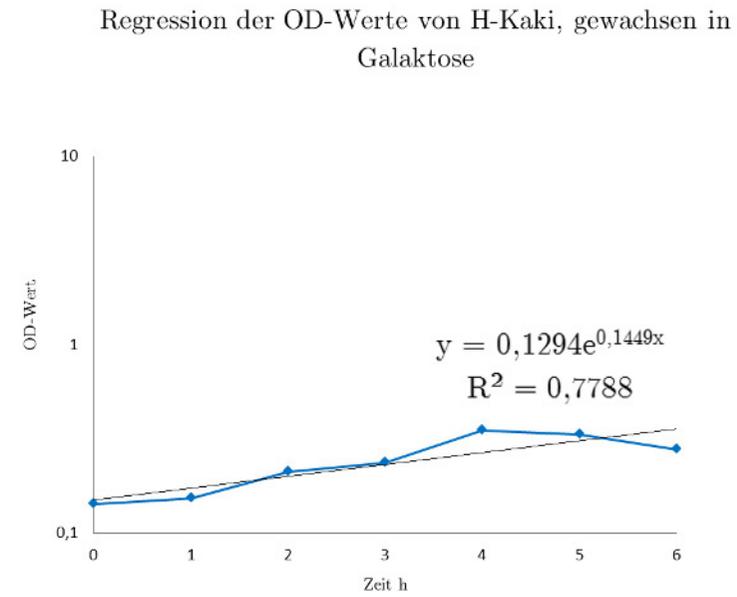
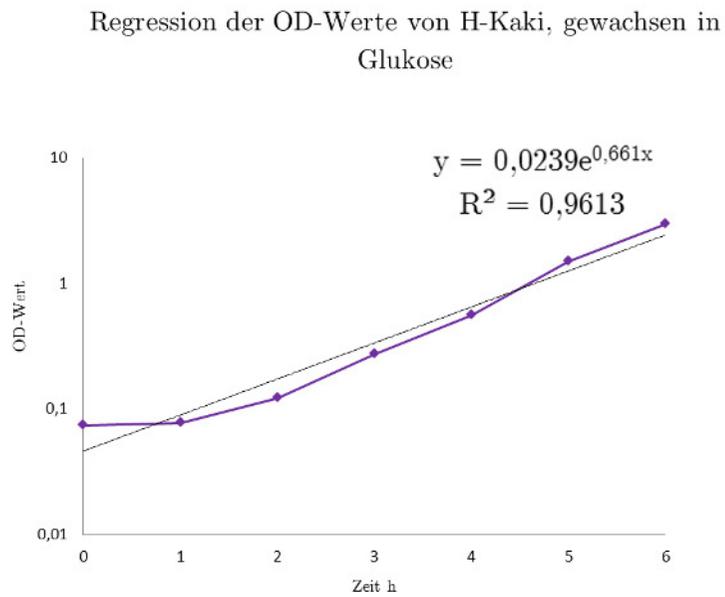
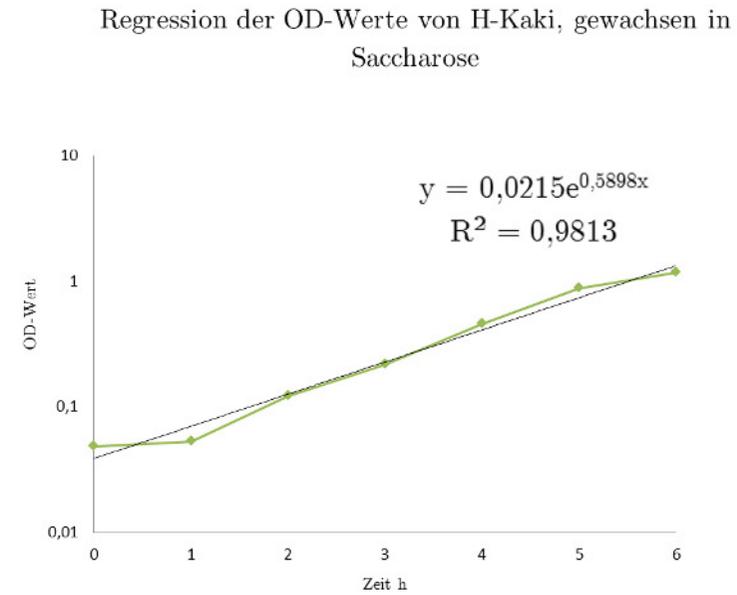
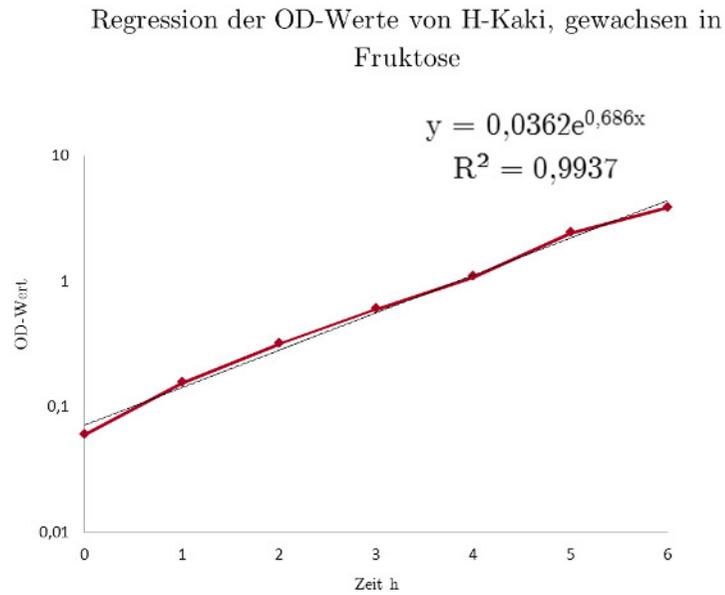
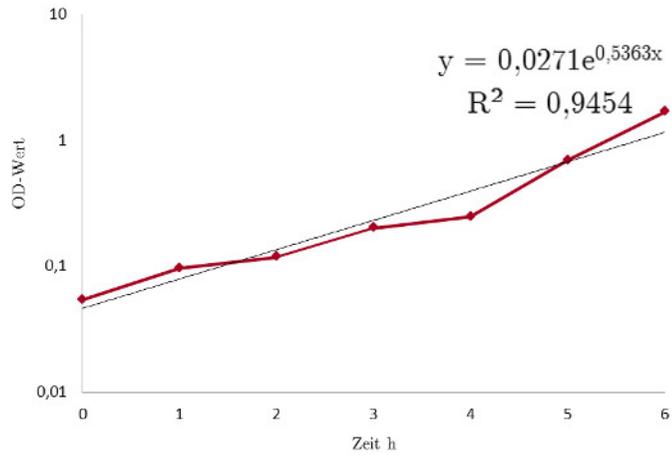
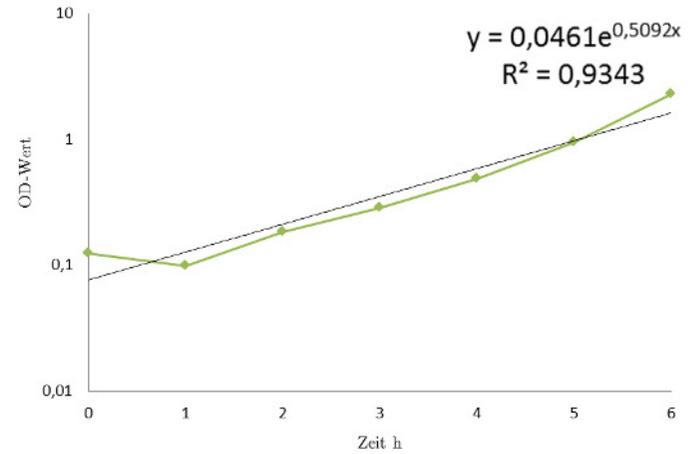


Abbildung 14: Wachstum H-Kaki Regressionsmodell in logarithmischer Skala

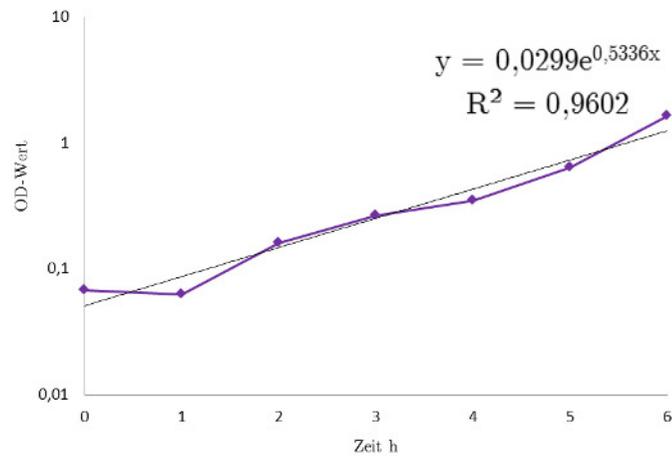
Regression der OD-Werte von H-Birne, gewachsen in Fruktose



