

Diplomarbeit

Identifizierung und Quantifizierung von Milchsäurebakterien in probiotischen, fermentierten Milchprodukten mittels PCR, DGGE und Real-Time PCR

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Simone Feuerle
Matrikel-Nummer:	0304606
Studienrichtung/ Studienzweig (lt. Studienblatt):	A 474 Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. DI Dr. Helmut K. Mayer Universität für Bodenkultur Wien Dept. für Lebensmittelwissenschaften und -technologie Abteilung Lebensmittelchemie

Wien, im April 2010

Ich danke meinem Betreuer Herrn Ao. Univ. Prof. DI Dr. Helmut K. Mayer für die Ermöglichung meiner Diplomarbeit und die großartige Unterstützung während meiner praktischen Arbeit im Labor.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis.....	IV
II.	Tabellenverzeichnis.....	VIII
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	X
1	Einleitung und Fragestellung.....	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Milchsäurebakterien	2
2.1.1	Milchsäurebakterien allgemein.....	2
2.1.2	Die Gattung <i>Lactobacillus</i>	3
2.1.3	Die Gattung <i>Bifidobacterium</i>	7
2.1.4	Die Gattung <i>Streptococcus</i>	8
2.1.5	Die Gattung <i>Lactococcus</i>	8
2.1.6	<i>Leuconostoc</i>	9
2.2	Functional Food.....	10
2.2.1	Entstehung und Entwicklung von Functional Food.....	10
2.2.2	Probiotika	13
2.2.3	Präbiotika und Synbiotika	16
2.2.4	Gesundheitseffekte von Pro-, Prä- und Synbiotika.....	16
2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.4	Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung.....	23
2.5	Agarosegel-Elektrophorese.....	24
2.6	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE).....	26
2.7	Real-Time PCR.....	28
3	Material und Methoden.....	31

3.1	Eingesetzte Milchsäurebakterien	31
3.2	Eingesetzte Primerpaare.....	33
3.2.1	Milchsäurebakterienprimer.....	33
3.2.2	Lactobacillenedektierende Primer	33
3.2.3	Bifidobakterienidentifizierende Primer	34
3.2.4	Lactococcenerkennende Primer.....	35
3.2.5	Streptococcenerkundende Primer	36
3.3	DNA-Isolierung	37
3.3.1	Funktionsweise der DNA-Isolierung	37
3.3.2	Arbeitsmaterial und Hilfsmittel.....	37
3.3.3	Reagenzien und Chemikalien	38
3.3.4	Puffer und Lösungen.....	39
3.3.5	Gefriertrocknung	40
3.3.6	Durchführung der DNA-Isolierung	40
3.4	Polymerasekettenreaktion	42
3.4.1	Funktionsweise der PCR.....	42
3.4.2	Arbeitsmaterial und Hilfsmittel.....	42
3.4.3	Reagenzien und Chemikalien	43
3.4.4	Puffer und Lösungen.....	43
3.4.5	Durchführung der PCR.....	43
3.5	Agarosegelelektrophorese	45
3.5.1	Funktionsweise der AGE.....	45
3.5.2	Arbeitsmaterial und Hilfsmittel.....	45
3.5.3	Reagenzien und Chemikalien	46
3.5.4	Puffer und Lösungen.....	47
3.5.5	Durchführung der Agarosegelelektrophorese.....	48
3.6	Denaturierende Gradientengelelektrophorese.....	50

3.6.1	Funktionsweise der DGGE	50
3.6.2	Arbeitsmaterial und Hilfsmittel.....	50
3.6.3	Reagenzien und Chemikalien	52
3.6.4	Puffer und Lösungen	52
3.6.5	Durchführung der DGGE	54
3.7	Real-Time PCR.....	57
3.7.1	Funktionsweise der Real-Time PCR	57
3.7.2	Arbeitsmaterial und Hilfsmittel.....	57
3.7.3	Reagenzien und Chemikalien	58
3.7.4	Durchführung der Real-Time PCR	58
4	Ergebnisse und Diskussion	60
4.1	Erstellung einer Lactobacillen-Datenbank	60
4.1.1	Universalprimerpaar HDA1GC/ HDA2	60
4.1.2	Universalprimerpaar GC_LbtufF/ LbtufR.....	63
4.2	Verdünnungsreihen.....	77
4.2.1	Verdünnungsreihe <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^9 - 10^1	77
4.2.2	Verdünnungsreihe <i>Lactobacillus acidophilus</i> 10^9 - 10^1	87
4.2.3	Verdünnungsreihe <i>Streptococcus thermophilus</i> 10^9 - 10^1	96
	Untersuchung von 8 probiotischen Joghurts	105
4.2.4	Vorstellung der Produkte	105
4.2.5	Vorgehensweise der Untersuchung	106
5	Schlussbetrachtung	130
6	Zusammenfassung	132
7	Literaturverzeichnis.....	133
8	Anhang	139
8.1	Abstract.....	139

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bakterienstammbaum [STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H., 1997]	3
Abbildung 2: Polymerasekettenreaktion [BIORON., 2009]	19
Abbildung 3: Agarosegelelektrophorese, [RAPLEY R. und WALKER J.M., 1998]	24
Abbildung 4: Bandenschema einer AGE [GEY M.H., 2008]	25
Abbildung 5: Schema einer DGGE, [ENVIRONMENTAL EXPERT., 2010].....	26
Abbildung 6: DGGE, Referenzstämme, HDA1GC/ HDA2, Gradient: 35-65 %	61
Abbildung 7: DGGE, Referenzstämme, HDA1GC/ HDA2, Gradient: 35-65 %	61
Abbildung 8: DGGE, Leiter, HDA1GC/ HDA2, Gradient: 35-65 %	62
Abbildung 9: DGGE, Leiter, HDA1GC/ HDA2, Gradient: 35-65 %	62
Abbildung 10: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, 59 °C	64
Abbildung 11: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, 59 °C	64
Abbildung 12: DGGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, 59 °C, Gradient: 35-65 %.....	65
Abbildung 13: DGGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, 59 °C, Gradient: 35-65 %.....	65
Abbildung 14: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, Temperaturversuch.....	66
Abbildung 15: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, Temperaturversuch.....	67
Abbildung 16: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, Temperaturversuch.....	67
Abbildung 17: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, Temperaturversuch.....	68
Abbildung 18: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, Temperaturversuch.....	68
Abbildung 19: AGE, DNA-Kontrolle mittels alternativer Primerpaare	69
Abbildung 20: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C	70
Abbildung 21: DGGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C	70
Abbildung 22: DGGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 35-65 %	71
Abbildung 23: DGGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 35-65 %	71
Abbildung 24: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 35-55 %	72
Abbildung 25: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 35-55 %	72
Abbildung 26: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 35-50 %	74

Abbildung 27: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 35-50 %	74
Abbildung 28: Lb 29, AGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C	78
Abbildung 29: Lb 29, AGE mit Rham/ Y2, 55 °C, alte Verdünnung	78
Abbildung 30: Lb 29, AGE mit Rham/ Y2, 55 °C, neue Verdünnung	79
Abbildung 31: Lb 29, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, alte Verdünnung	80
Abbildung 32: Lb 29, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, neue Verdünnung	80
Abbildung 33: Lb 29, Amplifikationskurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	82
Abbildung 34: Lb 29, Schmelzkurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	82
Abbildung 35: Lb 29, Standardgerade, E= 135,6%, $R^2= 0,990$	83
Abbildung 36: Lb 29, Amplifikationskurve, Rham1 /Y2 , 60 °C	84
Abbildung 37: Lb 29, Schmelzkurve, Rham1 /Y2 , 60 °C	85
Abbildung 38: Lb 29, Standardgerade, E= 80,3 %, $R^2= 0,984$	86
Abbildung 39: Lb 19, AGE mit Aci1Neu/ AciCris, 60 °C, alte Verdünnung	87
Abbildung 40: Lb 19, AGE mit Aci1Neu/ AciCris, 60 °C, neue Verdünnung	88
Abbildung 41: Lb 19, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, alte Verdünnung	89
Abbildung 42: Lb 19, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, neue Verdünnung	89
Abbildung 43: Lb 19, Amplifikationskurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	91
Abbildung 44: Lb 19, Schmelzkurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	91
Abbildung 45: Lb 19, Standardgerade, E= 154,4 %, $R^2= 0,881$	92
Abbildung 46: Lb 19, Standardgerade, E= 81,1 %, $R^2= 0,967$	92
Abbildung 47: Lb 19, Amplifikationskurve, Acilneu/ AciCrisJohll, 60 °C	93
Abbildung 48: Lb 19, Schmelzkurve, Acilneu/ AciCrisJohll, 60 °C	94
Abbildung 49: Lb19, Standardgerade, E=77,8 %, $R^2= 0,985$	94
Abbildung 50: Sc 1, AGE mit STherm1/ STherm2, 54 °C, alte Verdünnung	96
Abbildung 51: Sc 1, AGE mit STherm1/ STherm2, 54 °C, neue Verdünnung	97
Abbildung 52: Sc 1, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, alte Verdünnung	97
Abbildung 53: Sc 1, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, neue Verdünnung	98

Abbildung 54: Sc 1, Amplifikationskurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C.....	100
Abbildung 55: Sc 1, Schmelzkurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C.....	100
Abbildung 56: Sc 1, Standardgerade, E=173,0 %, $R^2=0,870$	101
Abbildung 57: Sc 1, Amplifikationskurve, STherm1/ STherm2, 57 °C.....	102
Abbildung 58: Sc 1, Schmelzkurve, STherm1/ STherm2, 57 °C.....	102
Abbildung 59: Sc 1, Standardgerade, E=46,3 %, $R^2=0,997$	103
Abbildung 60: AGE, PbiF1/ PbiR2, 54 °C, Bifidobakterien.....	107
Abbildung 61: AGE, LWA/ LWB, 55 °C, <i>Bf. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	107
Abbildung 62: AGE, BiLON-1/ BiLON-2, 55 °C, <i>Bf. longum</i>	108
Abbildung 63: AGE, BiInf-1/ BiInf-2, 66 °C, <i>Bf. infantis</i>	108
Abbildung 64: AGE, BiBIF-1/ BiBIF-2, 60 °C, <i>Bf. bifidum</i>	109
Abbildung 65: AGE, BiADO-1/ BiADO-2, 60 °C, <i>Bf. adolescentis</i>	109
Abbildung 66: AGE, Para/ Y2, 56 °C, <i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	110
Abbildung 67: AGE, Rham/ Y2, 55 °C, <i>Lb. rhamnosus</i>	111
Abbildung 68: AGE, AciI Neu/ AciCrisJohII, 62 °C, <i>Lb. acidophilus</i>	111
Abbildung 69: AGE, Del20A/ Del23B, 60 °C, <i>Lb. delbrueckii</i>	112
Abbildung 70: AGE, Bulg34/2/ Bulg37/1, 67 °C, <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	112
Abbildung 71: AGE, Lreu1/ Lreu4, 58 °C, <i>Lb. reuteri</i>	113
Abbildung 72: AGE, JohI/ AciCrisJohII, 60 °C, <i>Lb. johnsonii</i>	113
Abbildung 73: AGE, gadB21F_Lc/ GAD7r_Lc, 50 °C, Lc 1/3 und Lc 2	114
Abbildung 74: AGE, LLhis3F/ LLhis4R, 45 °C, <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	115
Abbildung 75: AGE, Lhis5F/ Lhis6R, 46 °C, Lc 1 und Lc 3.....	115
Abbildung 76: AGE, Lchis1F/ Lchis2R, 44 °C, <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	116
Abbildung 77: AGE, STherm1/ STherm2, 54 °C, <i>Streptococcus thermophilus</i>	116
Abbildung 78: DGGE, Biac, HDA1GC/ HDA2, 54 °C.....	117
Abbildung 79: DGGE, Carrefour Sanus, HDA1GC/ HDA2, 54 °C.....	118
Abbildung 80: DGGE, Voll Fit Pur, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	118

Abbildung 81: DGGE, Milfina Heidelbeere, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	119
Abbildung 82: DGGE, Milfina Lactiv, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	119
Abbildung 83: DGGE, Minus L, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	120
Abbildung 84: DGGE, Nöm Fasten, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	120
Abbildung 85: DGGE, Spar, natur pur, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	121
Abbildung 86: DGGE, Gradient 40-55 %, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	124
Abbildung 87: DGGE, Gradient 40-55 %, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	125
Abbildung 88: DGGE, Bifidobakterien, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	126
Abbildung 89: DGGE, Lactobacillen, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	127
Abbildung 90: AGE, <i>Lb. sakei</i> ssp. <i>curvatus</i> , <i>Lb sakei</i> ssp. <i>sakei</i> , 50 °C	127
Abbildung 91: DGGE, <i>Pediococcus pentosaceus</i> 159, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	128
Abbildung 92: Sc 1, Amplifikationskurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	140
Abbildung 93: Sc 1, Schmelzkurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	140
Abbildung 94: Sc 1, Standardgerade, $R^2=0,993$, $E=93,9\%$,	141
Abbildung 95: DGGE, GC_LbtufF/ LbtufR 56 °C, Gradient: 35-65 %	141
Abbildung 96: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 38-50 %	142
Abbildung 97: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 38-50 %	142
Abbildung 98: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 40-50 %	143
Abbildung 99: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 40-50 %	143
Abbildung 100: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 40-55 %	144
Abbildung 101: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient 40-55 %	144
Abbildung 102: AGE, Temperaturversuch mit PbiF1/ PbiF2	145
Abbildung 103: AGE, LONU7/ LONU8, 67 °C, <i>Bf. longum</i>	145
Abbildung 104: AGE, BreU3/ BeL4, 67 °C, <i>Bf. breve</i>	146
Abbildung 105: AGE, Lact33/ Lact37A, 50 °C, <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	146
Abbildung 108: DGGE, Lactococcen, 35-65 %, HDA1GC/ HDA2, 54 °C	147
Abbildung 109: DGGE, <i>Leuconostoc</i> , HDA1GC/ HDA2, 54 °C	147

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingesetzte Milchsäurebakterien	31
Tabelle 2: Milchsäurebakterienprimer	33
Tabelle 3: Lactobacillenprimer	33
Tabelle 4: Bifidobakterienprimer.....	34
Tabelle 5: Lactococcenprimer	35
Tabelle 6: Streptococcenprimer	36
Tabelle 7: Arbeitsgeräte für DNA-Isolierung	37
Tabelle 8: Chemikalien für die DNA-Isolierung	38
Tabelle 9: Lösungen für die DNA-Isolierung.....	39
Tabelle 10: Arbeitsgeräte für die PCR.....	42
Tabelle 11: Chemikalien für die PCR	43
Tabelle 12: Lösungen für die PCR	43
Tabelle 13: PCR-Temperaturprogramm	44
Tabelle 14: Arbeitsgeräte für die AGE.....	45
Tabelle 15: Chemikalien für die AGE	46
Tabelle 16: Lösungen für die AGE	47
Tabelle 17: Arbeitsgeräte für die DGGE.....	50
Tabelle 18: Chemikalien für die DGGE	52
Tabelle 19: Lösungen für die DGGE	52
Tabelle 20: Gelgradienten für die DGGE.....	54
Tabelle 21: Arbeitsgeräte für die Real-Time PCR.....	57
Tabelle 22: Chemikalien für die Real-Time PCR	58
Tabelle 23: Real-Time PCR, Temperaturprogramm	59
Tabelle 24: Vergleich der Primerpaare HDA1GC/ HDA2 und GC_LbtufF/ LbtufR	75
Tabelle 25: Lb 29, Temperaturprogramm, HDA1GC/ HDA2.....	81
Tabelle 26: Lb 29, Threshold Cycle.....	83

Tabelle 27: Lb 29, Temperaturprogramm, Rham1 /Y2	84
Tabelle 28: Lb 29, Threshold Cycle	85
Tabelle 29: Lb 19, Treshold Cycle	90
Tabelle 30: Lb 19, Temperaturprogramm, Acilneu/ AciCrisJohll,.....	93
Tabelle 31: Lb 19, Threshold Cycle	95
Tabelle 32: Sc 1, Threshold Cycle	99
Tabelle 33: Sc 1, Temperaturprogramm, STherm1/ STherm2.....	101
Tabelle 34: Sc 1, Threshold Cycle	103
Tabelle 35: Identifizierung und Quantifizierung der MSB in den ersten 4 Joghurtproben	122
Tabelle 36: Identifizierung und Quantifizierung der MSB in den weiteren 4 Joghurtproben	123

III. Abkürzungsverzeichnis

AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
AGE	Agarosegelelektrophorese
AtCC	American Type culture Collection, Rockville, Md, USA
Bf.	<i>Bifidobacterium</i>
biovar	Biovarietät
bp	base pair = Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin
CFU	colony-forming unit
CT	Threshold Cycle
CUETM	Collection Unité Ecotoxicologie, Villeneuve d'Ascq, France
dest	destilliert
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNS= DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
FAO	Food and Agriculture Organization
FRET	Flourescence Resonance Energy Transfer
G + C	Basen: Guanin und Cytosin
glasdest	glasdestilliert
GRAS	Generally Recognize As Safe
KBE	Koliniebildende Einheit
Lb.	<i>Lactobacillus</i>

Lc.	<i>Lactococcus</i>
LGG	<i>Lactobacillus</i> Goldin und Gorbach
LMG	Institut für Lab. voor Microbiologie Gent, Gent, Belgium = BCCM
mA	Milliampere
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
MSB	Milchsäurebakterien
NTC	No template control
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
RAPD	Randomly Amplified Poymorhic DNA
Reuter	Institut für Fleischhygiene- und Technologie, Freie Universität, Berlin
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
rRNS= rRNA	Ribonukleinsäure
Sc.	<i>Streptococcus</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel
ssp.	Subspezies
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UHQ	Ultra High Quality
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

1 Einleitung und Fragestellung

Milchsäurebakterien – kleine Multitalente – sind nicht wegzudenken aus dem täglichen Leben, denn sie sind in Lebensmitteln wie Milchprodukten, Wurst, Sauerteig, fermentierten Getränken und Gemüsen, in Silage, auf Pflanzen und im Abwasser sowie im Intestinal-, Genital- und Respirationstrakt von Menschen und Tieren nachweisbar.

Sie haben in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen, da sie nicht nur in Starterkulturen für fermentierte Milchprodukte eingesetzt werden, sondern auch in probiotischen Produkten einen zusätzlichen gesundheitlichen Nutzen versprechen.

Erstens wurde eine Lactobacillen-Datenbank in Form einer Leiter mit denaturierender Gradientengelelektrophorese, mit zwei verschiedenen Universal-Primerpaaren, erstellt, um den Nachweis dieser Milchsäurebakterien in weiteren Produkten zu verkürzen.

Mit den Bakterien *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Streptococcus thermophilus* wurden Verdünnungsreihen hergestellt um mittels Agarosegelelektrophorese, denaturierender Gradientengelelektrophorese und Real-Time PCR die Bakterien- bzw. methodenspezifische Nachweisgrenze zu bestimmen.

Als drittes Projekt wurden 8 probiotische Joghurts, davon 3 Joghurt drinks, näher unter die Lupe genommen und mittels Agarosegelelektrophorese (Genus-, Spezies-, und Subspezies-spezifische Tests) und denaturierender Gradientengelelektrophorese die enthaltenen Milchsäurebakterien nachgewiesen.

2 Literaturübersicht

2.1 Milchsäurebakterien

2.1.1 Milchsäurebakterien allgemein

Milchsäurebakterien bezeichnen eine heterogene Gruppe grampositiver, kokken- und stäbchenförmiger, unbeweglicher Bakterien, die als wichtigstes Stoffwechselprodukt Milchsäure produzieren, Katalase-negativ sind und keine Endosporen ausbilden. Die größte Bedeutung und ihren wirtschaftlichen Nutzen haben sie in der Verwendung als Starterkulturen in fermentierten Milch- und Fleischprodukten, sowie in milchsauren, pflanzlichen Lebensmitteln. Die klassischen Haltbarmachungsverfahren basieren auf Milchsäuregärung, welche auch bei der Produktion von Silage eine lange Tradition besitzen. Nach aktuellen taxonomischen Erkenntnissen umfasst der Begriff Milchsäurebakterium hauptsächlich die Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* und *Enterococcus*- im Weiteren auch *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* und *Weissella* [STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H., 1997]. *Bifidobakterien* sind zwar auf phylogenetischer Ebene nur entfernt mit den Milchsäurebakterien verwandt, werden jedoch aufgrund ihrer probiotischen Eigenschaften in der Milchindustrie häufig angewendet [KLEIN G. et al., 1998].

Die Gram-positiven *Eubacteria* lassen sich nach den Sequenzierungsergebnissen von 16S und 23S rRNA in zwei Untergruppen einteilen: die *Clostridium*-Untergruppe mit einem G+C-Anteil von < 55 mol%, die unter anderem die Gattungen *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* und *Weissella* enthalten, und die *Actinomycetes*-Untergruppe mit einem G+C-Anteil von > 55 mol%, die für die Lebens- und Futtermittel bedeutende Gattungen wie *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* und *Brevibacterium* enthalten [STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H., 1997].

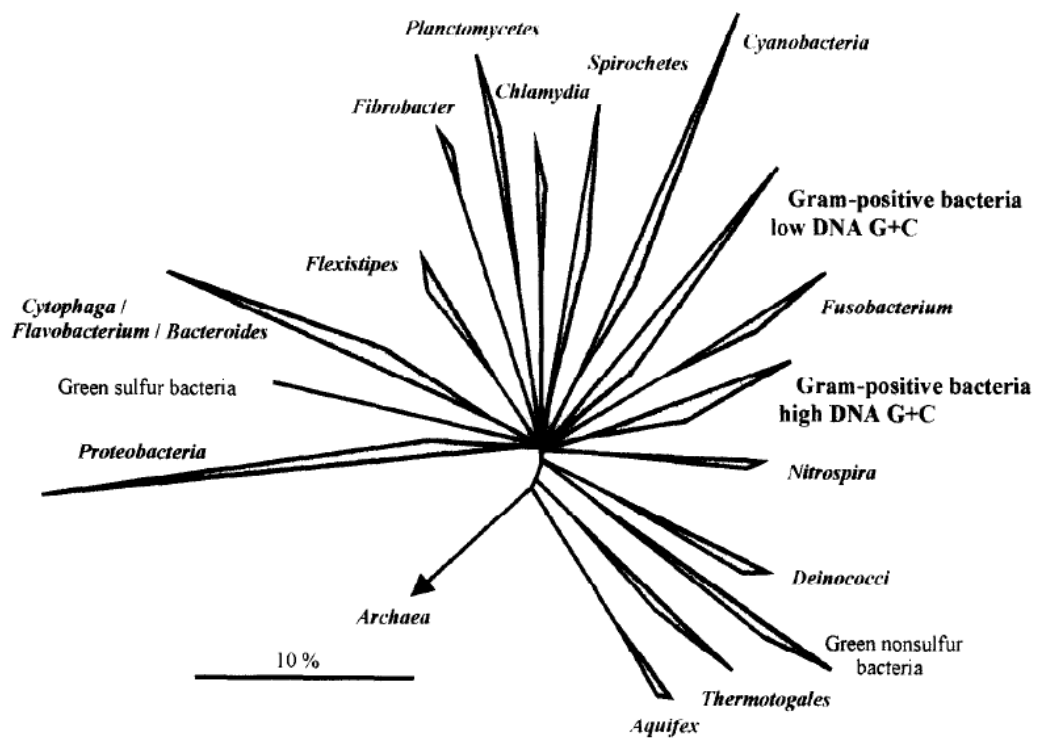


Abbildung 1: Bakterienstammbaum [STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H., 1997]

2.1.2 Die Gattung *Lactobacillus*

1901 wurde von Beijerinck die Gattung *Lactobacillus* das erste Mal erwähnt und ist taxonomisch der Ordnung *Eubakteriales*, der Familie der *Lactobacillaceae* und dem Tribus *Lactobacilleae* zugeordnet. Sie beinhaltet heute mehr als 60 unterschiedliche Arten [SCHLEIFER K. H. und LUDWIG W., 1995], daher ist sie, im Hinblick auf den G+C-Anteil der DNS, der sich von 32-55 mol% erstreckt, als sehr heterogen zu bezeichnen. Der G+C-Anteil innerhalb einer Gattung sollte nicht mehr als 10 mol% variieren [STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H., 1997]. Andere Quellen gehen von 106 [FELIS G. E. und DELLAGLIO F., 2007] oder sogar >145 Arten [CLAESSON M. J. et al., 2008] der Gattung *Lactobacillus* aus. Die Gattung *Lactobacillus* stellt den größten Anteil innerhalb der *Lactobacteriaceae* dar, weshalb schon sehr früh versucht worden ist, sie in Gruppen zu unterteilen. Die Spezies werden nach biochemisch-physiologischen Kriterien in drei Gruppen eingeteilt:

Obligat homofermentative Lactobacilli: Sie verfügen über Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase und vergären Hexosen über den Emden–Meyerhof-Parnas-Weg zu Milchsäure. Da sie keine Phosphoketolase besitzen, können sie weder Gluconat noch Pentosen fermentieren.

Fakultativ heterofermentative Lactobacilli: Hexosen werden über den Emden–Meyerhof-Parnas-Weg überwiegend zu Milchsäure abgebaut, als Nebenprodukte werden Essigsäure, Äthanol und Ameisensäure gebildet. Sie besitzen eine, durch Zugabe von Pentosen induzierbare Phosphoketolase, sodass sie neben Hexosen auch Pentosen vergären können.

Die dritte Gruppe bilden die obligat heterofermentativen Lactobacilli: Sie bauen Hexosen über den 6-Phosphogluconat-Weg zu Milchsäure ab und bilden daneben noch Äthanol, Essigsäure und andere organische Säuren, wie Ameisensäure, sowie erhebliche Mengen an CO₂ [FELIS G. E. und DELLAGLIO F., 2007; HAMMES W.P. und VOGEL R.F., 1995; STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H., 1997].

Diese Einteilung wird nach Einführung der molekularbiologischen Taxonomie in Frage gestellt, da sie keine klare Gruppentrennung zulässt, denn morphologisch so unterschiedliche Gattungen wie *Lactobacillus*, *Leuconostoc* und *Pediococcus*, sind phylogenetisch sehr eng miteinander verwandt.

Laut Collins et al. können *Lactobacillen* und verwandte Gattungen in drei Gruppen phylogenetisch klassifiziert werden:

- Die erste Gruppe setzt sich aus Vertretern der *Lactobacillus acidophilus*-Gruppe, *Lb. delbrueckii* und weiteren obligat homofermentativen Lactobacillen zusammen. Außerdem ordnet man dieser Gruppe auch einige heterofermentative Lactobacillen zu.
- Die zweite Gruppe integriert als Größte mehr als dreißig *Lactobacillus*-Spezies und fünf *Pediococcus*-Spezies. Weiters beinhaltet diese Gruppe obligat homofermentative, wie *Lb. salivarius*, fakultativ heterofermentati-

ve, wie *Lb. casei* und *Lb. plantarum*, und obligat heterofermentative *Lactobacillen*, wie *Lb. brevis* und *Lb. fermentum*.

- Die dritte Gruppe inkludiert alle Vertreter der Gattung *Leuconostoc* und verschiedene obligat heterofermentative *Lactobacilli*, wie *Lb. fructosus* [COLLINS M. D. et al., 1991; MAYER H. K. et al., 1998; SCHLEIFER K. H. et al., 1995].

„***Lb. acidophilus*-Gruppe**“ ist eine Zusammenfassung der *Lactobacilli*: *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri* und *Lb. johnsonii*, die aus dem früheren Taxon *Lb. acidophilus* abgetrennt wurden. Im Endeffekt werden die Vertreter dieser Homologiegruppe als eigenständige Spezies beschrieben [MAYER H. K. et al., 1998; SCHLEIFER K. H. und LUDWIG W., 1995; STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H., 1997].

Um die „***Lb. casei*-Gruppe**“, vor allem *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* und *Lb. zeae*, herrscht seit Jahrzehnten Unklarheit in der Klassifikation und Nomenklatur [DESAI A. R. et al., 2006]. Wie DNS-Homologiestudien gezeigt haben ist die Mehrheit der Vertreter dieser Subspezies phylogenetisch sehr nah miteinander verwandt, unterscheiden sich aber deutlich vom Typstamm *L. casei ssp. casei* [MAYER H. K. et al., 1998]. Es wird von Dicks et al. eine Reklassifikation von *Lb. casei ssp. casei* und *Lb. rhamnosus* als *Lb. zeae* vorgeschlagen und zudem als neuer Typstamm von *L. casei ssp. casei* nahegelegt [DICKS L. M. T. et al., 1996; KLEIN G. et al., 1998; MAYER H. K. et al., 1998]. *Lb. casei* und *Lb. paracasei* sind Stämme des selben Taxons, können somit als *Lb. casei* zusammengefasst werden und der Speziesname *Lb. paracasei* wird damit überflüssig [DELLAGLIO F. et al., 2002; MAYER H. K. et al., 1998].

In einer Studie von Zhuang et al. sind seit 2004 aus Eselmilch 240 *Lactobacillen*stämme isoliert worden, wobei einer davon – *Lb. casei Zhang* – näher unter die Lupe genommen worden ist. In vitro Tests haben gezeigt, dass dieses Bakterium eine gute Stabilität gegenüber Magensaft und Gallensalzen aufweist, ähnlich *Lb. rhamnosus GG*, *L. casei Shirota* und *Bf. animalis*. Außerdem ist eine höhere Säureproduktions- und proteolytische Aktivität während der gekühlten Lagerung von fermentierten Milchprodukten, die diesen Stamm enthalten, festgestellt worden [GUO Z. et al., 2009].

Minelli et al. haben *Lactobacillus casei*-Stämme für die Produktion von funktionellen Milchprodukten untersucht. Probiotische Milchsäurebakterien versprechen das Immunsystem zu fördern, die Darmgesundheit zu verbessern, vor gastrointestinalen Krankheiten zu schützen, Lebensmittelunverträglichkeiten zu reduzieren und vor Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen zu schützen. Dazu ist wichtig MSB zu verwenden, die sehr aktiv sind und den Gastrointestinalen Stress überleben. Weiters sollen sie technologisch leicht herstellbar, eine gute Stabilität in Milch aufweisen, säurebildungsfähig sein und natürlich einen guten Geschmack haben. Es wurden für diese Studie verschiedene *Lactobacillus casei*-Stämme verwendet, die alle ihren Ursprung im Lebensmittelbereich haben. Von den 17 getesteten *Lb. casei*-Stämmen, haben 6 ein Produkt mit ausgezeichnetem Geschmack und Struktur ergeben, außerdem hat sich eine beachtliche Anzahl an Bakterien während einer 28-tägigen Kühlagerung gehalten. Zusätzlich wurde im Rattenversuch die Anwesenheit dieser Stämme im Fäzes nachgewiesen, was auf eine gute Stabilität hinweist, da die Bakterien die Darmpassage überlebt haben [MINELLI E.B. et al., 2004].

2.1.3 Die Gattung *Bifidobacterium*

„*Bifidus*“ kommt aus dem Lateinischen und bedeutet: gespalten, gabelförmig. Die Bifidobakterien wurden erstmals um 1900 aus Säuglingsstuhl isoliert und als „*Bacillus bifidus*“ benannt. Die Bifidobakterien bilden Milchsäure und Essigsäure im Verhältnis 2:3, ohne Bildung von CO₂, wobei geringe Mengen an Ameisensäure, Äthanol und Bernsteinsäure gebildet werden. Das Schlüsselenzym bei der Glucosevergärung, das sie von anderen MSB unterscheidet, ist die Fructose-6-Phosphat-Phosphoketolase, die Fructose-6-Phosphat zu Acetyl-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat spaltet. Derzeit beinhaltet die Gattung *Bifidobacterium* 31 Spezies, wobei 12 davon menschlichen (in Darm-, Scheiden- und Mundflora), 17 tierischen Ursprungs und 2 aus Abwasser entstammen. Für probiotische Kulturen in fermentierten Milchprodukten werden in erster Linie vier Spezies menschlichen Ursprungs: *Bf. bifidus*, *Bf. longum*, *Bf. infantis* und *Bf. breve*, weiters eine Spezies tierischen Ursprungs: *Bf. animalis* eingesetzt. Als Schutzfaktor gegen enterale Pathogene und Stimulans für das Immunsystem sind sie vorrangig in der Darmflora brusternährter Säuglinge zu finden [MAYER H. K. et al., 1998]. Molekulare Technologien und Metagenomik (versucht mit modernen molekularbiologischen Methoden die Gesamtheit der Mikroorganismen eines Biotops zu erfassen) haben das Interesse an der mikrobiellen Darmflora in Bezug auf Ernährung, Gesundheit und Krankheit renoviert und einen förderlichen Effekt von Bifidobakterien und Lactobacillen bestätigt. Die Genomic der Bifidobakterien und Lactobacillen hat das Verständnis über die Diversität und Funktion dieser Bakterien vorangetrieben [KLEEREBEZEM M. und VAUGHAN E.E., 2009].