Regression der OD-Werte von H-Birne, gewachsen in Saccharose



Regression der OD-Werte von H-Birne, gewachsen in Glukose



Regression der OD-Werte von H-Birne, gewachsen in Galaktose

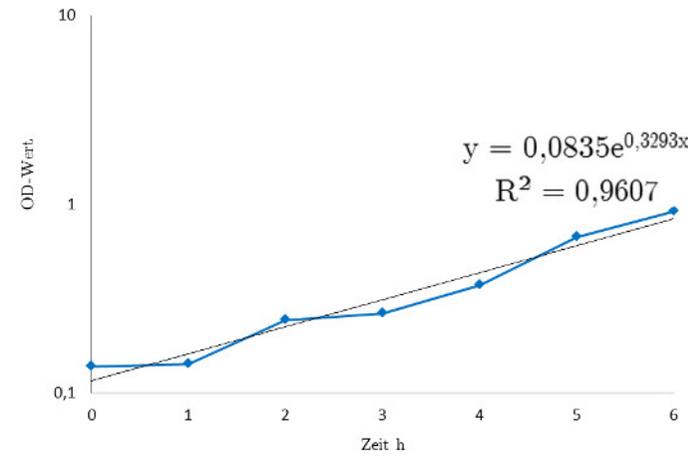
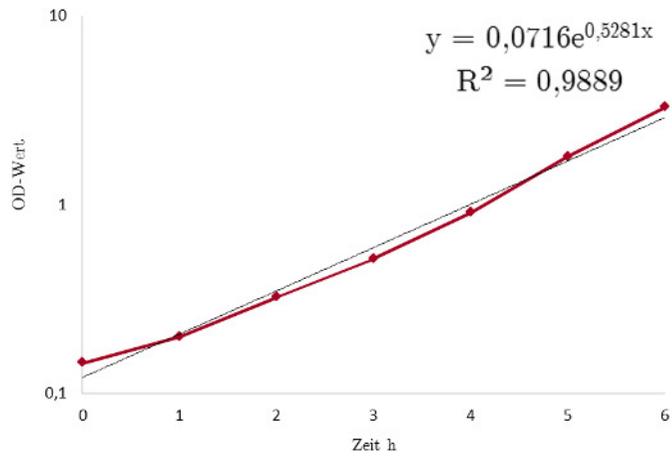
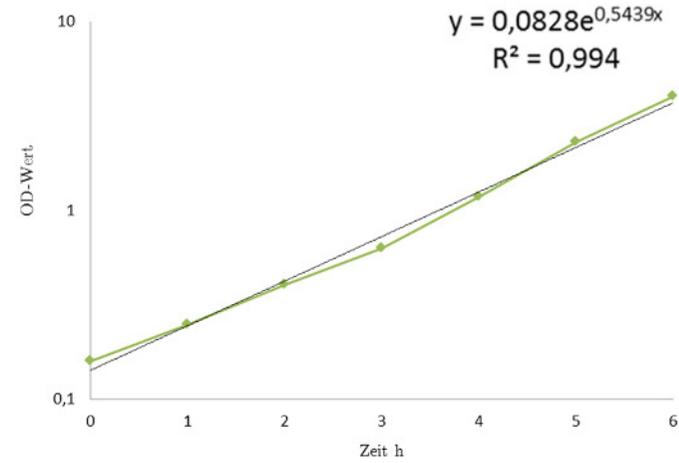


Abbildung 15: Wachstum H-Birne Regressionsmodell in logarithmischer Skala

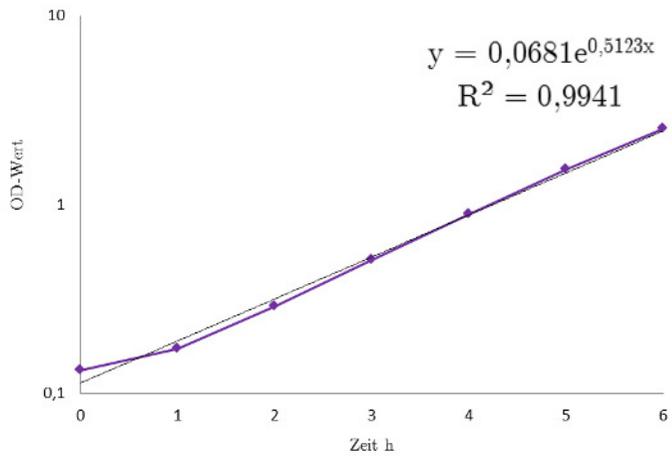
Regression der OD-Werte von Bäckerhefe, gewachsen in Fruktose