2.1.4 Die Gattung *Streptococcus*

Der Gattungsname bezeichnet die kokkal (= rundlich) geformten kettenbildenden Bakterien, welche mit Wundinfektion assoziiert werden und von Rosenbach 1884 erstmals beschrieben worden sind [STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H., 1997]. Es sind 50 Arten und Unterarten an Streptococcen bekannt. Die meisten stammen aus dem Mundraum und Respirationstrakt von Wirbeltieren. Viele von ihnen können beim Übertritt ins Blut zu einer Herzinnenhautentzündung (=Endokarditis) führen. Des Weiteren spielen einige bei der Kariesentstehung eine wesentliche Rolle und rufen Hals-Nasen-Ohren-Infektionen hervor. Es wird nur eine Spezies dieser Gattung als Starterkultur in der Milchwirtschaft für Joghurt und hocherhitzte Käse verwendet: *Sc. thermophilus* [LIMSOWTIN G. K. Y. et al., 2002]. *Sc. thermophilus* hat die besten Wachstumsbedingungen bei einer Temperatur zwischen 45 °C und 50 °C [STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H., 1997].

2.1.5 Die Gattung *Lactococcus*

Die Gattung *Lactococcus* beinhaltet 5 Arten (*Lc. lactis*, *Lc. garvieae*, *Lc. plantarum*, *Lc. piscium* und *Lc. raffinolactis*), wobei *Lc. lactis* die größte Bedeutung zukommt. Es werden lediglich *Lc. lactis* ssp. *lactis* und *Lc. lactis* ssp. *cremoris* als Starterkulturen in fermentierten Produkten verwendet [CASALTA E. und MONTEL M.C., 2008; STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H., 1997]. Die Subform von *Lc. lactis* ssp. *lactis*: *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* kann Citrat metabolisieren und CO₂ und Diacetyl produzieren, welche das typische Aroma für kultivierte Butter und Goudakäse erzeugen [LIMSOWTIN G. K. Y. et al., 2002].

Lc. lactis ist der erste Stamm gewesen, der auf molekularer und genetischer Ebene umfassend charakterisiert worden ist, daher ist er interessant als „bakterielles Produktionslabor“ für heterologe Proteine und als In-situ-Verabreichungssystem für biologisch aktive Moleküle. ActoBiotics™ ist ein Bei-

spiel für diese genmodifizierten Biopharmazeutika, die therapeutische Peptide und Proteine im Darmtrakt synthetisieren und sezernieren und daher direkte Anwendung im Menschen bei entzündlichen und allergischen Krankheiten umfasst [ACTOGENIX NV., 2007]. Ein Beispiel ist die Behandlung von Entero-kolitis mit *Lc. lactis*, die so genmodifiziert worden sind, dass sie *Yersinia pseudotuberculosis* und V-Antigen exprimieren und somit die Möglichkeiten der therapeutischen Interventionen um pathogenderivierte Faktoren erweitert [FOLIGNE B. et al., 2007].

Zusammenfassend kann man sagen, dass genmodifizierte Bakterien einen überaus eleganten Weg der Verabreichung therapeutischer Medikamente bieten. Zudem sind sie kostengünstige Sezernierungsvehikel für ein breites Spektrum bioaktiver Moleküle. In präklinischer und klinischer Entwicklung findet man in fortgeschrittenen Stadien genmodifizierte *Lc. lactis*-Stämme, wie in ActoBio-tics™. Diese gut ausgeklügelten biologischen Medikamente werden nicht nur aufgrund ihrer hohen Sicherheit interessanter, sondern lassen auch die Patienten-Compliance wesentlich steigen [ACTOGENIX NV., 2007].

2.1.6 *Leuconostoc*

Diese Gram-positiven Bakterien haben kokkoide bis ovale Form, sind Katalase-negativ und der Glucoseabbau erfolgt über den Hexose-Monophosphat-Weg. Es werden 10 Arten gezählt, wobei 3 Unterarten für *Leuconostoc mesenteroides* definiert sind *Lc. mesenteroides ssp. cremoris*, *Lc. mesenteroides ssp. dextranicum* und *Lc. mesenteroides ssp. mesenteroides* [BISCHOFF S.C., 2009; WEBER H., 1996]. Es wird eine geringe ansäuernde Aktivität in der Literatur beschrieben, dies läuft mit dem heterofermentativen Metabolismus konform [NIETO-ARRIBAS P. et al., 2010]. Technologisch werden sie in Starterkulturen als Ausbildner von Aroma und Textur angewendet. Einen Nachteil stellen sie als Fäulniserreger in der Rohrzuckerherstellung und in der Lebensmittel-industrie als Schlickbildner dar [HEMME D. und FOUCAUD-SCHEUNEMANN C., 2003].

2.2 Functional Food

2.2.1 Entstehung und Entwicklung von Functional Food

Als Promotor des erfolgreichsten Functional Food, Joghurt, geht 1906 der in Paris tätige Nobelpreisträger Elie Metschnikoff hervor. Er kombiniert bakteriologische und epidemiologische Forschungsergebnisse zu einer gezielten Ernährungsempfehlung und schreibt dem neuen Bakterium, *Bacillus bulgaricus*, die Fähigkeit, sich im Darm anzusiedeln und somit Darmfäulnis durch ein verbessertes Bakterienmilieu vorzubeugen, zu. Ein weiterer Meilenstein der Geschichte wird in den 1920er Jahren, in den USA entwickelt, die so genannte „Acidophilusmilch“ und 1925 wird für „Acimil“, das ernähren, entgiften und verjüngen soll, geworben. Darauf folgt 1926 die Gesundheitsmilch „Saya“, das „Volksgetränk der Zukunft“, wie es damals geheißen hat. In der zweiten Hälfte der 1960er Jahren setzen sich Joghurt und die neuen Lebensmittel dann erst richtig massenhaft durch, als Fruchtzusätze den Geschmack dieser entscheidend verbessern und zudem alle Vorteile eines „Convenience“-Produkts aufweisen [SPIEKERMANN U., 2002].

Der Begriff Functional Food beschreibt Lebensmittel oder Bestandteile eines Lebensmittels, denen über die Zufuhr von Nährstoffen hinaus ein zusätzlicher Nutzen, wie Steigerung des Wohlbefindens und Erhalt der Gesundheit, zugesprochen wird. In erster Linie dient Functional Food der Prävention von Krankheiten und der Reduktion des Krankheitsrisikos. Functional Food ist vor allem in den Bereichen Milch- und Milchprodukte, alkoholfreie Getränke, Backwaren, Getreideprodukte, Süßwaren und Brotaufstriche zu finden. Da die Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Diabetes mellitus, Karies, Osteoporose und Übergewicht im Vordergrund steht, erstreckt sich die Zielgruppe durch alle Altersklassen [KUNZ C., 2005] - jedoch zeigt ein semistrukturiertes Tiefeninterview, dass jüngere Verbraucher funktionelle Lebensmittel eher positiv bis nur leicht kritisch einschätzen und diesen Produkten und Bewerbungen Vertrauen schenken. Im Gegensatz dazu die älteren Verbraucher, die grund-

sätzlich kritisch bis ablehnend dieser Produktgruppe gegenüberstehen und sie kaum kaufen [KÖNIG H., 2005; MENRAD K., 2005].

Die wichtigsten funktionellen Wirkstoffe sind derzeit Pro-, Prä- und Synbiotika, Antioxidantien, sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, strukturierte Lipide, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Fettersatz- und -austauschstoffe, bioaktive Peptide, Ballaststoffe, Vitamine und Mineralstoffe. Für die Produktentwicklung, Forschung und Produktion von Functional Food wird eine Vielzahl traditioneller und neuer Technologien eingesetzt, die von Fermentations- oder enzymatischen Prozessen bis hin zu neu entwickelten Ansätzen, wie High-Throughput-Screening (Hochdurchsatz-Screening) und Mikrokapseln führen.

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die Gentechnik in diesem Zusammenhang eine Technologie darstellt, die gerade in der Entwicklung von Functional Food, wie die Herstellung eines probiotischen *Lactobacillus*-Stammes, die Möglichkeiten der Entwicklung expandieren würde.

Der Marktanteil von funktionellen Milchprodukten in Deutschland verzeichnet einen jährlichen Zuwachs, wie der Anstieg vom Jahr 1995, Marktvolumen von 5 Millionen €, bis 2001, Marktvolumen von 357 Millionen €, unschwer erkennen lässt. Derzeit nimmt der Markt für probiotische Joghurts mehr als 20 % des gesamten deutschen Joghurtmarktes ein [DUNSTMANN H., 2006; MENRAD K., 2005]. Die Forscher der Delphi-Studie prognostizieren für die nächsten 10 Jahre ein ständiges Wachstum des Anteils funktioneller Lebensmittel am Lebensmittel-gesamtmarkt [DUNSTMANN H., 2006].

Der Markt an probiotischen Milchdrinks steigt genauso rapide an und betrug 2006, in Westeuropa, USA und Japan zusammengefasst 999 Millionen Liter und wird wie vorausgesagt noch auf 1.600 Liter im Jahr 2011 steigen. Mit der Nachfrage wachsen die Ansprüche und Anbieter - in Dänemark z.B. ist 2007 ein neuer probiotischer Drink auf den Markt gekommen „My Whey™, the next generation of dairy beverages“, wie es heißt. Dieses Produkt vereint hohe Nährstoffansprüche, hat einen natürlichen Geschmack mit Joghurnote und ist

ein „Convenience“-Produkt, ein probiotischer Drink-Shot, der unterwegs verzehrt werden kann [AHRENSBACH K., 2008].

Kritisch und mit Vorsicht sind die gesundheitsbezogenen Werbeaussagen mancher Herstellerfirmen zu betrachten, denn sie sind verkaufsorientiert und können durchaus für Verwirrung sorgen und den Verbraucher in die Irre führen. Anfänglich präsentiert der Europarat 2000 die ersten supranationalen „Guidelines“ zur Substantiierung von Health Claims für funktionelle Lebensmittel, dann folgen Ausarbeitungen des Codex Alimentarius und auch der EU Kommission. In der Zwischenzeit gelten Regelungen des „Codes of Practice“, die gemeinsam von Industrie, Verbraucherverbänden und Behörden entwickelt worden sind [MÜLLER D., 2005]. Im Gegensatz zu Europa sind in Japan Deklarationen gesundheitsbezogener Eigenschaften erlaubt, diese Produkte heißen dort: FOSHU – „Foods for specific health use“, also Lebensmittel für gesundheitsspezifische Anwendungen. In den meisten europäischen Ländern gilt es als Grundprinzip, dass der Konsument durch Produktangaben nicht irregeführt und bei Lebensmitteln keine therapeutische Wirkung ausgelobt werden darf [KNEIFEL W. B.C., 1998; MATIASKE B., 2005].

Am 01.07.2007 tritt die Verordnung EG Nr. 1924/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel in Kraft, in der ein Verbotsprinzip mit Erlaubnisvorbehalt „was nicht erlaubt ist, ist verboten“, zudem ein strenger Wissenschaftsvorbehalt „zulässig ist nur, was durch anerkannte wissenschaftliche Erkenntnisse nachgewiesen ist“, gelten [MÜLLER M., 2007]. Bei fast der Hälfte der negativen Bewertungen der EFSA war die Substanz, auf die sich eine bestimmte Angabe bezog, nur unzureichend beschrieben, was beispielsweise bei probiotischen Bakterien und pflanzlichen Stoffen der Fall ist [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY., 2009].

2.2.2 Probiotika

„Probiotika sind definierte lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und hierbei positive gesundheitliche Wirkungen erzielen“, Definition nach Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin 1999 in Berlin. Die Definition der FAO und WHO betont das Lebendig Sein und definiert Probiotika als „live microorganisms, which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host“. Pro bios (= „für das Leben“), denn durch regelmäßige Zufuhr mit der Nahrung können solche Bakterien vermehrt werden und somit gesundheitsschädliche Keime im Darm verdrängen [KNEIFEL W. und BONAPARTE C., 1996b; MAYER H. K. et al., 1998].

Im österreichischen Milchwirtschaftlichen Bericht von 1996 beschreibt Univ. Prof. DI Dr. Kneifel ein Probiotikum als *„Lebensmittelsupplement in Form lebender Mikro-organismen, welches die Gesundheit des Wirtsorganismus in einer über die Eigenschaft des Lebensmittels als Nährstoff hinausgehende Weise positiv beeinflusst“* und teilt die positiven gesundheitlichen Effekte auf den Menschen durch die Zufuhr von probiotischen Kulturen in drei Gruppen: *„Erwiesen“*, *„Teilweise Erwiesen“* und *„Fraglich“*.

Zu den erwiesenen Effekten zählen der positive Einfluss auf das mikrobiologische Darmgleichgewicht, Verbesserung der Stuhlfrequenz, Besiedlungsfähigkeit der Darmschleimhaut, Antagonismus gegenüber pathogener Keime und diverse ernährungsphysiologische Effekte. *Teilweise Erwiesen* sind die Stärkung des Immunsystems und Senkung des Cholesterinspiegels und zu den fraglich erwiesenen Effekten zählt die Antitumorwirkung. Durch die erwiesenen positiven Effekte auf das Darmgleichgewicht werden probiotische Mikroorganismen in der Therapie von Durchfallserkrankungen, sowie der Regeneration der Darmflora nach medikamentöser Behandlung, wie Antibiotika, eingesetzt und daher auch pharmazeutischen Präparaten zugesetzt. In der Tierernährung werden probiotische Kulturen als mikrobielle Leistungsförderer eingesetzt [KNEIFEL W. und BONAPARTE C., 1996b; MAYER H. K. et al., 1998].

Neben den klassischen Kulturkeimen wie *Sc. thermophilus* und *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*, die traditionell bewährt sind, dessen ungeachtet an sich keine originäre Darmrelevanz aufweisen, nehmen Spezialkulturen wie *Lb. acidophilus*, *Lb. casei ssp. rhamnosus* und Bifidobakterien, bevorzugt humanem Ursprungs, eine immer wichtigere Rolle ein [KNEIFEL W. und BONAPARTE C., 1996a].

Mikrobiologische, molekularbiologische und biochemische Studien haben gezeigt, dass speziell diese Bakteriengruppe ein besonders positives Potential beinhaltet und zahlreiche Vorteile aus hygienischer und medizinischer Sicht daraus resultieren. Daher werden diese probiotischen Kulturen nicht nur in der Milchwirtschaft verwendet, sondern auch in anderen Lebensmitteln, wie Wurst, Eis, Müsli und Süßwaren [KNEIFEL W. und BONAPARTE C., 1996b].

Eine sorgfältige Interpretation der Bakterienkultur im Gastrointestinaltrakt ist unerlässlich, um den „wahren“ mikrobiologischen Einfluss der Probiotika klarzulegen. Es ist Ziel der Wissenschaft mittels „genetischem Fingerabdruck“ die Bakterienstämme nicht nur zu differenzieren, sondern auch zu erforschen wie die funktionellen Elemente und Biomarker wirken und arbeiten. Viele in situ Methoden basieren auf der Analyse der ribosomalen RNS, da empirische Daten davon ausgehen, dass Bakterien, deren 16S rRNS-Gensequenzen zu 97–98 % übereinstimmen, einer Art zugerechnet werden können. Das Bestreben der Forschung ist es nicht nur Präsenz und Quantität festzustellen, sondern die Rolle der Mikroflora und probiotischer Kulturen im lebenden Organismus zu demonstrieren [MCCARTNEY A.L., 2002].

Anforderungen an Probiotische Mikroorganismen:

Konventionelle Starterkulturen werden vor allem in Hinblick auf ihre technologische Eignung sowie auf ihre geschmacklichen Eigenschaften hin optimiert, bei den probiotischen Stämmen kommt noch die Prüfung auf den gesundheitsfördernden Effekt hinzu.

Die Selektion der Milchsäurebakterien erfolgt nach folgenden Kriterien:

- Herkunft aus dem, bevorzugt menschlichen, Intestinaltrakt
- Überleben und Erhaltung der Aktivität im Trägerlebensmittel, sodass am Ende noch $\geq 10^6$ lebende probiotische Bakterien pro g Produkt überbleiben: das sind $> 10^8$ probiotische Keime pro Becher Joghurt.
- Magen-, Gallensäuretoleranz und Resistenz gegenüber Verdauungsenzymen, sodass, nach Passieren der oberen Darmabschnitte, bestenfalls noch $10^7 - 10^{10}$ Bakterien, lebend den Darm erreichen. Laut Studie von Del Piano auf die Toleranz von Milchsäurebakterien gegenüber Pankreassaft scheinen *Bifidobakterien* sensibler als *Lactobacillen* zu reagieren [DEL PIANO M. et al., 2008].
- Gesundheitlich unbedenklich, also weder pathogen noch toxisch. *Lactobacillen* und *Bifidobakterien* gelten dabei generell als sicher = GRAS, generally regarded as safe. Infolge der Richtlinien der „Deutschen Berufsgenossenschaft der Chemischen Industrie“ sind die meisten MSB als unbedenklich zu bewerten, daher Risikogruppe 1, „kein gesundheitliches Risiko“. Der Risikogruppe 2 gehören *Lb. rhamnosus*, *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* an [HOLZAPFEL W. H. et al., 2001].

Spezifische gesundheitsbezogene Wirkung

- Hohes Adhäsionsvermögen an Darmepithelzellen zur vorübergehenden oder andauernden Besiedelung der Darmschleimhaut.
- Stoffwechseltätigkeit im Darmtrakt.
- Eindeutig charakterisiert und mittels molekularbiologischer Methode identifizierbar.
- Nach diesen Kriterien ausgewählte probiotische Kulturen sind z.B. die Stämme: *Bf. longum*, *Bf. infantis*, *Bf. breve* und *Bf. bifidum* sowie *Lb. acidophilus* und Vertreter der *Lb. casei*-Gruppe [MAYER H. K. et al., 1998].

2.2.3 Präbiotika und Synbiotika

Nach Gibson und Roberfroid (1995) ist ein Präbiotikum ein unverdaulicher Lebensmittelbestandteil, der auf den Wirts-Organismus einen nützlichen Effekt hat, auf diese Weise das Wachstum und/ oder die Aktivität einer bestimmten oder einer begrenzten Anzahl von Bakteriengattungen im Colon begünstigt und so die Gesundheit des Wirts-Organismus fördert. Bislang wurde eine Reihe von Oligosacchariden ermittelt, die vom Dünndarm nicht hydrolysiert und absorbiert werden, daher unverdaut in den Dickdarm gelangen und erst dort von vorwiegend Bifidobakterien fermentiert werden. Daraus geht ein deutlicher Anstieg von Bifidobakterien hervor – die Darmflora wird also von Präbiotika moduliert [FREY I. et al., 2001].

Infolge der Kombination probiotischer Bakterien mit präbiotischen Zuckern erhält man symbiotische Produkte, die eine doppelt positive Wirkung auf den Organismus ausüben können. Darüber hinaus ermöglicht der Zusatz präbiotischer Zucker zu Fermentationsmilch eine höhere Anwachs- und Überlebensrate der *Bifidobakterienkultur*, das zuletzt zu einer kürzeren Fermentationsdauer und zu einer besseren Keimdichte im Produkt führen kann [BONAPARTE C. und KNEIFEL W., 1999].

2.2.4 Gesundheitseffekte von Pro-, Prä- und Synbiotika

Von Probiotika werden viele Gesundheitseffekte behauptet, aber nur wenige konnten bisher in kontrollierten Humanstudien bestätigt werden:

- Prävention und kürzere Dauer von Durchfall im Kindesalter durch probiotische Bakterien, wie *Bf. bifidum*, *Sc. thermophilus* und *Lb. casei*.
- Geringere Dauer und schwächerer Verlauf von Rotavirus Infektionen bei Kindern mit der Aufnahme von *Lb. rhamnosus* (LGG).

- Präventive und therapeutische Wirkung bei antibiotikaanschließendem Durchfall durch *Lb. acidophilus*, *Bf. longum*, *Lb. rhamnosus* GG und *Bf. bifidum*.
- Eine Stimulation des Immunsystems wird mit den Bakterien *Lb. acidophilus*, *Bf. bifidum*, *Lb. rhamnosus* GG, und *Bf. bifidum* erreicht.
- Präventiv bei atopischer Dermatitis wirkende und die Symptome mildern-
de Effekte werden mit *Lb. rhamnosus* GG erzielt.
- Durch die Aufnahme von *Lb. casei shirota* wird eine Verlängerung der
tumorfreen Zeit bei Blasenkrebs erreicht.
- Weiters wird eine Senkung der Aktivität krebspromovierender Enzyme im
Dickdarm nach Verzehr von *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*
shirota und *Bf. bifidum* beschrieben.
- Eine Senkung des Serumcholesterins durch Probiotika wird vermutet, ist
aber noch nicht hinreichend belegt.
- Außerdem scheinen die Einflüsse auf das Immunsystem insbesondere
bei allergischen Reaktionen vielversprechend.
- Derzeit ist die Abschätzung inwieweit Probiotika-Verzehr zur Ver-
ringerung des Krebsrisikos beitragen kann schwierig, da noch nicht aus-
kömmliche Langzeitstudien durchgeführt worden sind, denn es handelt
sich bei der Kanzerogenese um einen jahrelangen Prozess [FREY I. et
al., 2001].

Bei der Fermentation entstandene bioaktive Substanzen können ebenfalls ge-
sundheitsfördernde Eigenschaften haben, ohne dass das verzehrsfähige
Sauermilchprodukt noch lebende Bakterien enthält.

Im Bezug auf Präbiotika konnte für eine Reihe von Oligosacchariden (Fructo-
oligosaccharide (FOS), Inulin, Transgalacto-oligosaccharide (TOS), Isomalto-
oligosaccharide (IMOS), Raffinose und Sojaoligosaccharid-Extrakt (SOE),

Lactosaccharose, Lactulose und Xylooligosaccharide (XOS)) ein bifidogener Effekt in vitro gezeigt und in Humanstudien belegt werden:

- Günstiger Einfluss auf Stuhlkonsistenz und –frequenz bei Menschen mit Verstopfung (möglicher Nachteil ist die Beschwerde mit Flatulenz).
- Positive Beeinflussung der Lipid-Parameter mit FOS und Inulin, vor allem bei Probanden mit Hyperlipidämie.
- Protektive Wirkung von Präbiotika bezüglich Colon-Karzinogenese wurde bisher ausschließlich in Tierstudien beobachtet.
- Erhöhte Mineralstoffabsorption wird mit Calcium beobachtet.
- Verringerung der Häufigkeit fieberiger Erkältungskrankheiten.
- Leichter Verlauf von Durchfallserkrankungen [FREY I. et al., 2001].

Probiotika und Präbiotika gemeinsam ergeben die Synbiotika, die durch diese Mischung einige Vorteile aufweisen. Probiotika allein weisen ein Stabilitätsproblem im Produkt während der Lagerung und ein Stabilitätsproblem der Bakterien während der Passage des oberen Verdauungstraktes auf. Die bis zum Dickdarm hin überlebenden Bakterien entfalten ihre primären und sekundären positiven Effekte. Präbiotika weisen hingegen eine gute Stabilität der Oligosaccharide während der Verarbeitung und Produktlagerung auf, sie passieren relativ gut die obere Darmpassage und entfalten dann genauso ihre positive Wirkung im Dickdarm. Durch die Kombination dieser beiden wird das Stabilitätsproblem der Probiotica während der Produktlagerung, durch den bifidogenen Zucker der Präbiotica, korrigiert. Die überlebenden Bakterien der Probiotica entfalten ihre positive Wirkung im Dickdarm und zusätzlich kommt es zur Förderung der probiotischen oder endogenen Mikroflora durch die Präbiotika [BONAPARTE C. und KNEIFEL W., 1999].

2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion, englisch Polymerase Chain Reaction, ist eine heute fundamentale Technik um Erbsubstanz DNA in vitro zu vervielfältigen. Sie wurde 1983/ 84 von Kary B. Mullis, der dafür 1993 den Nobelpreis in Chemie erhielt [THE NOBEL FOUNDATION., 1993], entwickelt und basiert auf dem Prinzip der Amplifizierung einer spezifischen Sequenz eines DNA-Doppelstranges mittels eines Enzyms, der DNA-Polymerase [LÖFFLER G., 2003; LOTTSPREICH F. und ENGELS J.W., 2006].

Es hat sich seit der Entdeckung ein breites Anwendungsfeld entwickelt, das von der Amplifikation fossiler DNA bis zur Täterüberführung in der Kriminalistik reicht.

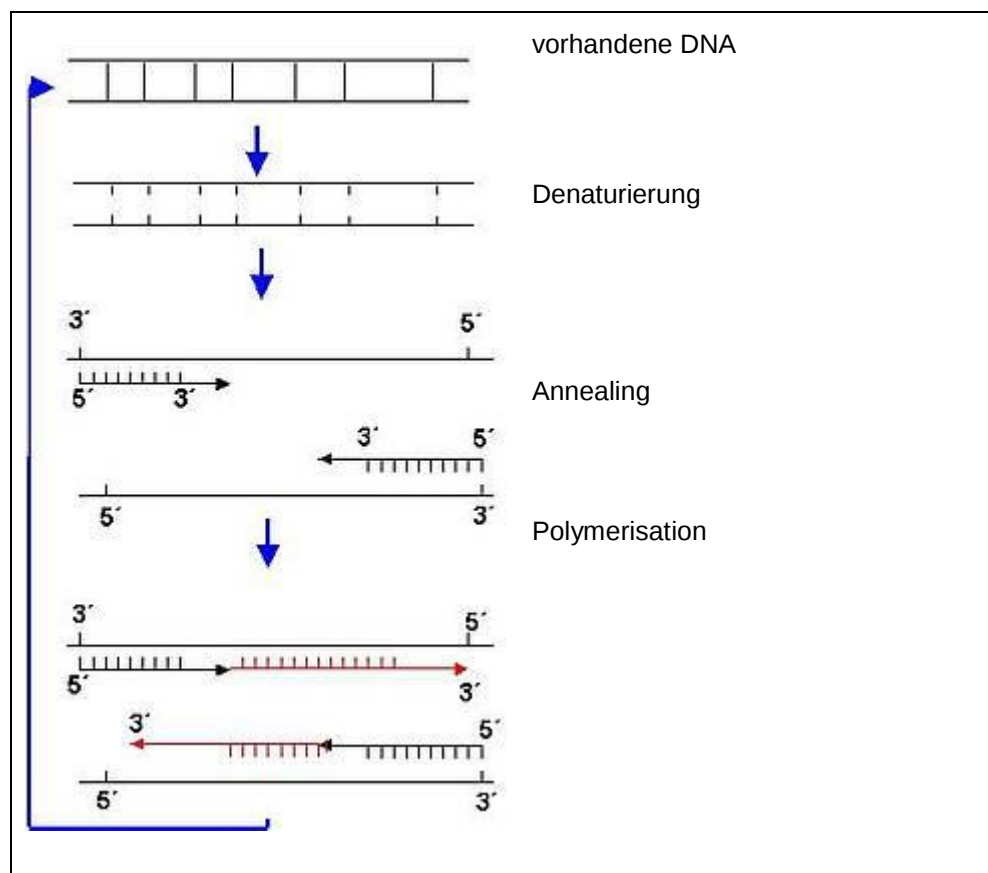


Abbildung 2: Polymerasekettenreaktion [BIORON., 2009]

Das Reaktionsprinzip beruht auf der Replikation der DNA in der Zelle: Eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen Nucleinsäure-Matrize. In der Zelle braucht das Enzym dazu einen RNA-Primer, ein Nucleinsäuremolekül, das mit dem Matrizenstrang hybridisiert und von der Polymerase als Starter genutzt wird. Im Reagenzglas werden künstlich synthetisierte Oligonucleotidprimer verwendet. Diese Startmoleküle sind aus den flankierenden Bereichen der Matrize abgeleitet, weshalb das zu amplifizierende Fragment zwischen ihnen liegt. Für die Reaktion werden eine DNA oder RNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, Desoxynucleotide, zwei Oligonucleotide als Primer und ein geeignetes Puffersystem benötigt [GASSEN H.G. et al., 1994].

Drei Teilschritte, die ständig wiederholt werden:

Denaturierung: der Doppelstrang wird durch Erhöhen der Temperatur auf 90 °C denaturiert.

Annealing: Nach raschem Abkühlen auf etwa 50 °C werden zwei Primer, aus 15-25 Basen bestehende Oligonucleotide, zugesetzt, die der Sequenz an den 3'-Enden des DNA-Stückes komplementär sind, das amplifiziert werden soll. Jedem PCR-Ansatz wird ein Primer der am „sense“-Strang und einer der am Gegenstrang, „antisense“-Strang, bindet zugegeben [LOTTSPREICH F. und ENGELS J.W., 2006]. Um unspezifische Hybridisierungen zu verhindern muss hierbei meist die Temperatur auf 60 °C- 70 °C erhöht werden.

Polymerisation: Durch Zusatz einer DNA-Polymerase, stammend aus thermophilen Bakterien, werden die beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert, so dass nun zwei Doppelstränge vorhanden sind. Es ist eine Kopierung der beiden Matrizenstränge erfolgt. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des von den Startmolekülen eingerahmten Matrizenfragments und wird im folgenden Zyklus zum Ausgangsmaterial.

1988 veröffentlicht eine Forschergruppe um Mullis eine Studie, die besagt, dass ein Enzym, isoliert aus *Thermus aquaticus*, die Prozedur vereinfacht, da es eine

Amplifizierung bei nahezu 100 °C zulässt [SAIKI R.K. et al., 1988] , die Taq-Polymerase. In den modernen Thermocyclern ist die Reaktion in etwa einer Stunde abgeschlossen, da die Proben nicht mehr in Wasserbädern mittels Stoppuhr bearbeitet werden, sondern die Gefäße in einem Metallblock stehen und darin zyklisch aufgeheizt und abgekühlt werden [LOTTSCHEICH F. und ENGELS J.W., 2006].

Diese Zyklen können mehrfach wiederholt werden und ergeben eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA [LÖFFLER G., 2003].

In die PCR kann auch eine Mischung verschiedener DNA-Stränge eingesetzt werden. Durch die Wahl der Primersequenzen kann aus einem solchen DNA-Mix die gewünschte Sequenz herausvervielfältigt werden. Die Basis ist die hochselektive Vermehrung der von den Primersträngen erkannten DNA-Stränge. Da die Wechselwirkung von Polymerasen mit DNA von Puffer, Temperatur und Primersequenz beeinflusst wird, ist die Ausarbeitung der optimalen Reaktionsbedingungen schwierig und mit ständigem „trial and error“ verbunden.

Wahl der PCR-Bedingungen:

Enzyme: Die wichtigsten Anforderungen an DNA-Polymerasen für die PCR sind die Fähigkeit, bei 72 °C längere DNA-Abschnitte zu synthetisieren und eine sehr gute Temperaturstabilität bei 95 °C aufzuweisen. Diese werden erfüllt von Taq-, Tth-, Pwo- und Pfu- Polymerase, wobei Taq-Polymerase am häufigsten verwendet wird. Die eingesetzte Konzentration variiert zwischen 0,5 bis 5 Units/100 µl Reaktionsansatz: Zu hohe Enzymkonzentrationen können die Nebenproduktbildung verstärken und lassen die Substratspezifität des Enzyms sinken, daher steigt die matrizenunabhängige Polymerisationsrate.

Puffer: Die Stammlösung sollte einen konstanten pH-Wert im Reaktionsansatz aufweisen. Die für die Taq-Polymerase gebräuchlichen Puffer werden entweder mit oder ohne Magnesiumchlorid angeboten. Als weitere Zusätze können dem Puffer Rinderserumalbumin (BSA), Tween-20, Gelatine, Glycerin, Formamid

und Dimethylsulfoxid beigemischt werden, die zur Stabilisierung des Enzyms und zu einem optimierten Primer-Annealing führen.

Desoxynucleotide: Die vier Desoxynucleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sollten in einem äquimolaren Verhältnis vorliegen. Zu hohe dNTP-Konzentrationen sollten vermieden werden, da sie zur Extension fehlgepaarter Basen führen. Niedrigere Konzentrationen sind hingegen günstiger, da sie einen positiven Einfluss auf die Genauigkeit der Taq-Polymerase haben.

Primer: an einen Primer werden unterschiedliche Anforderungen gestellt: er soll mindestens 17 Nucleotide lang sein und einen ausgeglichenen G/C- zu A/T-Gehalt und möglichst keine G/C-Nucleotide am 3'-Ende aufweisen. Ihr Schmelzpunkt soll zwischen 55 °C und 80 °C liegen und möglichst bei beiden Primern gleich sein. Sie sollen, besonders am 3'-Ende, keine Haarnadelstruktur aufweisen. Dimer-Bildung sollte weder mit sich selbst noch mit dem zweiten Primer stattfinden [GASSEN H.G. et al., 1994; LOTTSPEICH F. und ENGELS J.W., 2006].

Was kann mit PCR erreicht werden

Mit PCR können sehr kleine DNA-Mengen gereinigt und vermehrt werden.

Die Technik ist sehr schnell.

Thermostabile Polymerasen und Temperaturzykler sind kommerziell erhältlich.

Die Anwendung der PCR auf cDNA Bibliotheken ermöglicht Genexpressionsstudien. Reverse Transkription (RT) und PCR lassen sich miteinander koppeln. Das gelingt z. B mit Polymerasen die auch RT-Aktivität besitzen.