Regression der OD-Werte von Bäckerhefe, gewachsen in Saccharose



Regression der OD-Werte von Bäckerhefe, gewachsen in Glukose



Regression der OD-Werte von Bäckerhefe, gewachsen in Galaktose

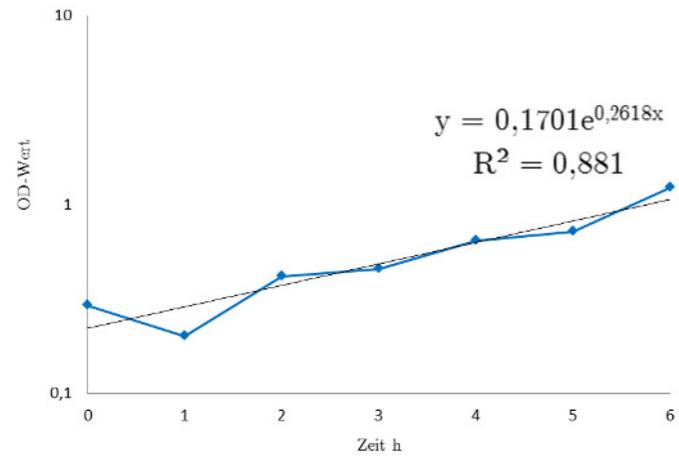


Abbildung 16: Wachstum Bäckerhefe Regressionsmodell in logarithmischer Skala

Wachstumsrate pro Stunde von H-Kaki ermittelt
durch Regression

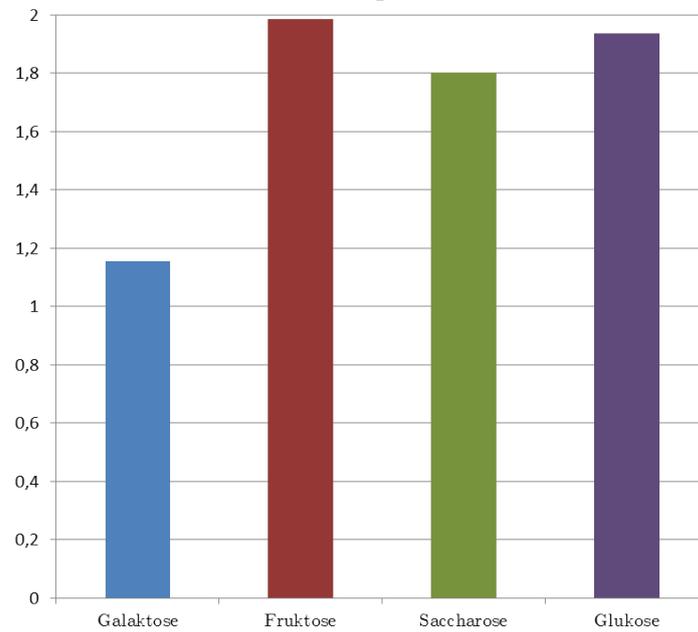


Abbildung 17: Wachstum Regressionsmodell

Wachstumsrate pro Stunde von H-Pflaume ermittelt
durch Regression

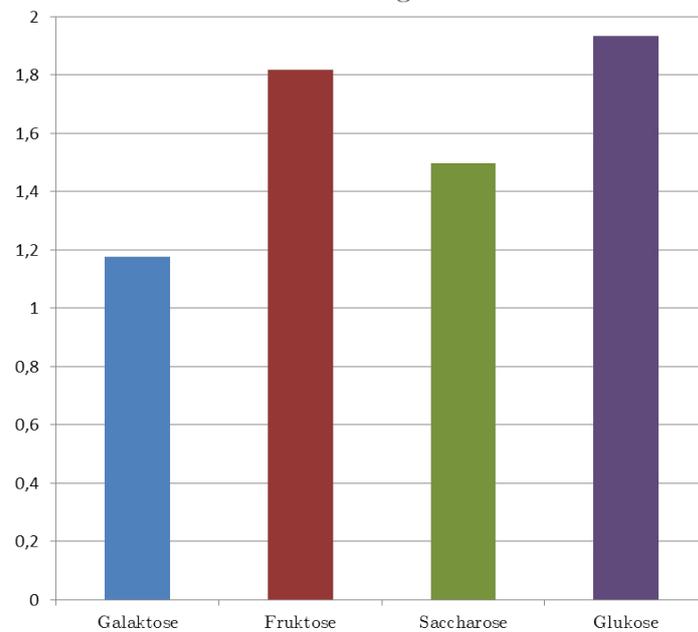


Abbildung 18: Wachstum Regressionsmodell

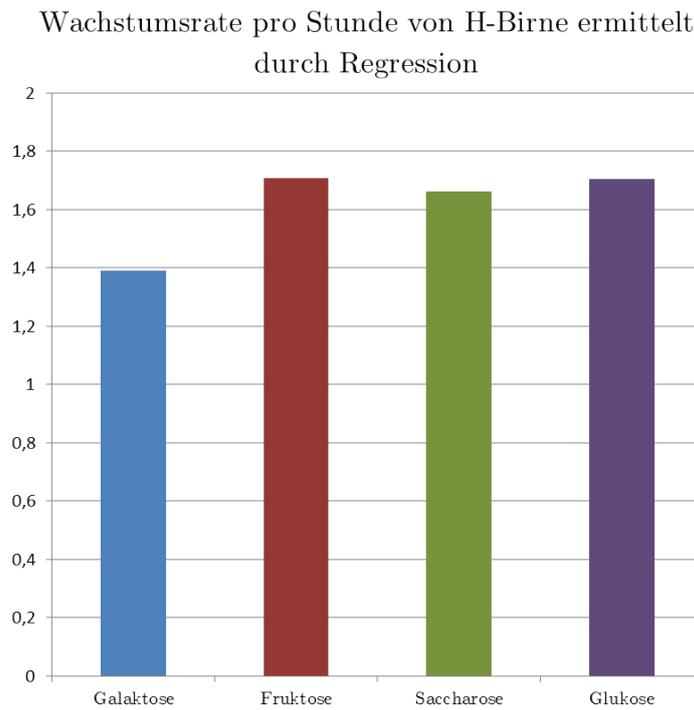


Abbildung 19: Wachstum Regressionsmodell

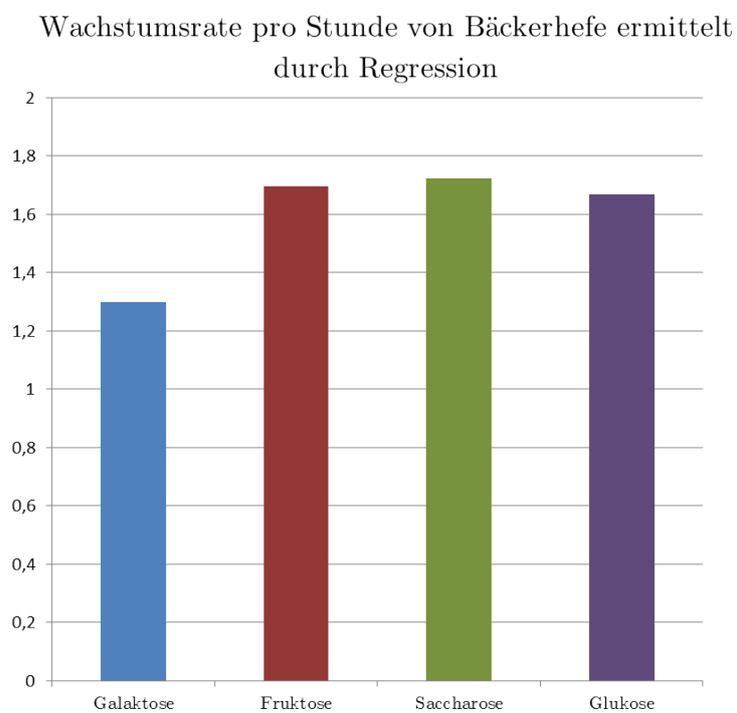


Abbildung 20: Wachstum Regressionsmodell

7.4 Phylogenie von H-Birne, H-Kaki und H-Pflaume

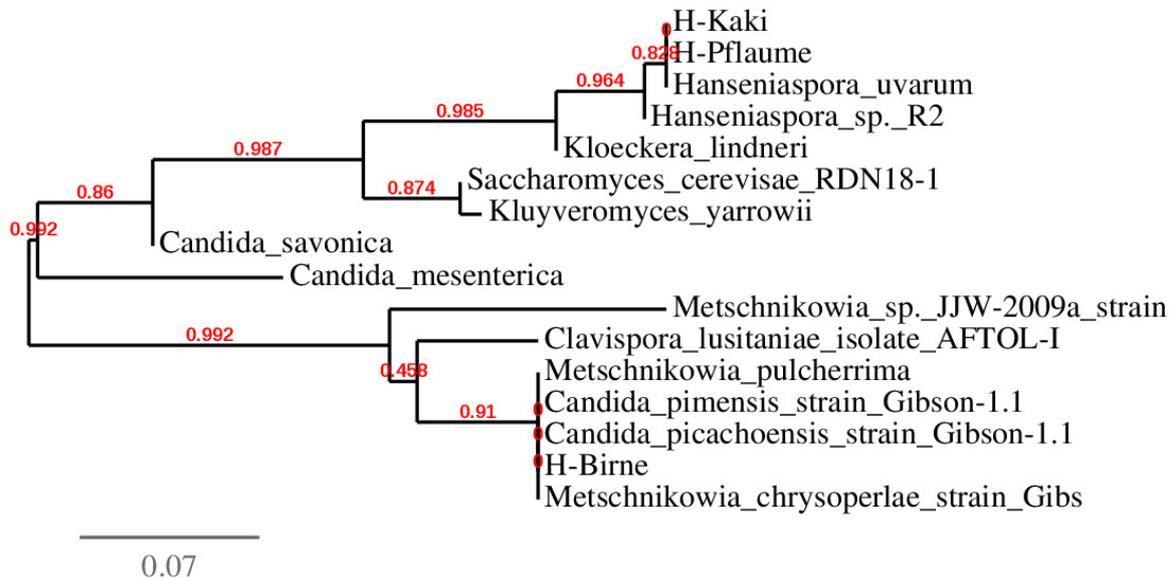


Abbildung 21: Phylogenetischer Stammbaum von den isolierten Wildhefen. Mit dem Stammbaum werden die mutmasslichen Verwandtschaftsbeziehungen bildlich dargestellt. Als Vergleich wurden nahe verwandte Hefen in den Stammbaum eingezeichnet. Jeder Knoten repräsentiert den nächsten gemeinsamen Verwandten der Vorfahren. Die Astlänge entspricht der geschätzten Anzahl der Mutationen pro Basenpaar während dieser Entwicklung. Die rot eingetragenen Zahlen geben die Wahrscheinlichkeit an, mit welcher die Zuordnung des Asts richtig erfolgt ist (z. B. 0,97 entspricht einer 97-prozentigen Wahrscheinlichkeit)

Die molekularbiologischen Untersuchungen haben ergeben, dass die Hefen H-Kaki und H-Pflaume identisch sind. Ihre Sequenzen der 18S konnten mit grösster Übereinstimmung der Hefe *Hanseniaspora uvarum* zugeordnet werden.

Tabelle 6: Systematik H-Kaki / H-Pflaume [26]

Abteilung	Ascomycota
Unterabteilung	Saccharomycotina
Klasse	Saccharomycetes
Ordnung	Saccharomycetales
Familie	Saccharomycodaceae
Gattung	<i>Hanseniaspora</i>
Art	<i>Hanseniaspora uvarum</i>

Die Sequenz der Hefe H-Birne konnte nicht eindeutig einer Hefeart zugeordnet werden. Wie der Stammbaum zeigt, lassen sich die Sequenzen von H-Birne, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida pimensis*, *Candida picachoensis* und *Metschnikowia chrysoperlae* nicht unterscheiden.

Die drei zuletzt genannten Hefen wurden erst seit kürzerer Zeit als neue Spezies, welche sich von *Metschnikowia pulcherrima* unterscheiden, entdeckt [17]. Die molekularbiologischen Unterschiede sind sehr gering, so dass die 18S rDNA zu wenig Variabilität für eine eindeutige Zuordnung der H-Birne aufweist.

Tabelle 7: Systematik H-Birne [24], [27]

Abteilung	Ascomycota	
Unterabteilung	Saccharomycotina	
Klasse	Saccharomycetes	
Ordnung	Saccharomycetales	
Familie	Metschnikowiaceae	incertae sedis
Gattung	Metschnikowia	Candida
Art	M. pulcherrima M. chrysoperlae	C. pimensis C. picachoensis

8 Diskussion

8.1 Isolation der Wildhefen

Die Dichte an Hefezellen war in allen Fruchtsäften viel geringer als erwartet. Pro Fruchtsaft war jeweils nur eine Hefe feststellbar, bzw. in einem Fall keine. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die Früchte aus konventionellem Anbau stammten und wahrscheinlich mit Spritzmittel behandelt wurden. Ein weiterer Grund für die geringe Anzahl der Hefezellen könnten lange Transportwege sein. Früchte aus fernen Länder müssen in einem sehr frühen Zeitpunkt, noch unreif geerntet werden, damit sie erst nach dem Transport reif sind. Die Hefen befinden sich vor allem auf reifen Früchten. Weiter könnten die Lagerbedingungen eine Rolle spielen.

Die Äpfel und Pfirsiche waren sehr reif und weich. Dieser Umstand könnte für den frühen Befall mit Schimmelpilzen und für die vermehrte Etablierung der Bakterien verantwortlich sein.

Im Honig sind immer Hefen enthalten. [28]. Wenn diese aktiv werden, geht der Honig in eine Gärung über und verdirbt. Die Bedingungen für das Wachstum der Hefe waren im Versuch offensichtlich nicht erfüllt. Weitere Versuche mit einer Änderung der Bedingungen konnten im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht vorgenommen werden.

Da optisch jeweils nur eine Hefe auf den Agarplatten vorhanden war, konnte eine Auswahl bezüglich vorherrschenden oder nur vereinzelt vorkommenden Hefepilzen nicht vorgenommen werden. Die Hypothese konnte somit nicht überprüft werden.

8.2 Wachstumsversuch

Es konnte gezeigt werden, dass hefespezifische Unterschiede in der Verwertung von verschiedenen Zuckern bestehen. Die Hefen von 14 der 16 Flüssigkulturen waren alle annäherungsweise exponentiell, aber unterschiedlich schnell gewachsen. Es ist davon auszugehen, dass bei schnellerem Wachstum und somit besserer Zuckerverwertung, ebenfalls die Triebkraft höher ist. Aus den Wachstumskurven ist ersichtlich, dass bei 13 der 16 Flüssigkulturen im Inkubationszeitraum (6 Std.) eine Lag-, Beschleunigungs- und Exponentialphase, zwar unterschiedlich ausgeprägt, aber stattgefunden hatte. Lediglich die Galaktose-Flüssigkulturen von H-Birne, H-Kaki und H-Pflaume durchliefen eine lange Lag- und eine kaum ersichtliche Beschleunigungsphase. Bei keiner Flüssigkultur kann eindeutig eine stationäre Phase oder gar eine Absterbephase festgestellt werden. Somit kann festgehalten werden, dass die Menge der Zucker in den Flüssigmedien zu gross war, als dass der Zucker während der Versuchsdauer von 6 Std. einen limitierenden Faktor dargestellt hätte. Die Anzahl der Hefezellen, die in die Flüssigmedien gegeben wurde, war unterschiedlich hoch, da es technisch nicht möglich war, eine bestimmte Anzahl Zellen aufzunehmen. Mit der Impföse wurde jeweils eine ungefähr gleich grosse Menge transferiert. Deshalb waren ebenfalls die OD-Anfangswerte unterschiedlich, sodass die Wachstumskurven der OD-Werte nicht miteinander verglichen werden können.

8.2.1 Wachstum von H-Birne, H-Kaki und H-Pflaume und Bäckerhefe in den verschiedenen Zuckern

H-Birne: H-Birne konnte alle Zucker verwerten. Die Bestimmtheitsmasse R^2 sind bei allen Zuckern über 0,9, was bestätigt, dass bei allen Zuckern ein exponentielles Wachstum stattfand. Während sich die Hefen in Glukose, Fruktose und Saccharose nach sechs Stunden mitten in der exponentiellen Phase befanden, waren die Hefen in Galaktose wesentlich langsamer und befanden sich noch im Übergang zwischen der Beschleunigungs- und der exponentiellen Phase. Es ist davon auszugehen, dass die enzymatische Umwandlung der Galaktose in Glukose eine grosse Verzögerung zur Folge hatte. Der Hefe stand so pro Zeiteinheit vergleichsweise weniger Energie fürs Wachstum zur Verfügung. Mit einer stündlichen Wachstumsrate von 1,39 konnte die H-Birne in Galaktose am schlechtesten wachsen. Wie vermutet war die H-Birne in Fruktose und Glukose am besten gewachsen. Die Wachstumsraten von 1,705 in Glukose und 1,71 in Fruktose zeigen, dass beide Zucker von der Hefe gleich gut verwertet werden konnten. Mit einer Wachstumsrate von 1,664 konnte die H-Birne Saccharose ebenfalls gut verwerten, wenn auch

etwas schlechter. Birnen enthalten wesentlich mehr Fruktose als Glukose. Es konnte also kein Zusammenhang zwischen dem Zuckergehalt der Frucht und der Fähigkeit der daraus isolierten Hefen, die entsprechenden Zucker zu verbrauchen, festgestellt werden. Die Hypothese hat sich somit nicht bestätigt.

H-Kaki: H-Kaki wuchs in Glukose, Fruktose und Saccharose exponentiell. Die Bestimmtheitsmasse sind bei allen drei deutlich über 0,9. Bei der Galaktose ist das Bestimmungsmaß nur 0,7788. Hier fand keine exponentielle Phase statt. Die stündliche Wachstumsrate von H-Kaki in Galaktose beträgt 1,15. Die H-Kaki kam mit der Verwertung der Galaktose sehr schlecht zurecht. Es ist davon auszugehen, dass die enzymatische Anpassung nur langsam und nicht sehr effektiv erfolgen konnte. Gegen Ende der Versuchsdauer sind die OD-Werte bei der Galaktose bereits zurückgegangen, obwohl kein Nährstoffmangel vorhanden war. Die Zellteilungen und das Absterben von Zellen hielten sich zirka die Waage. H-Kaki konnte Fruktose mit einer stündlichen Wachstumsrate von 1,986 am besten verwerten. Dann folgen Glukose mit 1,937 und Saccharose mit 1,804. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Zuckergehalt der Frucht und der Verwertung der entsprechenden Zucker durch die Hefe festgestellt werden. Die Hypothese hat sich somit nicht bestätigt.

H-Pflaume: Die Wachstumskurven von H-Pflaume weisen einen ähnlichen Verlauf wie die von H-Kaki auf. H-Pflaume hat sich in Fruktose und Glukose sehr genau nach einem exponentiellen Wachstum vermehrt, ohne Lag-Phase. Beide Bestimmtheitsmasse liegen nur ganz knapp unter 1. Mit stündlichen Wachstumsraten von 1,934 in der Glukose und 1,818 in der Fruktose wuchs die Hefe in diesen zwei Zuckern am besten. Die Saccharose weist ein um ca. 10% geringeres Bestimmtheitsmaß auf, insbesondere war die Lag-Phase lang und hat sich auf den Wert ausgewirkt. Die Hefen wiesen im Gegensatz dazu weder in Fruktose noch in Glukose eine Lag-Phase auf. In der zweiten Hälfte der Versuchszeit fand in der Saccharose ein exponentielles Wachstum statt und die stündliche Wachstumsrate beträgt 1,498. In der Galaktose wuchs die H-Pflaume nach einer langen Lag-Phase sehr langsam aber kontinuierlich mit einer stündlichen Wachstumsrate von 1,177. Der letzte OD-Wert in Galaktose ist sicher nicht korrekt. Wahrscheinlich passierte bei der Verdünnung der Kultur in der Küvette ein Fehler.

Bäckerhefe: Die Bäckerhefe wuchs in allen Flüssigmedien annäherungsweise exponentiell. Die Bestimmtheitsmasse sind bei Fruktose, Glukose und Saccharose knapp unter 1 und bei Galaktose 0,881. Die Bäckerhefe konnte im Gegensatz zu den Wildhefen den Invertzucker der gespaltenen Saccharose am besten verwerten, noch vor Fruktose und Glukose. Zudem fand in der Saccharose keine Lag-Phase statt, während bei den anderen Zuckern die Angewöhnungsphase deutlich erkennbar ist. Dies könnten Gründe sein, warum die Bäckerhefe zum Backen bevorzugt wird. In Backwaren muss die Hefe meist schnell Saccharose verwerten können und nicht nur die einzelnen Monosaccharide Fruktose und Glukose. Die Bäckerhefe konnte Ga-

laktose nicht gut verwerten, jedoch besser als die Wildhefen. Die Wachstumsraten liegen bei 1,723 für die Saccharose, 1,696 für die Fruktose, 1,669 für die Glukose und 1,299 für die Galaktose. Die Bäckerhefe konnte die Zucker allgemein weniger gut verwerten als erwartet. Dies ist damit zu erklären, dass sie spezifisch auf eine andere Anwendung gezüchtet worden ist.

8.2.2 Vergleich unter den Wildhefen und der Bäckerhefe

Die Resultate zeigen, dass H-Kaki im Vergleich zu den anderen getesteten Hefen das schnellste Wachstum in Fruktose, Glukose und Saccharose aufwies, in Galaktose aber am schlechtesten von allen Hefen abschnitt. Galaktose wurde allgemein, wie vermutet, im Vergleich zu den anderen Zuckern von allen Hefen am schlechtesten verwertet. Während die Saccharose bei allen Wildhefen am zweitschlechtesten abschnitt, ist die Bäckerhefe in Saccharose gleich gut oder sogar leicht besser gewachsen als in Fruktose und Glukose. Hier kommt zum Vorschein, dass die Bäckerhefe auf die Verwertung von Saccharose gezüchtet ist, während die Wildhefen ihrer natürlichen Ausrichtung folgen konnten. Dennoch ist das Wachstum von H-Kaki auch in Saccharose deutlich besser als das von der Bäckerhefe.

8.2.3 Vergleich H-Kaki und H-Pflaume - die gleiche Hefe

Anhand morphologischer Ähnlichkeiten und schliesslich dank der DNA-Analyse wurde ersichtlich, dass es sich bei den Hefen, welche von der Kaki und der Pflaume stammten, um die gleiche Hefe handelt. Die beiden Hefen H-Kaki und H-Pflaume wuchsen in den verschiedenen Zuckern jeweils ähnlich und im Vergleich mit den anderen Hefen ist ihre Stellung ebenfalls ähnlich. Beide Hefen wuchsen im Vergleich mit H-Birne und der Bäckerhefe in Fruktose und Glukose besser. Der Unterschied der Wachstumsrate in Glukose beträgt nur 0.15 %, der Unterschied bei Fruktose 8.46 %, bei Saccharose 20.38 % und bei Galaktose 1.84%. Dazu kann allgemein festgehalten werden, dass sich gleiche getrennte Hefekulturen auch bei gleichen Bedingungen in einem gewissen Mass unterschiedlich entwickeln können. Die momentane Konstitution ist nicht immer genau gleich. Einflüsse wie Zugang zu Sauerstoff und momentanes Nährstoffangebot sind nicht bei jeder Kultur immer genau gleich. Auch die Hefeanzahl zu Beginn kann zu einer etwas unterschiedlichen Entwicklung beitragen. Zudem können auch zufällige Messungenauigkeiten verantwortlich sein.

8.2.4 Fehlerquellen und Probleme

Trotz möglichst exaktem und konzentriertem Arbeiten gab es während dem Wachstumsversuch einige Fehlerquellen und Probleme. Diese waren:

- Es konnte nicht exakt die gleiche Menge Hefe in jedes Flüssigmedium gegeben werden. Je mehr Hefen im Medium sind, desto höher ist der Zuckerverbrauch. Das bedeutet, dass die Hefen im Verhältnis weniger Zugang zu Nährstoffen haben. Dies kann zu einem kleinen Fehler führen.
- Es war schwierig, trotz gestaffelter Inkubation alle 16 Flüssigkulturen über die ganze Zeitspanne exakt stündlich mit dem Photometer zu messen, zumal vor jeder Messung einer Kultur eines neuen Mediums noch eine Blindprobe durchgeführt werden musste.
- Eine mögliche Fehlerquelle liegt auch bei der Verdünnung der Kultur vor der Messung in der Küvette mit destilliertem Wasser. Obwohl die Verdünnung mit einer Pipette durchgeführt wurde, können Fehler einerseits bei der Mengeneinstellung der Pipette als auch bei der Flüssigkeitsaufnahme mit der Pipette, gemacht werden.
- Konzentrationsfehler: Aus insgesamt 16 verschiedenen Kulturen wurden 112 Messungen, exklusive Blindproben, gemacht. Bei dieser Anzahl ist es unumgänglich, dass einzelne Fehler passieren.

8.2.5 Weiterführende Überlegungen

Es kann davon ausgegangen werden, je besser eine Hefe den Zucker verwerten kann, desto schneller wächst sie, respektive desto schneller kann sie den Zucker in die Glykolyse einspeisen und daraus Energie fürs Wachstum gewinnen. Das Verhalten der Hefen in den verschiedenen Zuckerarten gibt einen gewissen Anhaltspunkt für die Triebkraft. Es bleibt die Frage, ob alle Hefen gleich viel Energie benötigen, um eine bestimmte Zellmasse aufzubauen und Zellteilung zu betreiben oder ob sich eine „starke“ Hefe damit auszeichnet, dass sie mit geringerem Nährstoffverbrauch und einer geringen Bildung von teils unerwünschten Nebenprodukten im Vergleich zu anderen Hefen ein gleich schnelles Wachstum erzielen kann.

8.3 Phylogenie von H-Birne, H-Kaki und H-Pflaume

Hanseniaspora uvarum macht einen sehr grossen Anteil der Hefeflora auf Früchten aus (auf Trauben wurde ein Anteil von 50,9 % - 89,1 % gemessen [1]). Es war also sehr wahrscheinlich, dass diese Hefe isoliert wurde. H-Birne kann, wie in den Resultaten geschrieben, nicht eindeutig einer Hefeart zugewiesen werden. *Metschnikowia pulcherrima* kommt gemäss Erhebungen auf Trauben zu 0,5 - 2,7 % vor [1]). Für die Hefen *Candida pimensis* und *Candida picachoensis*

sind keine solchen Daten vorhanden. Es kann gut sein, dass es sich bei H-Birne um die Hefe *Metschnikowia pulcherrima* handelt. Es gelang, zwei ganz verschiedene Hefen zu isolieren.