Mit PCR lässt sich die Menge einer bestimmten mRNA im Cytoplasma ermitteln. Hierzu ist es notwendig die sogenannte copy number zu bestimmen. Das ist die Zahl der durchgeführten Amplifikationsschritte [UNI MARBURG., 2002].

2.4 Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung

Milchsäurebakterien haben eine lange Geschichte zu verzeichnen, da sie als sicher gelten und somit dem GRAS-Status angehören. Ihre Einsatzbreite ist sehr groß, da sie ihre Vorteile in Geschmack und Textur aufweisen und zusätzlich eine konservierende Wirkung aufweisen. Eine genaue Charakterisierung und penible Kontrolle der Isolate während und nach dem Verarbeitungsprozess ist daher von enormer Relevanz. Verschiedene Methoden haben sich in diesem Zusammenhang etabliert, die sich grundsätzlich in Kultur-abhängig und Kultur-unabhängig einteilen lassen. Phänotypische Methoden erweisen sich als weit-aus kostengünstiger als genotypische, werden jedoch immer weniger angewandt, da sie eine nicht so verlässliche Charakterisierung, Identifizierung und Reproduzierbarkeit zulassen.

Phänotypische Methoden charakterisieren die Gruppe der Milchsäurebakterien nach physiologischen, chemischen und biochemischen Merkmalen. Die Ergebnisse der phänotypischen Tests werden mit vorhandenen Datenbanken verglichen. Die Analyse reicht von mikroskopischen Charakterisierungen, über Beobachtung des Wachstumsverhaltens und über die FAME-Analyse (Fettsäuremethylester), bis hin zur SDS-Page (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel), bei der zelluläre Proteine ausgewertet werden. Meist werden verschiedene Methoden kombiniert angewandt.

Genotypische Methoden basieren meist auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, durch die man unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern gezielt DNA-Fragmente amplifizieren kann. Die erhaltenen 16S-Sequenzen können anschließend mittels Genbanken verglichen werden. Weiters werden verwendet: DNA-DNA-Hybridisierung, RFLP- Analyse (Restriction Fragment Length Polymorphism), PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), Plasmid-Profiling, AFLP (Amplifizierte-Fragment-Längen-Poymorphismus), Ribotypisierung, RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) und die DGGE (Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese) [TEMMERMAN R. et al., 2004].

2.5 Agarosegel-Elektrophorese

Die Elektrophorese ist eine analytische Methode zur größenbezogenen Trennung und Isolierung von Nucleinsäuren, Aminosäuren, Kohlenhydraten, Peptiden, Proteinen, Enzymen und Glycoproteinen, die vom schwedischen Chemiker Arne Tiselius im Jahre 1937 entdeckt worden ist. In einer Elektrophorese-Apparatur befinden sich Anode und Kathode, an die eine Gleichspannung angelegt wird und ein Träger, eine Glasplatte mit Gel oder Folie, worauf die Trennung erfolgt, wenn sie nicht in freier Lösung durchgeführt wird. Die Entwicklung als Trägermaterial ein Agarosegel zu verwenden geht auf Hjerten (1961) zurück. Umso größer die Konzentration der Agarose im Gel ist, umso weniger Poren weist das Gel auf.

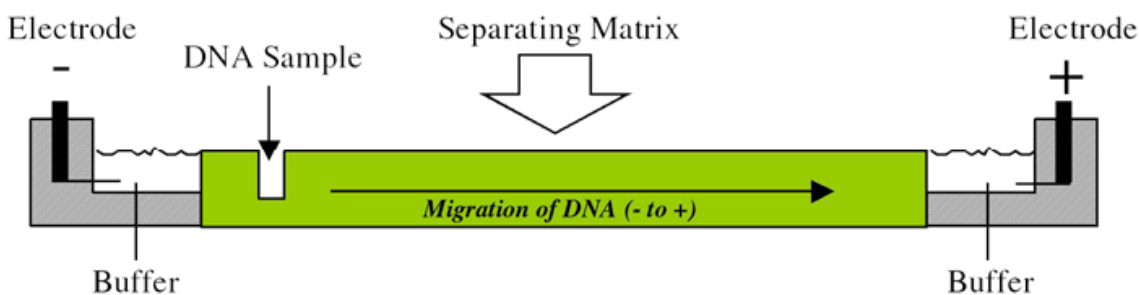


Abbildung 3: Agarosegelelektrophorese, [RAPLEY R. und WALKER J.M., 1998]

Das Prinzip beruht auf der Wanderung von geladenen Probemolekülen unter dem Einfluss eines Gleichstromfeldes, wobei sich die Proben in wässriger Puffer-Lösung befinden. Die Probeionen wandern entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität in diesem Gleichspannungsfeld auf einen für sie charakteristischen Platz im Gel und bilden mehr oder weniger scharf ausgeprägte Substanzbanden. Ursache für „verschmierte Substanzzonen“ können schlecht gegossene Gele, eine sehr komplexe Zusammensetzung der Probe oder sehr ähnliche Probespezies und nicht optimierte elektrophoretische Bedingungen sein [GEY M.H., 2008].

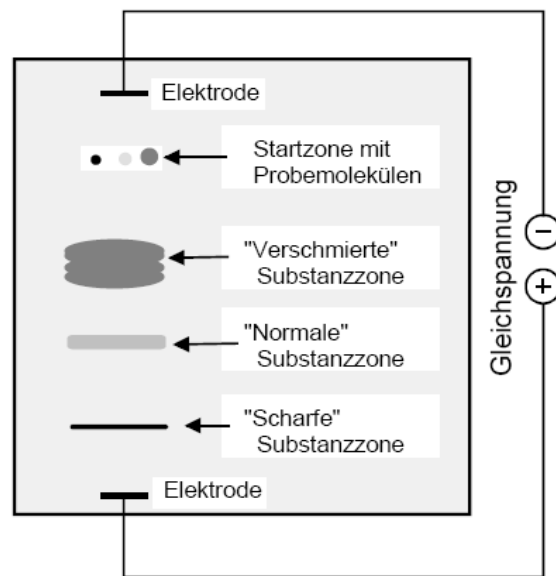


Abbildung 4: Bandenschema einer AGE [GEY M.H., 2008]

Die Visualisierung der DNA auf Elektrophese-Gelen erfolgt üblicherweise mit UV-Strahlung nach Einfärbung des Gels mit Ethidiumbromid.

Agarosegele können verwendet werden um Moleküle, die größer sind als 100 bp, zu trennen. Für höhere Lösungen oder für eine effektivere Trennung von kürzeren DNA-Molekülen werden Polyacrylamid-Gele angewandt [ADKINS S. und BURMEISTER M., 1996].

2.6 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Die DGGE ist eine Elektrophorese-Methode um einzelne Basenänderungen in DNA-Segmenten zu identifizieren. Im Acrylamidgel ist die doppelsträngige DNA einer ansteigenden denaturierenden Umgebung ausgesetzt und schmilzt daher bei einer Sequenz-spezifischen Schmelztemperatur in einer so genannten Schmelzdomäne („melting domain“). Wenn die Schmelztemperatur der niedrigsten Schmelzdomäne erreicht ist, wird die DNA partiell aufgeschmolzen und es entstehen verzweigte Moleküle, daher wird die Mobilität dieser Moleküle eingeschränkt. Die DGGE verläuft unter gleichbleibenden Temperaturverhältnissen zwischen 50 °C und 65 °C und besitzt einen linearen Gradienten, der mit 7 M Harnstoff und 40 %igem Formamid hergestellt worden ist. Die besten Ergebnisse werden erreicht, wenn die Moleküle nicht komplett denaturieren [BIO-RAD LABORATORIES., 1996], deshalb wird ein „GC-clamp“ an das 5'-Ende eines Primers angehängt, damit dieser das vollständige Denaturieren verhindert [VANHOUTTE L.T. et al., 2005].

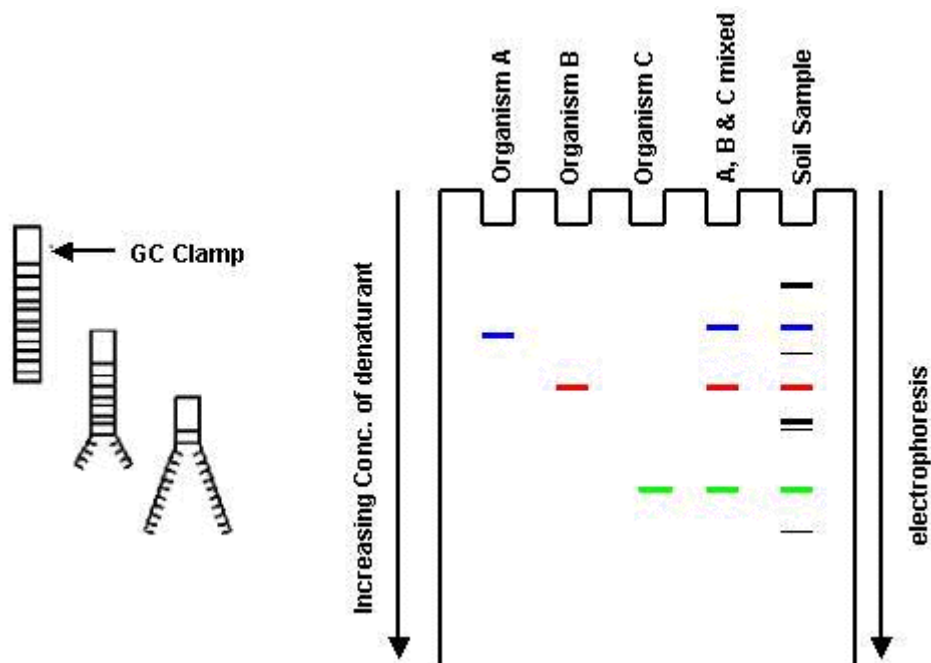


Abbildung 5: Schema einer DGGE, [ENVIRONMENTAL EXPERT., 2010]

Die DGGE wurde zu einem der wichtigsten molekularen Werkzeuge, um Kulturabhängig mikrobiologische Populationen in verschiedenen Nischen zu charakterisieren [VANHOUTTE L.T. et al., 2005].

Sie wird erfolgreich eingesetzt

- um schnell einen breiten Range von nicht-verwandten Mikroorganismen in „Cabrales“- Käse zu identifizieren [FLOREZ A.B. und MAYO B., 2006].
- um präzise und rasch Veränderungen in der Mundflora feststellen zu können [LI Y. et al., 2006].
- um Veränderungen im mikrobiellen Erdenreich aufzeigen zu können [LI Z. et al., 2006; WALTER J. et al., 2000].
- oder um die Vielfältigkeit von wichtigen Bakteriengruppen bewerten zu können, wie z.B. die Charakterisierung der Lactobacillen im menschlichen Gastrointestinaltrakt [HEILIG H.G.H.J. et al., 2002].

Für manche Fragestellungen muss diese Methode mit anderen kombiniert werden um zu einem eindeutigen Ergebnis zu gelangen. So konnte die Bifidobakterien-Diversität im menschlichen Fäzes nicht eindeutig mit der DGGE geklärt werden, da einige Banden nicht voneinander unterschieden werden konnten, da sie die selbe Position am Gel eingenommen haben [SATOKARI R.M. et al., 2001].

2.7 Real-Time PCR

Bei der Real-Time PCR handelt es sich um eine Methode der quantitativen PCR, bei der, wie der Name schon sagt, die Menge des entstehenden PCR-Produkts nach jedem PCR-Zyklus gemessen wird und daher der Verlauf in „Echtzeit“ mitverfolgt werden kann [KÜCK U., 2005]. Ermöglicht wird dies durch Thermocycler, in denen die PCR-Produkte während ihrer Bildung erfasst werden können [SCHRIMPF G., 2002]. Gewährt wird dies durch bestimmte Farbstoffmoleküle, deren Fluoreszenz abhängig von der Menge des amplifizierten Fragments zunimmt. Eine Möglichkeit ist der Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen [KÜCK U., 2005].

Man verwendet dazu auch sequenzspezifische Sondenmoleküle, die mit Fluoreszenzfarbstoffen oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reporter und einem Quencher-Molekül markiert sind [SCHRIMPF G., 2002]. Die Menge des amplifizierten Fragments lässt sich daher als Kurve abhängig von der PCR-Zyklus-Anzahl darstellen. Will man eine Quantifizierung erreichen, ist dies nur in den Phasen des exponentiellen Anstiegs des PCR-Produkts möglich. Die Real-Time PCR stellt eine Revolution der quantitativen PCR dar, da keine aufwändigen Endpunkt-Mengenbestimmungen nach verschiedenen Zykluszahlen durchzuführen sind, da der Zyklus, bei dem die exponentielle Vermehrung des Produkts einsetzt, direkt aus der Kurve als Ct-Wert (threshold cycle) abgelesen werden kann.

Der Farbstoff SybrGreen ist an doppelsträngige DNA gebunden und fluoresziert je nach Menge an PCR-Produkt unterschiedlich stark. Nach jedem Zyklus wird, nach Anregung mittels blauem Licht durch den PCR-Gefäß-Deckel hindurch, die Menge an PCR-Produkt gemessen [KÜCK U., 2005].

Während des Annealing-Schrittes binden neben den sequenzspezifischen PCR-Primern auch die sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden, wie TaqMan^R Sonden, FRET-Sonden oder Molecular Beacons, an die denaturierte Zielsequenz.

Bei der Verwendung von TaqMan- Sonden ist die während der Synthese gemessene Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge und damit proportional zur Menge an Ausgangs-DNA.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Hybridisierungs sonden, FRET- Sonden, die ihren Nachweis im FRET-Prinzip, Fluorescence Resonance Energy Transfer, findet. Hierbei wird wieder einmal pro Zyklus, während des Annealing-Schrittes, gemessen und die Intensität des Fluoreszenzsignals ist wieder proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge und damit zur Menge an Ausgangs-DNA.

Die dritte Möglichkeit sind Molecular Beacons, bei denen es sich um doppelt markierte, sequenzspezifische Oligonucleotid-Sonden mit haarnadelartiger Molekülstruktur handelt. Am 3'-Ende befindet sich eine als Quencher dienende Modifikation und am 5'-Ende der Reporterfarbstoff. Wenn Quencher und Reporter nach Öffnen der Schleife getrennt werden, kommt es zur Aussendung eines Fluoreszenzsignals, das proportional zur Anzahl der gebildeten PCR-Produkte ist [SCHRIMPF G., 2002].

Der Vorteil des hoch sensitiven Farbstoff SybrGreen liegt darin, dass sich der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Spezifität in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert und dass eine kostenintensive Synthese und Markierung von sequenzspezifischen Sonden entfällt. Ein Nachteil liegt darin, dass SybrGreen an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle, also auch an Primer-Dimere oder nicht spezifische PCR-Produkte, die dann zum Fluoreszenzsignal beitragen, bindet. Es könnte somit zu einer ungenauen Quantifizierung kommen [SCHRIMPF G., 2002].

Bei der Quantifizierung von Zielnucleinsäuren, gibt es einerseits die absolute und andererseits die relative Quantifizierung. Um eine absolute Quantifizierung durchführen zu können benötigt man externe Standards wie z. B. eine Verdünnungsreihe, die als Standardreihe definiert wird und fünf Verdünnungsstufen umfassen soll. Die Ermittlung erfolgt mit Hilfe der Bestimmung der Ct-Werte der Standards und der unbekannten Proben, die Ausgangsmenge kann dann aus

der Standardkurve abgeleitet werden. Bei der relativen Quantifizierung wird das Verhältnis der Zielmoleküle zur Anzahl von endogenen Referenztranskripten dargelegt. Als endogene Referenzgene werden housekeeping-Gene, wie 18S rRNS, verwendet, denen eine Unveränderlichkeit der Genexpression vorausgesetzt wird. Das Ziel- und Referenzgen werden aus der gleichen Nucleinsäureprobe amplifiziert. Abschließend wird ein auf das endogene Referenzgen bezogener Wert für das zu untersuchende Zielgen bestimmt, der mit den Werten anderer Nucleinsäureproben des Zielgens verglichen werden kann und somit die Quantifizierung darstellt [JAHNSOHN M., 2007].