9 Schlusswort

Alle Hefen zeigten einen schönen Wachstumsverlauf. Glukose und Fruktose wurden von den Wildhefen eindeutig bevorzugt, während die Bäckerhefe aufgrund ihrer Züchtung Saccharose am besten verwerten konnte. Mit der Beschreibung des Wachstums ist im Rahmen dieser Arbeit eine gewisse Charakterisierung der isolierten Hefen gelungen. Es ist erstrebenswert mit zukünftigen Experimenten weitere Eigenschaften herauszufinden und die Wildhefen möglichst spezifisch für interessante neue Produkte einzusetzen.

10 Literatur

- [1] BACK, Werner. *Mikrobiologie der Lebensmittel Band 5: Getränke*. 3. Auflage. Auerhoffstrasse 10, Hamburg: Behr's Verlag, 2008. ISBN: 978-3-89947-360-5.
- [2] *Basic Local Alignment Search Tool*. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Letzter Zugriff: 13.10.2016.
- [3] *Bestimmtheitsmaß*. <https://de.wikipedia.org/wiki/Bestimmtheitsmass>. Letzter Zugriff: 13.10.2016.
- [4] *Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA*. <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>. Letzter Zugriff: 13.10.2016.
- [5] FOCKE, Karin. *Prüfung verschiedener Anreicherungsverfahren zum Nachweis von Hefen- und Schimmelkontaminationen in Milchprodukten*. 2009. URL: http://digibib.hs-nb.de/file/dbhsnb_derivate_0000000195/Diplomarbeit-Focke-2009.pdf.
- [6] *History of Yeasts*. http://www.dakotayeast.com/yeast_history.html. Letzter Zugriff: 13.10.2016.
- [7] JÄHRIG, Silke Christiane. *Bioaktivitäten von Wertstoffen aus Saccharomyces Hefen*. 2007.
- [8] LÖÖKE, M, KRISTJUHAN, K und KRISTJUHAN, A. "Extraction of Genomic DNA from Yeasts for PCR-based Applications". In: *BioTechniques* (2011).
- [9] *Nährwertrechner*. <http://www.naehrwertrechner.de/>. Letzter Zugriff: 11.10.2016.

-
- [10] *OD-Wert*. https://www.biomers.net/de/Technische_Informationen/Berechnungen.html?lang=de. Letzter Zugriff: 13.10.2016.
- [11] *Quick-StartProtocol der Firma Qiagen*. <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=390a728a-e6fc-43f7-bf59-b12091cc4380&lang=en>. Letzter Zugriff: 23.10.2016.
- [12] *Reverse Complement*. http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html. Letzter Zugriff: 13.10.2016.
- [13] *Ribosomale DNA*. https://de.wikipedia.org/wiki/Ribosomale_DNA. Letzter Zugriff: 02.10.2016.
- [14] *Robust Phylogenetic Analysis For The Non-Specialist*. <http://www.phylogeny.fr/>. Letzter Zugriff: 13.10.2016.
- [15] SCHAECHTER, Moselio. *Eukaryotic Microbes* -. 1. Aufl. Amsterdam, Boston: Academic Press, 2012. ISBN: 978-0-123-83876-6.
- [16] SCHÖNEBORN, Holger. *Differenzierung und Charakterisierung von Betriebshefekulturen mit genetischen und physiologischen Methoden*. 2002. URL: <https://mediatum.ub.tum.de/doc/603328/file.pdf>.
- [17] SUH, Sung-Oui, GIBSON, Cara M. und BLACKWELL, Meredith. “*Metschnikowia chrysoperlae* sp. nov., *Candida picachoensis* sp. nov. and *Candida pimensis* sp. nov., isolated from the green lacewings *Chrysoperla comanche* and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae)”. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2004).
- [18] *Uses in phylogeny*. https://en.wikipedia.org/wiki/18S_ribosomal_RNA. Letzter Zugriff: 30.09.2016.
- [19] VAN DER FELDEN, Julia. *Mechanismen zur Steuerung transkriptioneller Programme für Wachstum und Differenzierung durch den TEA-Regulator Tec1 in Saccharomyces cerevisiae*. 2012.
- [20] VÖLKER, Lothar und MAREK, Mösche. *Backhefe – natürlich rein*. 2012. URL: http://www.wissensforum-backwaren.de/files/wfb_broschuere30_d.pdf.
- [21] *Wachstumskurve einer Hefepopulation*. <http://www3.hhu.de/biodidaktik/Hefe/allg/seiten/wachstum/wakurve.html>. Letzter Zugriff: 02.10.2016.
- [22] WEHDE, Thorsten. *Untersuchungen zur saisonalen Dynamik der Biodiversität von bodenassozierten Hefen im Natur- und Nutzwald*. 2011. URL: https://depositonce.tu-berlin.de/bitstream/11303/1968/2/Dokument_29.pdf.
-

- [23] *What are yeast.* [%3F](http://wiki.yeastgenome.org/index.php/What__are__yeast).
Letzter Zugriff: 13.10.2016.
- [24] *Wikipedia-Artikel Candida.* [https://de.wikipedia.org/wiki/Candida_\(Pilze\)](https://de.wikipedia.org/wiki/Candida_(Pilze)). Letzter
Zugriff: 23.10.2016.
- [25] *Wikipedia-Artikel Extinktion.* [https://de.wikipedia.org/wiki/Extinktion_\(Optik\)](https://de.wikipedia.org/wiki/Extinktion_(Optik)).
Letzter Zugriff: 23.10.2016.
- [26] *Wikipedia-Artikel Hanseniaspora.* <https://en.wikipedia.org/wiki/Hanseniaspora>. Letz-
ter Zugriff: 23.10.2016.
- [27] *Wikipedia-Artikel Metschnikowia.* <https://en.wikipedia.org/wiki/Metschnikowia>. Letz-
ter Zugriff: 23.10.2016.
- [28] *Wissenswerte Informationen über Honig.* <http://www.bee-info.de/honig/honiganalyse.html>. Letzter Zugriff: 15.10.2016.

11 Abbildungsverzeichnis

1	Darstellung der rDNA mit den Tandem Repeats.	3
2	Schematische Darstellung des aeroben Stoffwechsels ab oxidativer Decarboxy- lierung	4
3	Zellzyklus von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
4	Darstellung der beschriebenen Wachstumsphasen anhand einer logarithmierten Wachstumskurve.	8
5	Isolierte Hefekulturen auf YEPD-Agarplatten von H-Birne und H-Pflaume . .	21
6	H-Birne: 100fache Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop.	21
7	H-Kaki: 100fache Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop.	22
8	H-Pflaume: 100fache Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop.	22
9	Wachstumskurve H-Birne	24
10	Wachstumskurve H-Kaki	25
11	Wachstumskurve H-Pflaume	26
12	Wachstumskurve H-Bäckerhefe	27
13	Wachstumskurve H-Pflaume, Regressionsmodell	28
14	Wachstumskurve H-Kaki, Regressionsmodell	29
15	Wachstumskurve H-Birne, Regressionsmodell	30
16	Wachstumskurve Bäckerhefe, Regressionsmodell	31
17	Wachstumsrate H-Kaki, Regressionsmodell	32
18	Wachstumsrate H-Pflaume, Regressionsmodell	32
19	Wachstumsrate H-Birne, Regressionsmodell	33

20	Wachstumsrate Bäckerhefe, Regressionsmodell	33
21	Phylogenetischer Stammbaum.	34

12 Tabellenverzeichnis

1	Zuckergehalte Früchte pro 100g [9]	14
2	Befüllung der Reagenzgläser (RG) mit Hefe und Flüssigmedien	15
3	PCR-Ansatz 25 Milliliter	18
4	PCR-Programm, gemäss Absprache mit Prof. Dr. Ochsenreiter	18
5	Morphologische Charakterisierung	23
6	Systematik H-Kaki / H-Pflaume [26]	34
7	Systematik H-Birne [24], [27]	35

Anhang I : Rohdaten und Berechnungen

Bäckerhefe	Messung	Verdünnungs- faktor	OD ₆₀₀ gemessen	OD ₆₀₀ berechnet	Faktor gesamt	Verdoppelungszeit [min]	Mittelwert aller realistischen Verdoppelun gszeiten [min]	Parameter aus exponentiellem Fit	Wachstumsrate (Pro Zeiteinheit)
Galaktose	0	1	0,291	0,291					
	1	1	0,200	0,200	0,6872852	-110,9018039			
	2	1	0,414	0,414	2,07	57,16295848			
	3	1	0,456	0,456	1,1014495	430,40666312			
	4	1	0,645	0,645	1,4144737	119,99363531			
	5	2	0,360	0,720	1,1162791	378,0772034			
	6	3	0,410	1,230	1,7083333	77,66090491	84,92007217	$\lambda =$ $R^2 =$	1,299229105 0,880961091
Fructose	0	1	0,145	0,145					
	1	1	0,199	0,199	1,3724138	131,3728043			
	2	1	0,322	0,322	1,6180905	86,41893863			
	3	1	0,517	0,517	1,6055901	87,83440855			
	4	2	0,452	0,904	1,7485493	74,42705199			
	5	3	0,598	1,794	1,9845133	60,68051913			
	6	5	0,656	3,280	1,8283166	68,92464377	84,94306106	$\lambda =$ $R^2 =$	1,695699476 0,988903306
Saccharose	0	1	0,159	0,159					
	1	1	0,247	0,247	1,5534591	94,41618343			
	2	1	0,405	0,405	1,6396761	84,1030083			
	3	1	0,629	0,629	1,5530864	94,46764277			
	4	2	0,588	1,176	1,8696343	66,4631316			
	5	3	0,769	2,307	1,9617347	61,72014388			
	6	5	0,805	4,025	1,7446901	74,72251986	79,31543831	$\lambda =$ $R^2 =$	1,72684354 0,994005818
Glukose	0	1	0,132	0,132					
	1	1	0,173	0,173	1,3106061	153,7538588			
	2	1	0,289	0,289	1,6705202	81,04850234			
	3	1	0,509	0,509	1,7612457	73,47573094			
	4	2	0,444	0,888	1,7445972	74,72966355			
	5	3	0,514	1,542	1,7364865	75,36067775			
	6	5	0,504	2,520	1,6342412	84,67149953	77,85721482	$\lambda =$ $R^2 =$	1,669177621 0,994123885