3 Material und Methoden

3.1 Eingesetzte Milchsäurebakterien

*. . . Isolat; **. . . Referenzstamm; alle anderen sind Typstämme

Tabelle 1: Eingesetzte Milchsäurebakterien

Chiffre	Genus	Spezies	Subspezies	Herkunft
Lb 1	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>		DSMZ/Reuter
Lb 3	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>		DSMZ/Reuter
Lb 5	<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>		LMG/Reuter
Lb 6	<i>Lactobacillus</i>	<i>crispatus</i>		DSMZ/Reuter
Lb 7	<i>Lactobacillus</i>	<i>amylovorus</i>		DSMZ/Reuter
Lb 8	<i>Lactobacillus</i>	<i>gallinarum</i>		LMG/Reuter
Lb 12	<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>		ATCC/Reuter
Lb 13	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>		DSMZ/Reuter
Lb 20*	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	eigenisoliert
Lb 22	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>		DSMZ
Lb 23	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		DSMZ
Lb 25	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>bulgaricus</i>	DSMZ
Lb 26	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>lactis</i>	DSMZ
Lb 27	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>delbrueckii</i>	DSMZ
Lb 29*	<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	GG	Valio (SF)
Lb 32	<i>Lactobacillus</i>	<i>buchneri</i>		DMSZ
Lb 34	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		DMSZ
Lb 83 a	<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>		DMSZ
Lb 92	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	<i>sakei</i>	DMSZ

Lb 95	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		DMSZ
Lb 96	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	<i>curvatus</i>	DMSZ
Lb 140	<i>Lactobacillus</i>	<i>mucosae</i>		DMSZ
Lb 198	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	<i>carnosus</i>	LMG
Lb 209	<i>Lactobacillus</i>	<i>amylolyticus</i>		LMG 18796
Bf 4	<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i>	<i>lactis</i>	DSMZ
Bf 5	<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i>	<i>animalis</i>	DSMZ
Bf 7	<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>		CUETM
Bf 9	<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>		CUETM
Bf 11	<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>		CUETM
Bf 13	<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum</i>		DSMZ
Bf 17	<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>		CUETM
Sc 1	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>		DSMZ
Lc 1**	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	<i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	DSMZ
Lc 2	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	<i>cremoris</i>	DSMZ
Lc 3	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	<i>lactis</i>	DSMZ
Le 1	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		LMG
Le 2	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>cremoris</i>	LMG
Le 3	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	LMG
Le 4	<i>Oenococcus</i>	<i>oeni</i>		LMG
Ws 1	<i>Weissella</i>	<i>confusa</i>		DSMZ
En 2	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>		DSMZ
En 4	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>		DSMZ
Pd 15	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i> 159		DSMZ

3.2 Eingesetzte Primerpaare

3.2.1 Milchsäurebakterienprimer

Tabelle 2: Milchsäurebakterienprimer

Primername	Basensequenz 5'----3'	Annaeling-Temp.	PCR-Produkt (bp)
HDA1GC	5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAGT-3'	54 °C	(250)
HDA2	5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3'		
GC-Lbtuff	5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC CAT CAC TGG TCG TGG-3'	56 °C	(214)
LbtufR	5'-CCA ACG TTA TCG CCG GCT TC-3'		

3.2.2 Lactobacillenedektierende Primer

Tabelle 3: Lactobacillenprimer

Primername	Basensequenz 5'----3'	Annaeling-Temp.	PCR-Produkt (bp)
Aci-I-neu	5'-AGC TGA ACC AAC AGA TTC AC-3'	62 °C	Lb 1 (650)
Aci-Cris-Joh-II	5'-ACT ACC AGG GTA TCT AAT CC-3'		
Aci-I	5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3'	55 °C	Lb 67
Aci-II	5'-CGG TAT TAG CAT CTG TTT CC-3'		
Joh-I	5'-GAG CTT GCC TAG ATG ATT TTA-3'	60 °C	Lb 5 (770)
Aci-Cris-Joh-II	5'-ACT ACC AGG GTA TCT AAT CC-3'		
Del20A	5'-AAT TCC GTC AAC TCC TCA TC-3'	60 °C	Lb 25, 26, 27 (715)
Del23B	5'-TGA TCC GCT GCT TCA TTT CA-3'		

Bulg34/2	5'-CGT CAACTC CTC ATC AAC CGG GGC T-3'	67 °C	Lb 25 (678)
Bulg37/1	5'-CGC CGC CCG GGT GAA GGT G-3'		
Lact33	5'-CCT CAT CAA CTG GCG CC-3'	50 °C	Lb 26 (670)
Lact37A	5'-CGC CCG GGT AAA GGT A-3'		
Lreu-1	5'-CAG ACA ATC TTT GAT TGT TTA G-3'	58 °C	Lb 13 (303)
Lreu-4	5'-GCT TGT TGG TTT GGG CTC TTC-3'		
Para	5'-CAC CGA GAT TCA ACA TGG-3'	55 °C	Lb 20 (300)
Y2	5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'		
Rham	5'-TGC ATC TTG ATT TAA TTT TG-3'	55 °C	Lb12 (300)
Y2	5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'		

3.2.3 Bifidobakterienidentifizierende Primer

Tabelle 4: Bifidobakterienprimer

Primername	Basensequenz 5'----3'	Annaeling-Temp.	PCR-Produkt (bp)
Lw-A	5'-GCA CGG TTT CGG CCG TG-3'	55 °C	Bf 4 (567)
Lw-B	5'-GGG AAA CCG TGT CTC CAC-3'		
Pbi_F1	5'-CCG GAA TAG CTC C-3'	54 °C	Bf 4, 7 (914)
Pbi_R2	5'-GAC CAT GCA CCA CCT GTG AA-3'		
BiLON-1	5'-TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC-3'	55 °C	Bf 7 (831)
BiLON-2	5'-GGG AAG CCG TAT CTC TAC GA-3'		
BiINF-1	5'-TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC-3'	66 °C	Bf 13 (278)
BiINF-2	5'-GGA AAC CCC ATC TCT GGG AT-3'		

BreU3	5`-CTC CAG CTC GAC TGT CGC-3'	67 °C	Bf 11 (811)
BreL4	5`-GCA CTT TGT GTT GAG TGT ACC TTT CG-3'		
BiBIF-1	5`-CAA CAT GAT CGC ATG TGA TTG-3'	60 °C	Bf 13 (278)
BiBIF-2	5`-CCG AAG GCT TGC TCC CAA A-3'		
BiADO-1	5`-CTC CAG TTG GAT GCA TGT C-3'	60 °C	Bf 17 (279)
BiADO-2	5`-CGA AGG CTT GCT CCC AGT-3'		

3.2.4 Lactococcenerkennende Primer

Tabelle 5: Lactococcenprimer

Primername	Basensequenz 5'----3'	Annaeling-Temp.	PCR-Produkt (bp)
gadB21F_Lc	5'-CGT TAT GGA TTT GAT GGA TAT AAA GC-3'	50 °C	Lc1, 3 (600)
GAD7r_Lc	5'-ACT CTT CTT AAG AAC AAG TTT AAC AGC-3'		
LLhis3F	5'-AAA GAA TTT TCA GAG AAA-3'	45 °C	Lc 3 (343)
LLhis4R	5'-ATT TAG AAT TGG TTC AAC-3'		
Lhis5F	5'-CTT CGT TAT GAT TTT ACA-3'	46 °C	Lc 1, 3 (934)
Lhis6R	5'-AAT ATC AAC AAT TCC ATG-3'		
Lchis1F	5'-GCG CTG AAT TTA CCT GAC-3'	44 °C	Lc 2 (556)
Lchis2R	5'-TTC GCG CAC CGC CGT C-3'		

3.2.5 Streptococcenerkundende Primer

Tabelle 6: Streptococcenprimer

Primername	Basensequenz 5'----3'	Annaeling-Temp.	PCR-Produkt (bp)
STherm1	5'-CAC TAT CCT CAG AAT ACA-3'	54 °C	Sc1 (968)
STherm2	5'-CCA ACA GCA TTG ATG TTA-3'		

3.3 DNA-Isolierung

3.3.1 Funktionsweise der DNA-Isolierung

Mittels DNeasy Blood & Tissue Kit (50) wird die DNA-Isolierung durchgeführt. Sie ist Grundvoraussetzung um in der Folge eine Polymerasekettenreaktion ausführen zu können. Lysozym löst die Zellwände auf und Proteinase K spaltet die Proteine auf. Die DNA wird mit Hilfe des AI-Puffers selektiv an die Membran der DNeasy-Säulchen gebunden, indessen werden Verunreinigungen durch die Puffer: AW1 und AW2 entfernt.

Es werden 2 Aufarbeitungsmethoden vor der DNA-Isolierung angewendet, die Einwaagemethode, bei der 150 mg Probe in ein Reagenzgefäß eingewogen werden und die Gefriertrocknung, bei der 500 µl Probe gefriergetrocknet werden, bevor die DNA-Isolierung durchgeführt wird.

3.3.2 Arbeitsmaterial und Hilfsmittel

Tabelle 7: Arbeitsgeräte für DNA-Isolierung

Arbeitsmaterial und Hilfsmittel	Hersteller
Analysenwaage	Mettler/ Toledo
Autoklav	Fedegari
Autoklavierband	
Becherglas	Schott Duran
DNeasy Collection Tubes	Qiagen
DNeasy Mini Spin Column	Qiagen
Gefriertrockner	Edwards
Kühlschrank	Indesit
Parafilm	

pH-Meter	Hanna instruments
Pipetten	Gilson
Pipettenspitzen, steril	Biozym
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Schraubflaschen	Pyrex
Skalpell, Spatel	
Thermomixer	Biozym
Tiefkühlschrank	Gorenje
Urglas	
Vortex	IKA-Works
Wattestäbchen	Roth
Zentrifuge	Eppendorf

3.3.3 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 8: Chemikalien für die DNA-Isolierung

Chemikalien	Hersteller
AE-Puffer	Qiagen
AL-Puffer	Qiagen
AW1-Puffer	Qiagen
AW2-Puffer	Qiagen
Destilliertes Wasser	
Ethanol (96-100 %)	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Applichem
konz. HCl	Roth
Lysozym	Roth

Na ₃ Citrat*2H ₂ O	Merck
NaCl	Merck
NaOH	Merck
Proteinase K	Qiagen
Tris UltraPure	Roth
Triton X-100 (1,2 %)	Sigma
UHQ-Wasser	USFelga

3.3.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Lösungen für die DNA-Isolierung

0,4 M NaOH	In einem 100 ml Messkolben wird 1,599 g festes NaOH mit glasdest. Wasser gelöst. Anschließend wird der Messkolben mit glasdest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt und autoklaviert.
0,5 M EDTA (pH 8)	18,61 g EDTA und 2 g NaOH werden in 80 ml UHQ-Wasser gelöst und der pH-Wert wird mit konz. NaOH auf 8 eingestellt. Folgend wird die Lösung mit 100 ml UHQ-Wasser aufgefüllt und autoklaviert.
40%ige Na ₃ Citrat*2H ₂ O- Lösung	40 g Na ₃ Citrat*2H ₂ O-Lösung wird mit 60 g glasdest. Wasser gelöst und autoklaviert.
5 x SSC	2,204 g Na ₃ Citrat*2H ₂ O-Lösung und 4,382 g NaCl werden eingewogen, mit glasdest. Wasser auf ca. 70 ml aufgefüllt und gelöst. Die Lösung wird auf einen pH-Wert von 7 eingestellt und in einem 100 ml Messkolben bis zur Marke mit glasdestilliertem Wasser befüllt und autoklaviert.

Lysispuffer	200 µl 1 M Tris/ HCl pH 8 wird mit 40 µl 0,5 M EDTA-Lösung pH 8 und 0,12 g Triton X-100 gemischt. Anschließend wird diese Lösung mit 10 ml UHQ-Wasser aufgefüllt.
Tris/ HCl (pH 8)	30,285 g Tris UltraPure wird mit 200 ml UHQ-Wasser vermengt und der pH-Wert wird mit konz. HCl auf 8 eingestellt. Danach wird die Lösung mit 250 ml UHQ-Wasser aufgefüllt und autoklaviert.

3.3.5 Gefriertrocknung

500 µl werden von jeder der 8 Proben in ein Reagenzgefäß gemessen.

Ca. 45 min in den Tiefkühler bei -84 °C

Parafilm über die Öffnung des Reagenzgefäßes ziehen und mit einem Skalpell einritzen, den Deckel geöffnet lassen.

Für ca. 4-5 h die 8 Proben in den Gefriertrockner stellen.

3.3.6 Durchführung der DNA-Isolierung

Die acht gefriergetrockneten Proben und die acht Proben jeweils in ein Reagenzgefäß 150 mg einwiegen.

180 µl Lysispuffer pro Probe bereiten mit 20 mg Lysozym pro ml, gut mittels Vortex mischen und danach abzentrifugieren.

180 µl Lysispuffer zu jeder Probe geben und mittels Vortex mischen.

30 bis 40 min die Proben bei 37 °C im Thermoschüttler inkubieren.

200 µl AL-Puffer hinzupipetieren, mit Vortex mischen, abzentrifugieren.

25 µl Proteinase K zupipettieren, mit Vortex mischen, kurz zentrifugieren.

30 min bei 56 °C die 16 Proben am Thermoschüttler inkubieren.

200 µl Ethanol (96-100 %) hinzupipettieren und gut mischen, sodass eine homogene Lösung entsteht.

die gesamte Lösung wird auf ein DNeasy-Säulchen, das auf einem Sammel-tube sitzt, übertragen.

3-4 min bei 8.000 rpm zentrifugieren.

DNeasy-Säulchen auf ein neues Sammel-tube setzen; altes verwerfen.

500 µl AW1-Puffer draufpipettieren.

3-4 min bei 8.000 rpm zentrifugieren.

DNeasy-Säulchen auf ein neues Sammel-tube setzen; altes verwerfen.

500 µl AW2-Puffer draufpipettieren.

3 min bei „full speed“ 13.200 rpm zentrifugieren; die Lösung im Sammel-tube erneut verwerfen.

DNeasy-Säulchen auf ein steriles 1,5 ml Reagenzgefäß setzen.

100 µl AE-Puffer direkt auf die Membran des Säulchens pipettieren; 1 min bei Raumtemperatur inkubieren; 2 min bei 8.000 rpm zentrifugieren.

100 µl AE-Puffer direkt auf die Membran des Säulchens pipettieren; 1 min bei Raumtemperatur inkubieren; 2 min bei 8.000 rpm zentrifugieren.

DNeasy-Säulchen werden weggeworfen, im Sammel-tube befindet sich nun die isolierte DNA; es wird ein Aliquot (20 µl der Lösung) entnommen und dann werden beide Reagenzgefäße eingefroren; sodass bei Bedarf jeweils das Ali-quot aufgetaut werden kann.

3.4 Polymerasekettenreaktion

3.4.1 Funktionsweise der PCR

Zur Vervielfältigung der DNA wird eine PCR durchgeführt, um in weiterer Folge eine Elektrophorese realisieren zu können. Für diese Arbeit ist mit dem thermostabilen Mastermix, Go Taq, gearbeitet worden, der einen grünen Reaktionspuffer, mit blauem und gelbem Farbstoff, enthält. Es wird kein zusätzlicher Geladepuffer benötigt, da der Go Taq die Dichte der Proben erhöht.

3.4.2 Arbeitsmaterial und Hilfsmittel

Tabelle 10: Arbeitsgeräte für die PCR

Arbeitsmaterial und Hilfsmittel	Hersteller
Kühlblock	Biotech Trade & Service GmbH
Kühlschrank	Indesit
Pipetten	Gilson
Pipettenspitzen, steril	Biozym
Reagenzgefäße	Eppendorf
Sondermüllkanister	Frontier
Thermocycler	Hybaid
Tiefkühlschrank	Gorenje
Vortex	IKA-Works
Zentrifuge	Sigma

3.4.3 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 11: Chemikalien für die PCR

Chemikalien	Hersteller
DNA	
DNA-Polymerase, Go Taq (5U/μl)	Promega
Reaktionspuffer (5 x)	
dNTPS	Roth
Mineralöl	Sigma
Primer (10pM/μl)	MWG Biotech
UHQ-Wasser	USFelga

3.4.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 12: Lösungen für die PCR

dNTP-Mix	Je 100 μl von dATP, dCTP, dGTP und dTTP werden mit 600 μl UHQ-Wasser zusammenpipettiert.
Mastermix Go Taq	6860 μl UHQ-Wasser wird mit 2000 μl 5 x Reaktionspuffer vermengt. Anschließend werden 200 μl dNTP-Mix und 40 μl DNA-Polymerase (Go Taq, 5U/μl)

3.4.5 Durchführung der PCR

Es wird unter sterilen Bedingungen, Laminar Flow, gearbeitet um unspezifische Produkte zu vermeiden. Für diese Arbeit wurde ein Reaktionsansatz von 24,5 μl verwendet.

Die Proben, der Mastermix und die Primer werden auf einen Kühlblock gestellt.

Ein Prämix aus Mastermix Go Taq und dem jeweiligen Primerpaar wird hergestellt. Pro Probe wird 1 µl Primer verwendet; der Ansatz wird inklusive einer Leerprobe berechnet, um Pipettierverluste miteinzukalkulieren.