Birne	Messung	Verdünnungs- faktor	OD ₆₀₀ gemessen	OD ₆₀₀ berechnet	Faktor	Faktor gesamt	Verdoppelungszeit [min]	Mittelwert aller realistischen Verdoppelun gszeiten [min]	Parameter aus exponentiellem Fit	Wachstumsrate (Pro Zeiteinheit)
Galaktose	0	1	0,138	0,138						
	1	1	0,142	0,142	1,0289855		1455,510053			
	2	1	0,242	0,242	1,7042254		78,01162739			
	3	1	0,263	0,263	1,0867769		499,7678078			
	4	1	0,372	0,372	1,4144487		119,9424704			
	5	1	0,671	0,671	1,8037634		70,50444739			
	6	2	0,459	0,918	1,3681073	6,65217913	132,6901144	232,5739685	$\lambda = 0,329309693$ $R^2 = 0,96065455$	1,390008265
Fructose	0	1	0,054	0,054						
	1	1	0,096	0,096	1,7777778		72,28262519			
	2	1	0,118	0,118	1,291667		201,5583493			
	3	1	0,201	0,201	1,7033898		78,08345291			
	4	1	0,247	0,247	1,2288557		201,8057984			
	5	1	0,692	0,692	2,8016194		40,3697602			
	6	4	0,422	1,688	2,4393064	31,25925926	46,63921831	106,7898674	$\lambda = 0,536290219$ $R^2 = 0,945415273$	1,709652646
Saccharose	0	1	0,124	0,124						
	1	1	0,098	0,098	0,7903226		-176,7575314			
	2	1	0,184	0,184	1,877551		66,01734123			
	3	1	0,288	0,288	1,5652174		92,82708909			
	4	1	0,490	0,490	1,7013889		78,25614655			
	5	2	0,475	0,950	1,9387755		62,81763711			
	6	4	0,570	2,280	2,4	18,38709677	47,50464415	69,48457162	$\lambda = 0,509193076$ $R^2 = 0,934304631$	1,663947973
Glukose	0	1	0,068	0,068						
	1	1	0,063	0,063	0,9264706		-544,5490211			
	2	1	0,160	0,160	2,5396825		44,62133759			
	3	1	0,265	0,265	1,65625		82,42658882			
	4	1	0,349	0,349	1,3169811		151,0442152			
	5	1	0,636	0,636	1,8223496		69,30009099			
	6	2	0,817	1,634	2,5691824	24,02941176	44,07521453	78,29348942	$\lambda = 0,53363791$ $R^2 = 0,960192203$	1,705124128

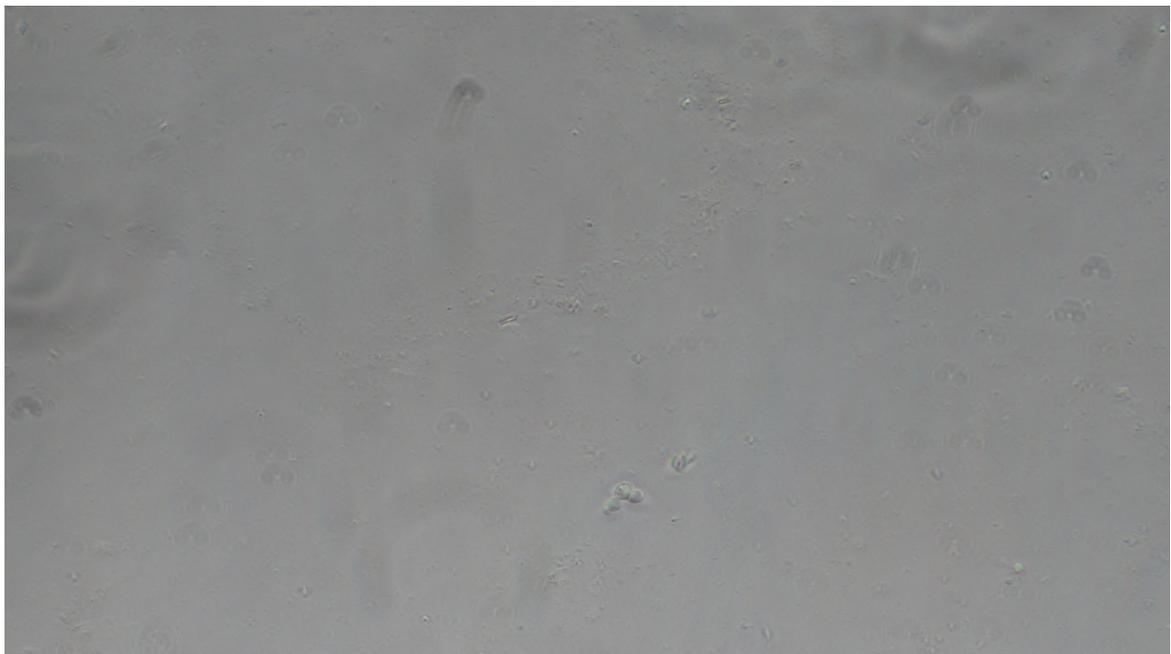
Kaki		Messung	Verdünnungs- faktor	OD ₆₀₀ gemessen	OD ₆₀₀ berechnet	Faktor	Faktor gesamt	Verdoppelungszeit [min]	Mittelwert aller realistischen Verdoppelun gszeiten [min]	Parameter aus exponentiellem Fit	Wachstumsrate (Pro Zeiteinheit)
Galaktose		0	1	0,142	0,142						
		1	1	0,153	0,153	1,0774648		557,4098559			
		2	1	0,212	0,212	1,3856209		127,5150723			
		3	1	0,236	0,236	1,1132075		387,7908077			
		4	1	0,350	0,350	1,4830508		105,5282629			
		5	1	0,334	0,334	0,9542857		-888,7990957			
		6	2	0,138	0,276	0,8263473	1,943661972	-218,0392319	206,9447143	$\lambda = 0,144874087$ $R^2 = 0,778782475$	1,155894019
Fructose		0	1	0,06	0,06						
		1	1	0,155	0,155	2,5833333		43,82012741			
		2	1	0,317	0,317	2,0451613		58,12744613			
		3	1	0,600	0,600	1,8927445		65,18340663			
		4	2	0,541	1,082	1,8033333		70,5329629			
		5	3	0,807	2,421	2,2375231		51,63944123			
		6	5	0,770	3,850	1,590252	64,16666667	89,6518773	63,15921027	$\lambda = 0,686040641$ $R^2 = 0,993747229$	1,985837305
Saccharose		0	1	0,048	0,048						
		1	1	0,053	0,053	1,1041667		419,7038247			
		2	1	0,122	0,122	2,3018868		49,88290474			
		3	1	0,217	0,217	1,7786885		72,21833959			
		4	1	0,461	0,461	2,124424		55,194151			
		5	2	0,438	0,876	1,9002169		64,78333457			
		6	4	0,292	1,168	1,3333333	24,33333333	144,5652504	77,32879606	$\lambda = 0,589823815$ $R^2 = 0,981304314$	1,803670607
Glukose		0	1	0,074	0,074						
		1	1	0,078	0,078	1,0540541		790,005345			
		2	1	0,123	0,123	1,5769231		91,30859555			
		3	1	0,273	0,273	2,2195122		52,16290732			
		4	1	0,560	0,560	2,0512821		57,88567501			
		5	2	0,746	1,492	2,6642857		42,44035423			
		6	4	0,746	2,984	2	40,32432432	60	60,75950642	$\lambda = 0,661033748$ $R^2 = 0,961281056$	1,936793456

Pflaume		Messung	Verdünnungs- faktor	OD ₆₀₀ gemessen	OD ₆₀₀ berechnet	Faktor	Faktor gesamt	Verdoppelungszeit [min]	Mittelwert aller realistischen Verdoppelun gszeiten [min]	Parameter aus exponentiellem Fit	Wachstumsrate (Pro Zeiteinheit)
Galaktose	0	1	0,234								
	1	1	0,200	0,234	0,200	0,8547009		-264,8906867			
	2	1	0,237	0,237	1,185			245,0109051			
	3	1	0,278	0,278	1,1729958			260,6453832			
	4	1	0,379	0,379	1,3633094			134,1942745			
	5	1	0,554	0,554	1,4617414			109,5513979			
	6	3	0,155	0,465	0,8393502	1,987179487		-237,4777394	213,2835209	$\lambda = 0,163118556$ $R^2 = 0,831622912$	1,177176243
Fructose	0	1	0,128								
	1	1	0,231	0,128	0,231	1,8046875		70,44328444			
	2	1	0,422	0,422	1,8268398			69,01707003			
	3	1	0,700	0,700	1,6587678			82,17918116			
	4	2	0,761	1,522	2,1742857			53,54553875			
	5	3	0,915	2,745	1,803548			70,51872951			
	6	5	0,850	4,250	1,5482696	33,203125		95,13892544	73,47378822	$\lambda = 0,597890875$ $R^2 = 0,997117038$	1,818279774
Saccharose	0	1	0,162								
	1	1	0,138	0,162	0,138	0,8518519		-259,3747254			
	2	1	0,169	0,169	1,2246377			205,2299574			
	3	1	0,247	0,247	1,4615385			109,5914841			
	4	1	0,400	0,400	1,6194332			86,27024095			
	5	2	0,400	0,800	2			60			
	6	4	0,410	1,640	2,05	10,12345679		57,93608996	103,8055545	$\lambda = 0,404315981$ $R^2 = 0,882397791$	1,4982773
Glukose	0	1	0,064								
	1	1	0,183	0,064	0,183	2,859375		39,58567421			
	2	1	0,342	0,342	1,8688525			66,50758963			
	3	1	0,588	0,588	1,7192982			76,74402426			
	4	2	0,57	1,140	1,9387755			62,81763711			
	5	3	0,75	2,250	1,9736842			61,16886501			
	6	5	0,757	3,785	1,6822222	59,140625		79,96073408	64,46408738	$\lambda = 0,659361633$ $R^2 = 0,991230271$	1,933557622