- 22,5 µl Mastermix Go Taq (5U/µl)
- 1 µl Primer 1, 10 pM/µl
- 1 µl Primer 2, 10 pM/µl

Reaktionsgefäße in der Anzahl der Proben herrichten und beschriften.

24,5 µl Prämix in die beschrifteten Reaktionsgefäße pipettieren.

0,5 µl DNA hinzupipettieren, mit Vortex mischen, gut abzentrifugieren.

1 Tropfen PCR-Öl auf die Oberfläche laufen lassen, damit die Proben im Thermocycler nicht verdampfen.

Reagenzgefäße gut verschlossen in den Hybaid (Thermocycler) stellen.

Primerpaarabhängiges Temperaturprogramm und Zyklenanzahl wählen.

Nach Beendigung des Programms die Proben auf ein Agarosegel auftragen oder tiefkühlen.

Tabelle 13: PCR-Temperaturprogramm

Zykluszahl	Temperatur	Zeit
1	95 °C	5 min
35	Primerabh.	1 min
1	72 °C	8 min
1	4 °C	∞

3.5 Agarosegelelektrophorese

3.5.1 Funktionsweise der AGE

Die Elektrophorese beschreibt die Wanderung elektrisch geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. PCR-Produkte werden auf ein Agarosegel aufgetragen, dann wird ein elektrisches Feld erzeugt. Es kommt zur Auftrennung der DNA-Fragmente, die durch anschließendes Färben, Entfärben und Fotografieren sichtbar gemacht werden können und in Form von Bandenvergleich ausgewertet werden können.

3.5.2 Arbeitsmaterial und Hilfsmittel

Tabelle 14: Arbeitsgeräte für die AGE

Arbeitsmaterial und Hilfsmittel	Hersteller
Absaugvorrichtung	Milipore
Autoklav	Fedegari
Coputer	Siemens
Elektrophoreseapparatur	Pharmacia Biotech bzw. Amersham Biocciences (HE 100)
Färbewanne	Nalgene
Gelgießstand	Hoefer
Kamera	Kodak
Kamm, 20 Zinken	Hoefer
Klebeband	Scotch
Kühler	Pharmacia Biotech
Kühlschrank	Indesit
Messer, Spatel	

Messkolben	Schott
Messzylinder	ISOLAB
Mikrowelle	Sharp
Pipetten	Gilson
Pipettenspitzen, steril	Biozym
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Rührer	IKA-WERke
Schraubflaschen	Pyrex
Sondermüllkanister	Frontier
Stromversorgung	Amersham Pharmacia (Biotech)
Tiefkühlschrank	Gorenje
UV-Transilluminator	Life Technologies
Vortex	IKA-Works
Waage	Sartorius
Wasserbad	LHG
Zentrifuge	Sigma

3.5.3 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 15: Chemikalien für die AGE

Chemikalien	Hersteller
Agarose, Biozym LE	Biozym
Borsäure	Roth
Bromphenolblau (0,25 %)	Merck
Destilliertes Wasser	
DNA-Ladder (100 bp)	Gibco BRL

EDTA	Applichem
Ehidiumbromid (1%,10 mg/ml)	Roth
Ethanol	Merck
Ficoll Type 400	Sigma
PCR-Produkte	
Trisbase	Roth
UHQ-Wasser	USFelga
Xylene Cyanol FF (0,25 %)	Sigma

3.5.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 16: Lösungen für die AGE

0,5 M EDTA (pH 8)	18,61 g EDTA und 2 g NaOH werden mit 80 ml UHQ-Wasser aufgelöst und mit konzentriertem NaOH der pH-Wert auf 8 eingestellt. Danach wird mit 100 ml UHQ-Wasser aufgefüllt und autoklaviert.
Gelladepuffer (6 x)	25 mg Bromphenolblau wird mit 25 mg Xylene Cyanol und 1,5 g Ficoll gemischt. Danach wird 8,45 mg UHQ-Wasser hinzugegeben und durch Schütteln gelöst.
Marker	25µl DNA-Ladder (100 bp) wird mit 50 µl Gelladepuffer und 225 µl TE-Puffer (pH 7,6) gemischt.
TBE-Puffer (5 x)	2 L dest. Wasser werden in einen 5 L-Messkolben vorgelegt; 100 ml EDTA (pH 8) werden dazupipettiert. 270 g Trisbase und 137,5 g Borsäure, in ein Becherglas eingewogen, werden dem Messkolben hinzugegeben. Nach Lösen des Inhalts am Magnetrührer wird mit dest. Wasser bis zum Markierungspunkt aufgefüllt. Abschließend den Inhalt auf 5 Schraubflaschen aufteilen und autoklavieren.

TBE-Puffer (0,5 x)	100 ml TBE-Puffer (5 x) werden 900 ml autoklaviertes destilliertes Wasser hinzugegeben.
TE-Puffer (pH 7,6)	500 µl Tris/HCl (pH 7,6) wird mit 200 µl EDTA (pH 7,6) und 100 ml UHQ-Wasser gemischt.

3.5.5 Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Es wurde eine HE 100-Apparatur mit der Dimension 20 x 25 verwendet. Auf ein Gel können 2 x 20 Proben aufgetragen werden.

Agarosegelherstellung

4 g Agarose in eine sterile Schraubflasche einwiegen.

200 ml 0,5 x TBE-Puffer dazu.

ca. 5 min in der Mikrowelle das Agarosepulver aufschmelzen lassen, bis die Lösung klar ist; Siedeverzug vermeiden.

20 min ins Wasserbad bei 50 °C.

Gelgießstand

Gelgießstand und 20er-Kämme mit Ethanol reinigen.

Die offenen Enden der Gelträgerplatte mit einem Klebeband schließen.

Nach den 20 min Wasserbad das Gel in den Gießstand gießen.

1 Stunde lang erstarren lassen; danach das Klebeband entfernen.

Das Fertige Agarosegel entweder gleich für die Elektrophorese verwenden oder es mit 0,5 x TBE-Puffer beschichten und im Kühlschrank bis zum Gebrauch aufbewahren.

Elektrophorese

Kühlung der Elektrophoreseapparatur auf 19 °C einstellen.

PCR-Produkte und Marker auftauen.

Laufpuffer, 955 ml 0,5 x TBE-Puffer, in die Apparatur gießen.

Agarosegel in den Puffer legen und Probenkämme entfernen.

Proben auftragen: 8 µl PCR-Produkt und 5 µl Marker; mit steriler Pipettenspitze.

Elektrophorese starten (150 V, 120 mA für 3 Stunden).

15 min nach dem Start, den Magnetrührer einschalten.

Nach 3 Stunden wird das Gel herausgenommen und der Puffer abgesaugt.

Färben, Entfärben und Fotografieren

70 µl Ethidiumbromid wird mit 700 µl destilliertem Wasser in einer Färbewanne gemischt.

Das Gel in die Wanne legen; für 1 Stunde färben lassen.

Abgesaugten Puffer als Entfärbelösung in eine neue Wanne gießen.

Für eine halbe Stunde das Gel hineinlegen zum Entfärben.

Die Färbe- und Entfärbelösungen werden in einem Kanister zum Dekontaminieren gesammelt.

Nach der Entfärbezeit wird das Gel fotografiert.

3.6 Denaturierende Gradientengelelektrophorese

3.6.1 Funktionsweise der DGGE

Die DGGE beruht auf dem Prinzip, dass doppelsträngige DNA, die mittels PCR vervielfacht worden ist, auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen wird und durch steigende Denaturierung in einzelne Domänen aufgeschmolzen wird. Der Gradient im Gel wird durch Harnstoff und Formamid erzeugt, eine 100 % Lösung enthält 7 M Harnstoff und deionisiertes Formamid (40 %). Das Gel ist ein 8 %iges, welches DNA-Fragmente mit einer Länge von 200-400 bp auftrennt. Die Temperatur liegt sequenzspezifisch zwischen 50 °C und 65 °C; ist die Temperatur des geringsten Schmelzbereichs erreicht, wird die DNA partiell aufgeschmolzen und verzweigte Moleküle entstehen [BIO-RAD LABORATORIES., 1996].

3.6.2 Arbeitsmaterial und Hilfsmittel

Tabelle 17: Arbeitsgeräte für die DGGE

Arbeitsmaterial und Hilfsmittel	Hersteller
Autoklav	Fedegari
Computer	Siemens
Einwegpipette, steril (10 ml)	Sterilin
Färbewanne	Nalgene
Gelgießstand mit Glasplatten	Biorad
Gradientenmischer	Pharmacia LKB
Gummistopfen	Fortuna
Kamera	Gel Documentation System; GenXpress
Kämme	Biorad
Kapillarspitzen (200 µl)	Biozym
Kühlschrank	Indesit

Kunststoffolie und Schere	
lichtundurchlässige Flaschen	Schott
Magnetrührer	IKA colorsquid
Magnetstäbchen und Spatel	
Messkolben	Fortuna
Messzylinder	ISOLAB
Pipette	Gilson
Pipettenspitzen, steril	Biozym
Pipettierhilfe	Bibby
Platzhalter	Biorad
Puffertank	Biorad
Reagenzgefäß	Eppendorf
Schraubflaschen	Pyrex
Schraubleisten	Biorad
Sondermüllkanister	Frontier
Spacer	Biorad
Sterilin	Sterilin
Stromversorgung	Consort
Temperaturkontrollmodul	Biorad
Tiefkühlschrank	Gorenje
Trichter (Kunststoff)	
UV-Transilluminator	Life Technologies
Volumenpipetten	Assistent, EM
Vortex	IKA-Works
Waage	Sartorius
Zentrifuge	Sigma

3.6.3 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 18: Chemikalien für die DGGE

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid-Lösung (40 %)	Applichem
Ammoniumperoxiddisulfat	Fluka
Dest. und glasdest. Wasser	
EDTA (0,5 M, pH 8, 50 mM)	Applichem
Essigsäure (100 %, 1 M)	Roth
Ethidiumbromid (1 %)	Roth
Formamid	Fluka
Harnstoff	Roth
PCR-Produkte	
Silikonfett	Amersham Biosciences Corp
TEMED	Fluka
Trisbase (2 M)	Roth
UHQ-Wasser	USFelga

3.6.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 19: Lösungen für die DGGE

TAE-Puffer (50 x)	242 g TrisBase (2M), 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8) und 57,1 ml Essigsäure (100 %, 1 M) werden in ein Becherglas gemessen, mit 500 ml glasdestilliertem Wasser vermengt und auf einen Magnetrührer gestellt. Sobald der Inhalt gelöst ist, wird er gründlich, mit destilliertem Wasser, in einen 1 L Messkolben überführt; bis zur Markierung mit glasdestilliertem Wasser aufgefüllt, gut vermischt und autoklaviert.
----------------------	---

TAE-Puffer (1 x)	20 ml TAE-Puffer (50 x) werden mit 980 ml autoklaviertem dest. Wasser vermischt.
EDTA (0,5 M, pH 8)	18,61 g EDTA und 2 g NaOH werden in 80 ml UHQ-Wasser aufgelöst und mit konzentriertem NaOH ein pH-Wert von 8 eingestellt. Anschließend wird der Inhalt mit 100 ml UHQ-Wasser aufgefüllt und autoklaviert
Ammonium= peroxiddisulfat- Lösung	Ammoniumperoxiddisulfat wird mit UHQ-Wasser 1:11 verdünnt (Beispiel: 50 µl PER mit 500 µl UHQ-Wasser mischen)
DGGE- Gellösung (100 %)	8%iges Acrylamid/ Bisacrylamid Gel: 42 g Harnstoff (7 M) werden in einen 100 ml Messkolben eingewogen. Dieser wird mit 40 ml Formamid (40 %) und 20 ml Acrylamid-Lösung (40 %; 38,96 % Acrylamid und 1,04 % Disacrylamid) gemischt. Nach so langem Schütteln, bis alle Harnstoffkörner in Lösung sind, werden 2 ml TAE-Puffer (50 x) hinzupipettiert und mit glasdest. Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Der Inhalt wird auf lichtundurchlässige Flaschen verteilt und im Kühlschrank aufbewahrt.
DGGE- Gellösung (100 %)	20 ml Acrylamid-Lösung (40 %) und 2 ml TAE-Puffer (50 x) werden in einen 100 ml Messkolben eingemessen und mit glasdest. Wasser aufgefüllt. Der Inhalt wird in lichtundurchlässige Flaschen überführt und in den Kühlschrank gestellt.
DGGE- Marker	48 µl je drei PCR-Produkte von Milchsäurebakterien werden in ein Reagenzgefäß pipettiert und mittels Vortex gemischt: <i>Lb. plantarum</i> , <i>Sc. thermophilus</i> , <i>Bf. animalis ssp. animalis</i>

3.6.5 Durchführung der DGGE

Aufbau des Gelgießstandes

Glasplatten mit Ethanol putzen.

Spacer, mit Platzhalter dazwischen, auf der großen Glasplatte platzieren.

Kleine Platte mit gereinigter Seite nach unten drauflegen.

Rechts und links mit Schraubleisten locker fixieren.

Auf einer ebenen Arbeitsfläche die Unterkante glatt ausrichten und die Feststellschraube auf jeder Seite fester anziehen-Platzhalter entfernen.

Die Gummidichtung am Gießstand gut reinigen und etwas mit Silikongel einfetten, die Gießform mit der glatten Kante nach unten einsetzen, leicht andrücken, und mit den Seitenklemmen beidseitig gleichzeitig fixieren.

Durch Einfüllen von destilliertem Wasser bis zur Oberkante der kleineren Glasplatte ca. ¼ Stunde auf Dichtheit prüfen- dann entleeren und mit Filterpapier trocknen.

Tabelle 20: Gelgradienten für die DGGE

Lösung	35 %	38 %	40 %	50 %	52 %	55 %	65 %
0 %	9 ml	8,6 ml	8,3 ml	6,9 ml	6,6 ml	6,2 ml	4,8 ml
100%	4,8 ml	5,2 ml	5,5 ml	6,9 ml	7,2 ml	7,6 ml	9 ml

Gel gießen am Beispiel eines 35 % bis 65 % Gradienten

Vier Steriline vorbereiten und beschriften (nach verwendeten Gradienten).

9 ml von der 0 %igen DGGE-Gellösung in die zwei 35er Steriline und 4,8 ml in die 65er Steriline pipettieren.

Umgekehrt werden von der 100 %igen Gellösung, die klar sein muss, auskristallisierte Harnsalze vor der Verwendung unbedingt lösen, 9 ml in die 65er Steriline und 4,8 ml in die 35er Steriline pipettiert.

Gradientenmischer auf dem Magnetrührer vorbereiten, die Ausgänge verschließen, einen Magnet ins rechte Röhrchen legen und die Nadel am Ende des Schlauches zwischen den Glasplatten festkleben, sodass die Flüssigkeit gut hineinfließen kann.

10 μ TEMED und 100 μ Ammoniumperoxiddisulfatlösung in ein 35er und ein 65er Sterilin pipettieren und gut mischen.

Den Inhalt des 35er Sterilins in das linke Röhrchen des Gradientenmischers leeren und dann kurz die Öffnung zwischen den zwei Röhrchen öffnen, sodass Luftblasen entweichen können.

Den Inhalt des 65er Sterilins in das rechte Röhrchen gießen, ein Gegengewicht dazu, den Magnetrührer einschalten und alle Öffnungen des Gradientenmischers aufmachen, sodass die Gellösung zwischen die zwei Glasplatten fließt.

Die Lösung muss unbedingt bis zum Rand der kleinen Glasplatte reichen.

Probenkamm luftblasenfrei, schön mittig bis zum Anschlag einsetzen.

Gradientenmischer waschen und mit destilliertem Wasser durchspülen.

Denselben Vorgang mit dem zweiten Gel wiederholen.

Dann beide DGGE-Gele 4 bis 6 Stunden auspolymerisieren lassen.

Laufpuffer vorbereiten

ca. 7 L TAE-Puffer (1 x) in den Puffertank füllen, bis zur „Fill“-Markierung, Magnetstäbchen hineinlegen, und dann den Oberteil mit Heizung und Pumpe aufsetzen.

Temperaturkontrollmodul auf 60 °C, Pumpe und Magnetrührer einschalten; die Temperatur wird nach ungefähr einer bis zwei Stunden erreicht.

Proben auftragen

Die Proben (PCR-Produkte im Doppelansatz, Primer mit GC-clamp,) und den Marker eine halbe Stunde vor dem Auftragen auftauen lassen.

Wenn die 60 °C im Puffertank erreicht sind, die Apparatur öffnen und die Probenaschen mit Laufpuffer spülen um Acrylamidreste zu entfernen.