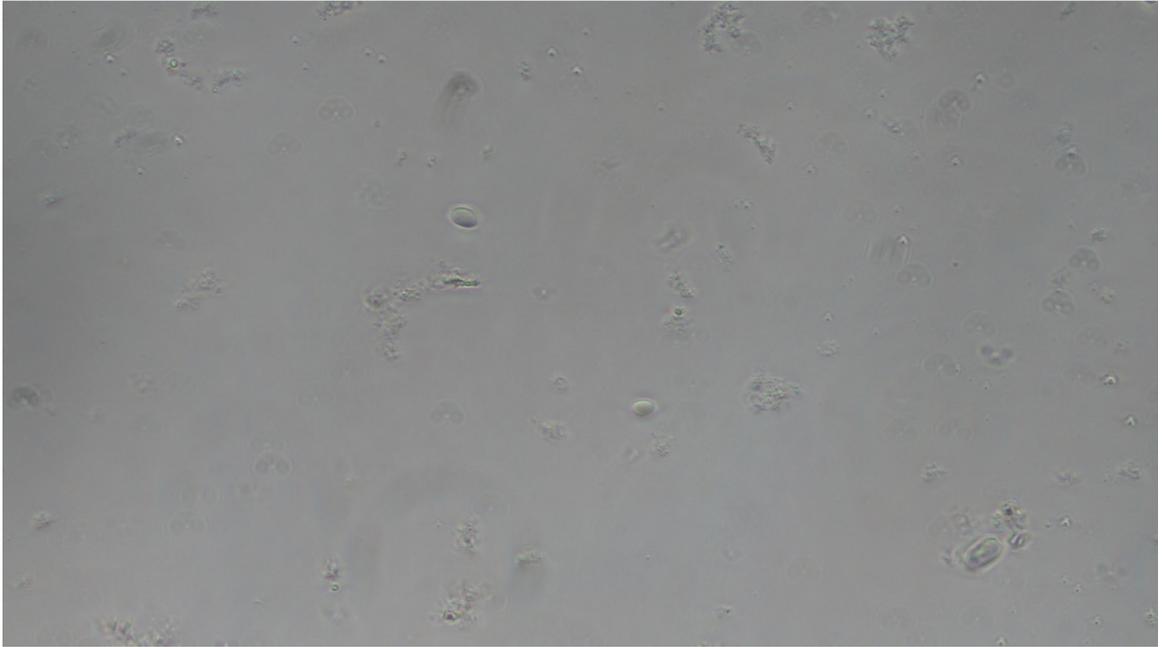
Anhang II: Mikroskopien Fruchtsäfte



Birnensaft 50fache Vergrößerung



Pflaumensaft 50fache Vergrößerung



Kakisaft 50fache Vergrößerung

Anhang III: Protokoll von BioTechniques zur gDNA-Extraktion

Yeast genomic DNA extraction with LiOAc-SDS

PROTOCOL FOR: EXTRACTION OF GENOMIC DNA FROM YEASTS

Authors

Marko Lõoke, Kersti Kristjuhan and Arnold Kristjuhan

Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Riia 23, Tartu 51010, Estonia

REAGENTS

1. 0.2 M Lithium acetate 1% SDS solution.
2. Ethanol 96-100 % and 70 %.

PROCEDURE

1. Pick one yeast colony from the plate or spin down 100-200 μ l of liquid yeast culture ($OD_{600}=0.4$). Suspend cells in 100 μ l of 200mM LiOAc, 1 % SDS solution.
2. Incubate for 5 minutes at 70°C.
3. Add 300 μ l of 96-100 % ethanol, vortex.
4. Spin down DNA and cell debris at 15 000 g for 3 minutes.
5. Wash pellet with 70 % ethanol
6. Dissolve pellet in 100 μ l of H₂O or TE and spin down cell debris for 15 seconds at 15 000 g.
7. Use 1 μ l of supernatant for PCR.

Anhang IV

Quick-Start Protocol

QIAquick® PCR Purification Kit

The QIAquick PCR Purification Kit (cat. nos. 28104 and 28106) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 12 months.

For more information, please refer to the *QIAquick Spin Handbook, March 2008*, which can be found at: www.qiagen.com/handbooks.

For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at www.qiagen.com/contact.

Notes before starting

- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
 - All centrifugation steps are carried out at 17,900 x g (13,000 rpm) in a conventional table-top microcentrifuge at room temperature.
 - Add 1:250 volume pH indicator I to Buffer PB. The yellow color of Buffer PB with pH indicator I indicates a pH of ≤ 7.5 . If the purified PCR product is to be used in sensitive microarray applications, it may be beneficial to use Buffer PB without the addition of pH indicator I. Do not add pH indicator I to buffer aliquots.
1. Add 5 volumes Buffer PB to 1 volume of the PCR reaction and mix. If the color of the mixture is orange or violet, add 10 μ l 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn yellow.
 2. Place a QIAquick column in ▲ a provided 2 ml collection tube or into ● a vacuum manifold. For details on how to set up a vacuum manifold, refer to the *QIAquick Spin Handbook*.
 3. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and ▲ centrifuge for 30–60 s or ● apply vacuum to the manifold until all the samples have passed through the column. ▲ Discard flow-through and place the QIAquick column back in the same tube.

October 2010



Quick-Start Protocol

4. To wash, add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column ▲ centrifuge for 30–60 s or ● apply vacuum. ▲ Discard flow-through and place the QIAquick column back in the same tube.
5. Centrifuge the QIAquick column once more in the provided 2 ml collection tube for 1 min to remove residual wash buffer.
6. Place each QIAquick column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.
7. To elute DNA, add 50 μ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water (pH 7.0–8.5) to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. For increased DNA concentration, add 30 μ l elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge.
8. If the purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume of Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting up and down before loading the gel.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, QIAquick® (QIAGEN Group). 1063920 10/2010
© 2010 QIAGEN, all rights reserved.



Sample & Assay Technologies

Anhang V: Gensequenzen aus der Analyse

BC Economy Run
9214585 2778860
BirneNS1 NS1

TCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTGCTAATTGGCATAACGCCTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGC
ACACAAGCCCAACCTCCGGAAGGGCTGTATTTATTAGATAAAAAATCAACACTCCAGAAGATTCATAAT
AACTTGTCGAATCGCAGGGCCTCGGGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGAT
GGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCCGGTCCGGAGAGGGA
GCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGG
GAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTCGGGTCTTGTAAATTGGAATGAGTACAATGTAA
ATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGC

BC Economy Run
9214587 2778862
BirneNS2 NS2

TTCCAATTACAAGACCCGAAAGGGCCCTGTATCGTTATTTATTGTCACCTACCTCCCCGTGTCGGGATTGG
GTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAACCGAAC
CCTTATCCCCGTTACCCGTTGAAACCATGGTAGGCCTCTATCCTACCATCGAAAGTTGATAGGGCAGA
AATTTGAATGAACCATCGCCGGCCCGAGGCCCTGCGATTGACAAGTTATTATGAATCTTCTGGAGTGT
TGATTTTTTATCTAATAAATACAGCCCTTCCGGAGGTTGGGCTTGTGTGCATGTATTAGCTCTAGAATTG
CCAGGCGTATGCCAATTAGCAAGGTAATCAATAAACGATAACTGATTTAATGAGCCATTCGCAGTT
TCACTGTATAGATGTTTATACTTAGACATGCATGGCTTAATCTTTGAGACAAG

Birne reverse complement von NS2 (rückwärts und mit komplementären Basen geschrieben)

CTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACATCTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCA
TTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTGCTAATTGGCATAACGCCTGGCAATTCTAGAGCTAATA
CATGCACACAAGCCCAACCTCCGGAAGGGCTGTATTTATTAGATAAAAAATCAACACTCCAGAAGATTC
ATAATAACTTGTGAATCGCAGGGCCTCGGGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTT
CGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCCGGTCCGGAGA
GGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACA
CGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTCGGGTCTTGTAAATTGGAA

H-Birne_consensus

CTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACATCTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCA
TTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTGCTAATTGGCATAACGCCTGGCAATTCTAGAGCTAATA
CATGCACACAAGCCCAACCTCCGGAAGGGCTGTATTTATTAGATAAAAAATCAACACTCCAGAAGATTC
ATAATAACTTGTGAATCGCAGGGCCTCGGGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTT
CGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCCGGTCCGGAGA
GGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACA
CGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTCGGGTCTTGTAAATTGGAA
TGAGTACAATGTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGC

BC Economy Run
9214586 2778861
KakiNS1 NS1

ATTTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTTCTTTACTACATG
GAATACCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAATCCCAACTTACGAAGGGATGTATTTATTA
GATAAAAATCAATGTCTTCGGACTTCTGATGATTCATAATAACTTTTTCGAATCGCATGGCTTTATGCTG
GCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAAC
GGGTAACGGGGAATAAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAA
GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGC
TTTATGTCTTGAATTGGAATGAGTACAATTTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTG
GC

BC Economy Run
9214588 2778863
KakiNS2 NS2

TTCCAATTACAAGACATAAAGCCCTGTATCGTTATTTATTGTCACTACCTCCCTGAATTAGGATTGGGTA
ATTTGCGCGCTGCTGCCTTCTGGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCT
TATCCCCGTTACCCGTTGAAACCATGGTAGGCCACTATCCTACCATCAAAAGTTGATAGGGCAGAAAT
TTGAATGAACCATCGCCAGCATAAAGCCATGCGATTCGAAAAGTTATTATGAATCATCAGAAGTCCGAA
GACATTGATTTTTATCTAATAAATACATCCCTTCGTAAGTTGGGATTTAAGCATGTATTAGCTCTAGAA
TTACCACAGGTATTCCATGTAGTAAAGAACTATCAAATAAACGATAACTGATTTAATGAGCCATTGCG
AGTTTCACTGTATAAATTGCTTATACTTAGACATGCATGGCTTAATCTTTGAGACAAGC

Kaki reverse complement von NS2 (rückwärts und mit komplementären Basen geschrieben)

GCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCAATTTATACAGTGAAACTGCGAATGGCT
CATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTTCTTTACTACATGGAATACCTGTGGTAATTCTAGAGCTAA
TACATGCTTAAAATCCCAACTTACGAAGGGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTTCT
GATGATTCATAATAACTTTTTCGAATCGCATGGCTTTATGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTA
TCAACTTTTGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTTCGATT
CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAT
CCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCTTTATGTCTTGAATTGGAA

Kaki_consensus

GCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCAATTTATACAGTGAAACTGCGAATGGCT
CATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTTCTTTACTACATGGAATACCTGTGGTAATTCTAGAGCTAA
TACATGCTTAAAATCCCAACTTACGAAGGGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTTCT
GATGATTCATAATAACTTTTTCGAATCGCATGGCTTTATGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTA
TCAACTTTTGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTTCGATT
CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAT
CCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCTTTATGTCTTGAATTGGAATGAGTAC
AATTTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGC

BC Economy Run
9221356 2778869
18SPflaumeNS1 NS1

AGTGA AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTTCTTTACTACATGGAATACC
TGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAATCCCACTTACGAAGGGATGTATTTATTAGATAAAA
AATCAATGTCTTCGACTTCTGATGATTCATAATAACTTTTGAATCGCATGGCTTTATGCTGGCGATGG
TTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAAC
GGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGC
AGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCTTTATG
TCTTGTAAATTGGAATGAGTACAATTTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTC

BC Economy Run
9221357 2778870
18SPflaumeNS2 NS2

ACTCATTCCAATTACAAGACATAAAGCCCTGTATCGTTATTTATTGTCACCTCCCTGAATTAGGATTG
GGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCTTGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAA
CCCTTATTTCCCGTTACCCGTTGAAACCATGGTAGGCCACTATCCTACCATCAAAAGTTGATAGGGCAG
AAATTTGAATGAACCATCGCCAGCATAAAGCCATGCGATTGAAAAGTTATTATGAATCATCAGAAGTC
CGAAGACATTGATTTTTTATCTAATAAATACATCCCTCGTAAGTTGGGATTTAAGCATGTATTAGCTCT
AGAATTACCACAGGTATTCATGTAGTAAAGAACTATCAATAAACGATAACTGATTTAATGAGCCAT
TCGCAGTTTCACTGTATAAATTGCTTATACTTAGACATGCATGGCTTAATCTTTGAGACAAGA

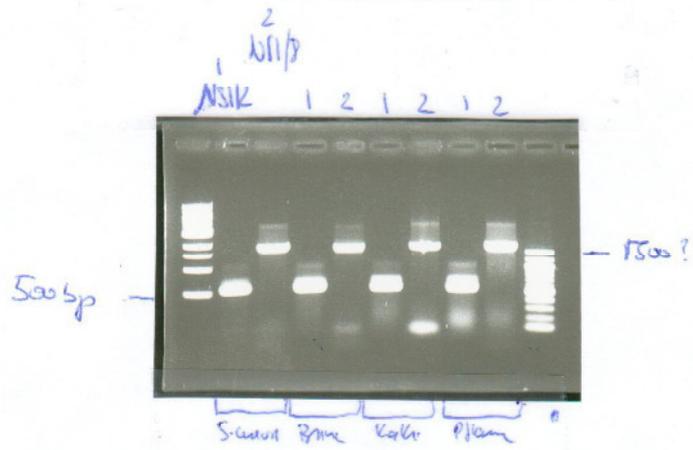
Pflaume reverse complement von NS 2(rückwärts und mit komplementären Basen
geschrieben)

TCTTGCTCAAAGATTAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCAATTTATACAGTGAAACTGCGAATGGCT
CATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTTCTTTACTACATGGAATACCTGTGGTAATTCTAGAGCTAA
TACATGCTTAAAATCCCACTTACGAAGGGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGACTTCT
GATGATTCATAATAACTTTTGAATCGCATGGCTTTATGCTGGCGATGGTTCAATCAAATTTCTGCCCTA
TCAACTTTTGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATT
CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAT
CCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCTTTATGTCTTGTAAATTGGAATGAGT

H-Pflaume_consensus

TCTTGCTCAAAGATTAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCAATTTATACAGTGAAACTGCGAATGGCT
CATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTTCTTTACTACATGGAATACCTGTGGTAATTCTAGAGCTAA
TACATGCTTAAAATCCCACTTACGAAGGGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGACTTCT
GATGATTCATAATAACTTTTGAATCGCATGGCTTTATGCTGGCGATGGTTCAATCAAATTTCTGCCCTA
TCAACTTTTGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATT
CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAT
CCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCTTTATGTCTTGTAAATTGGAATGAGTAC
AATTTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAG

Anhang VI : Gelbanden



Große ✓
 Produkt uniform (wie im Band)

→



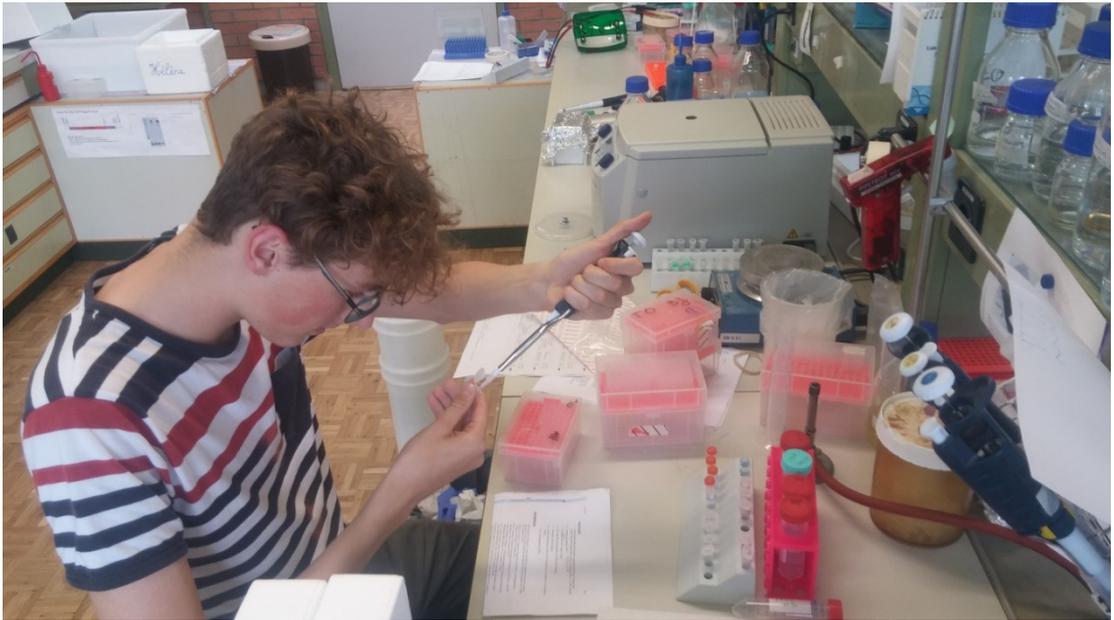
Anhang VII: Diverse Bilder



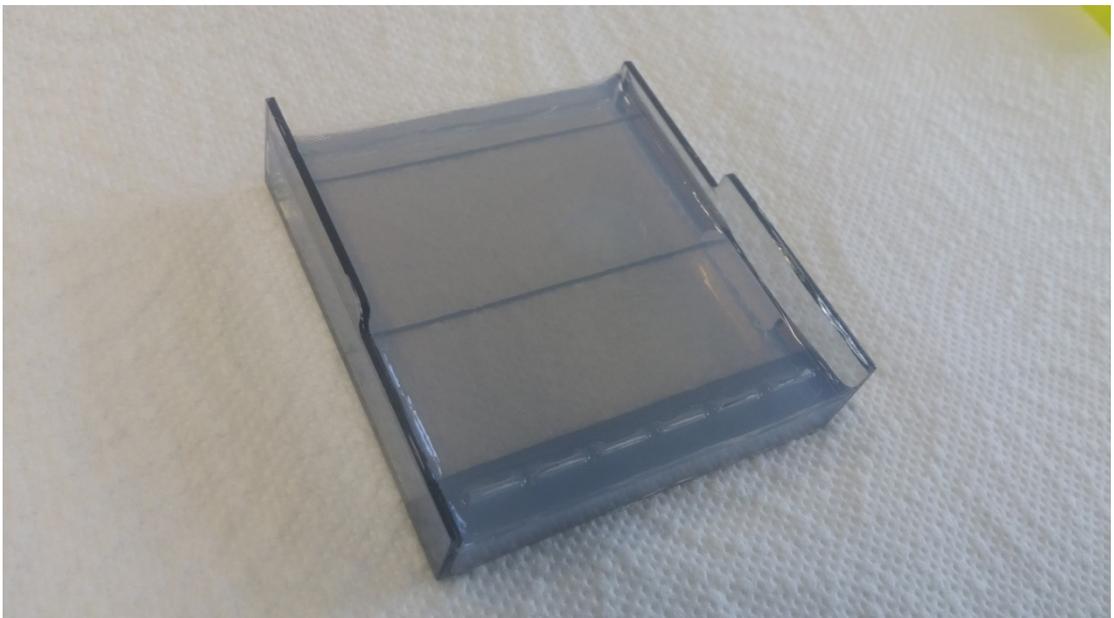
Fruchtsäfte frisch gepresst



Durchführung Dreiösenausstriche



Durchführung DNA-Extraktion



1 % Agarose-Gel



Vorbereitete PCR-Tubes