18 µl Marker, 40 µl Joghurtproben und 20 µl Referenzstämme in die Probenaschen mit Kapillarspitzen pipettieren.

Nach Beendigung des Probenauftrags, die Apparatur schließen und die Elektrophorese starten: 60 °C, 70 Volt, 100 mA und 16 Stunden. Die Pumpe erst eine ½ Stunde später einschalten.

Färben, Entfärben und Fotografieren

Nach den 16 Stunden, werden die zwei Gele auf Plastikfolien in die Färbekammer gebracht

In je eine Färbewanne werden 500 µl autoklaviertes dest. Wasser mit 50 µl Ethidiumbromid gemischt und die Gele für 45 min hineingelegt.

In zwei weiteren Wannen wird der verwendete Laufpuffer aufgeteilt um die Gele darin für 15 min zu entfärben. (Färbe- und Entfärbelösung nach Gebrauch in einem Kanister mit Aktivkohle dekontaminieren).

Die fertigen Gele bei einer Belichtungszeit von 1 Sekunde fotografieren.

3.7 Real-Time PCR

3.7.1 Funktionsweise der Real-Time PCR

Die Detektion der PCR-Produkte in „Echtzeit“ ist möglich durch Zugabe eines Fluoreszenzmoleküls, vor der Reaktion, welches das Ansteigen der DNA durch das proportionale Ansteigen eines Fluoreszenzsignals anzeigt. Spezielle Thermocycler, die mit Fluoreszenz- Detektions- Modulen ausgestattet sind zeigen die Vervielfältigung direkt am Bildschirm. Es kann qualitativ (ist eine bestimmte Sequenz vorhanden) und quantitativ (wieviele Kopien der gesuchten DNA sind vorhanden) mit der Real-Time PCR gearbeitet werden. Die Reaktion läuft in einem geschlossenen Tube-System ab und wird in diesem System gleich ausgewertet, daher ist eine Kontaminationsgefahr während des Ablaufs sehr minimiert und eine Manipulation der Ergebnisse durch nachträgliches Amplifizieren ist nicht möglich. Ein wahrer Vorteil der Real-Time PCR gegenüber der konventionellen PCR liegt darin, dass diese die ursprünglich eingesetzte DNA-Menge mit hoher Genauigkeit determinieren lässt [BIO-RAD LABORATORIES, 2006].

3.7.2 Arbeitsmaterial und Hilfsmittel

Tabelle 21: Arbeitsgeräte für die Real-Time PCR

Arbeitsmaterial und Hilfsmittel	Hersteller
8-Tube-Strips	Biozym
Computer	Benq
iCycler™ Thermal Cycler	Biorad
iQ™ 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System	Biorad
Kleine Kühlblöcke	Eppendorf
Kühlblöcke	BioTech Trade & Service GmbH
Kühlschrank	Indesit

Pipetten	Gilson
Pipettenspitzen, steril	Biozym
Reagenzgefäße	Eppendorf
Sondermüllkanister	Frontier
Spezielle Zentrifuge	VWR
Sterile Arbeitsbank	Ehret
Tiefkühlschrank	Gorenje
Vortex	IKA-Works
Zentrifuge	Sigma

3.7.3 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 22: Chemikalien für die Real-Time PCR

Chemikalien	Hersteller
AE-Puffer	Qiagen
DNA	
Primerpaare	
SYBR Green Supermix	Biorad
UHQ-Wassr	USFelga

3.7.4 Durchführung der Real-Time PCR

Es wird unter in einer sterilen Arbeitsbank unter hygienischen Laminar-Flow-Bedingungen gearbeitet um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Proben werden 1:10 verdünnt: 45 µl AE-Puffer und 5 µl DNA

Prämix, in doppelter Probenmenge +2 (Sicherheitszuschlag):

- 12,5 µl SYBR Green Supermix
- 5,5 µl UHQ-Wasser
- 1 µl Primer 1, 10 pM/ µl
- 1 µl Primer 2, 10 pM/ µl

8-Tube-Strips werden steril aus dem Vorratsbeutel entnommen und sofort in einen Kühlblock gestellt. Die Deckel werden (ohne Berührung) verschlossen.

20 µl vom Prämix werden vorgelegt.

5 µl jeweils von der 1:10-Verdünnung der Proben hinzupipettieren, sodass die DNA als kleines Bläschen knapp unter der Prämix-Oberfläche zu sehen ist.

Als Kontrolle (NTC) werden in zwei Gefäße statt DNA, 5 µl AE-Puffer pipettiert.

Die Deckel werden fest verschlossen, danach werden die Strips gemischt und gut zentrifugiert.

Nun stellt man die Strips in den Icyler und programmiert das „protocol“ und die „plate“ und startet den Lauf, der je nach Temperaturprogramm ca. 3 Stunden benötigt.

Nach Abschluss des Laufs werden die Strips weggeworfen und die Daten bearbeitet.

Tabelle 23: Real-Time PCR, Temperaturprogramm

Cycle 1		Cycle 2 (45 x)			Cycle 3 (1 x)		Cycle 4 (81 x)	Temp. Change	End. Temp
Step 1		Step 1	Step 2	Step 3	Step 1	Step 2			
95 °C		95 °C	x °C	72 °C	95 °C	x °C	x °C	0.5 °C	95 °C
3 min		15 sec.	40 sec.	20 sec.	20 sec.	30 sec.	10 sec.		
			PCR	Real Time			Melt Curve		

xspezifische Annealingtemperatur für die jeweiligen Primerpaare

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich drei Aufgabenbereiche bearbeitet:

Erarbeitung und Erstellung einer Lactobacillen-Datenbank mit den Universal-Primerpaaren: HDA1GC/ HDA2 und GC_LbtufF/ LbtufR.

Ermittlung der Nachweisgrenze von verschiedenen Milchsäurebakterien mittels Verdünnungsreihen im Vergleich von Agarosegelelektrophorese, DGGE und Real-Time PCR.

Das dritte Projekt ist die Untersuchung 8 probiotischer Joghurts auf das Vorhandensein verschiedener Bakterien mittels AGE und DGGE.

4.1 Erstellung einer Lactobacillen-Datenbank

4.1.1 Universalprimerpaar HDA1GC/ HDA2

Es wurde eine DGGE-Lactobacillen-Referenzleiter aus Bakterienstämmen gefertigt, wobei sich die Auftragreihenfolge aus dem beobachteten Lauf und ihrem Schmelzverhalten ergeben hat. Diese Leiter soll als DGGE-Datenbank dienen, um einen Vergleich von etwaigen unbekannten Proben anstellen zu können. Es wurde mit dem Universalprimerpaar HDA1GC/HDA2, bei 54 °C, eine PCR im doppelten Ansatz gemacht und dann die Proben nach Schmelzverhalten aufgetragen, wobei mit jenen begonnen wurde, die bei niedrigen denaturierenden Bedingungen schmelzen. Aufgetragen wurden 40 µl PCR-Produkt der Referenzstämme und 18 µl Marker, der aus 1/3 Lb 23, 1/3 Sc 1 und 1/3 Bf 5 gemischt wurde. Diese Stämme wurden gewählt, da sie das Datenfeld umschließen, Lb 23 bildet den obersten und Bf 5 den untersten Stamm, der dritte, Sc1, befindet sich genau in der Mitte der beiden anderen. Der Gradient wurde mit 35-65 % gewählt, um eine gute Auftrennung sichtbar zu machen. Ein Kippen der äußersten Banden des Gels, der so genannte „Anti-smiling-Effekt“, wurde durch ein Freilassen der äußersten Kammplätze, Taschen, verhindert.

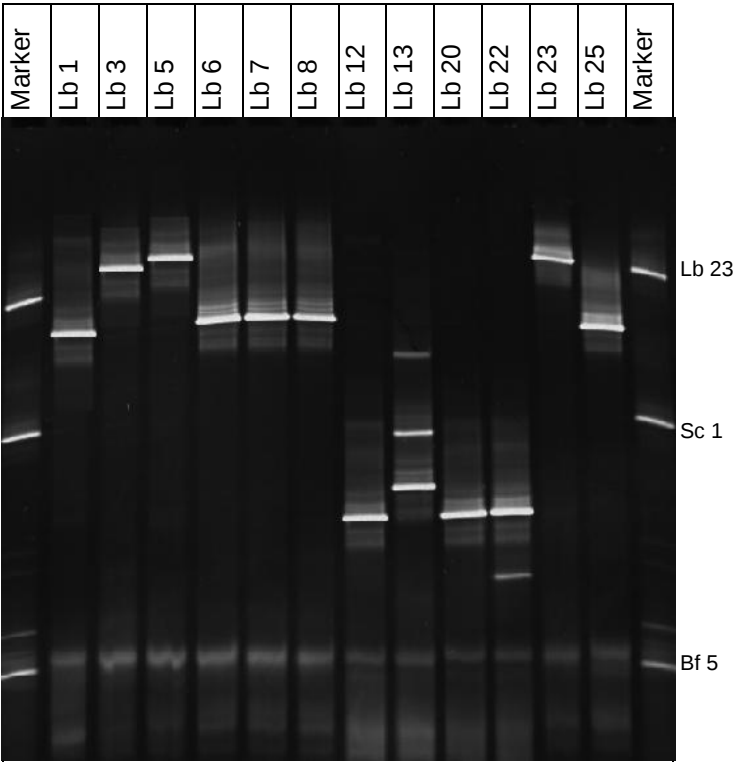


Abbildung 6: DGGE, Referenzstämme, HDA1GC/ HDA2, Gradient: 35-65 %

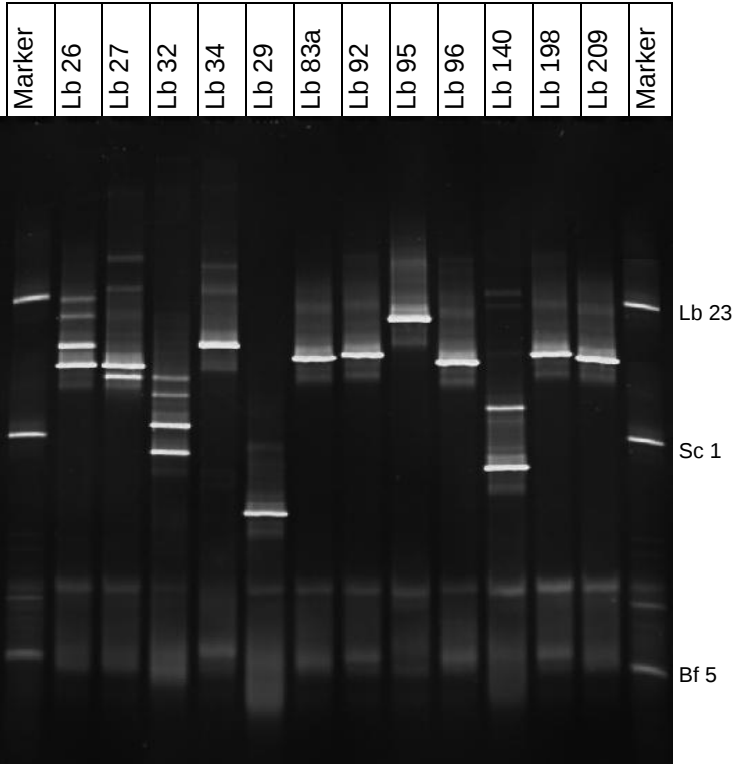


Abbildung 7: DGGE, Referenzstämme, HDA1GC/ HDA2, Gradient: 35-65 %

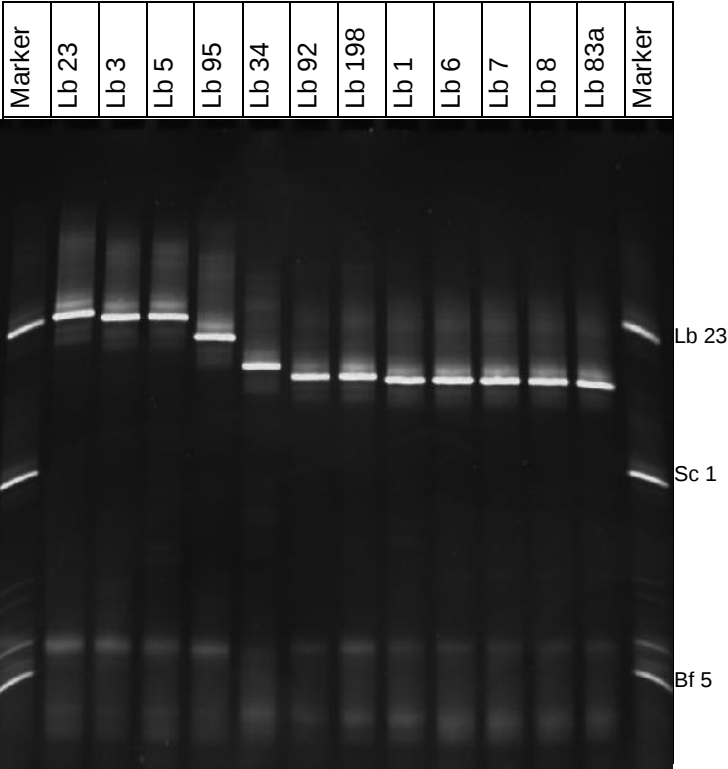


Abbildung 8: DGGE, Leiter, HDA1GC/ HDA2, Gradient: 35-65 %

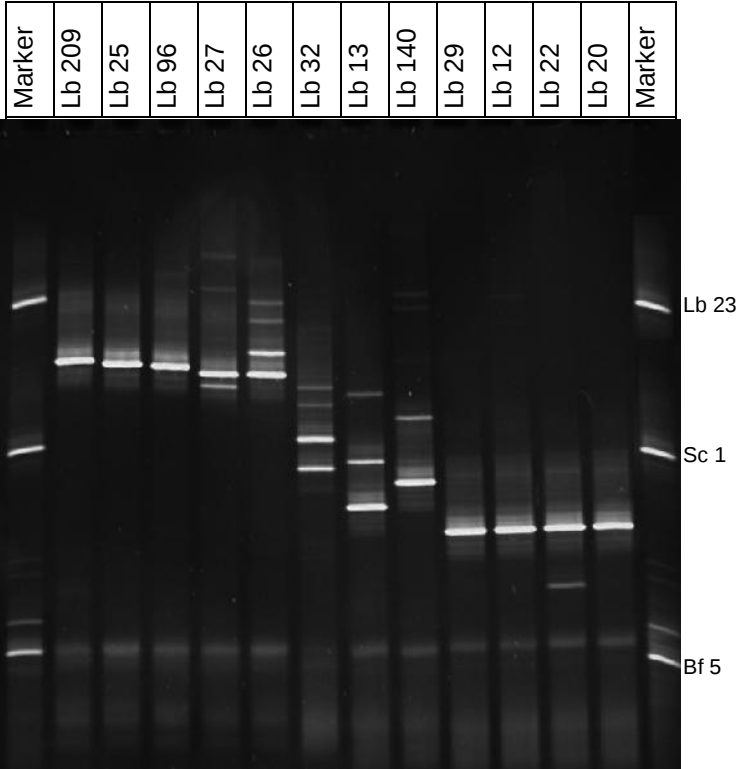


Abbildung 9: DGGE, Leiter, HDA1GC/ HDA2, Gradient: 35-65 %

4.1.2 Universalprimerpaar GC_LbtufF/ LbtufR

Wie auf den obigen Abbildungen (Abbildung 8 und Abbildung 9) zu sehen ist, unterscheidet das HDA1GC/ HDA2 Primerpaar die 24 aufgetragenen *Lactobacillen* in 12 Stufen und neun davon sind eindeutig identifizierbar, da sie sich alleine auf einer „basepairs-Linie“ befinden. Um die, nicht genau identifizierbaren, *Lactobacillen* näher bestimmen zu können wurde ein weiteres Universalprimerpaar herangezogen, GC_LbtufF/ LbtufR. In der Studie von Chen et al. werden *Lactobacillen* in probiotischen Produkten, in Taiwan, untersucht, einerseits mit dem universellen Primerpaar HDA1GC/ HDA2 und andererseits mit dem Primerpaar GC_LbtufF/ LbtufR. In dieser Arbeit wird beschrieben, dass mit dem Primerpaar GC_LbtufF/ LbtufR 20 *Lactobacillen*-Stämme und 8 andere grampositive Bakterien-Stämme getestet worden sind, alle *Lactobacillen*-Stämme generieren ein PCR-Produkt auf der Höhe 214 bp, während die anderen kein Produkt hervorbringen [CHEN H. et al., 2008]

Wie aus dem Artikel hervorgeht eignet sich das Primerpaar GC_LbtufF/ LbtufR besonders für *Lactobacillen*. Um den Primer zu testen wurde zuerst eine PCR mit verschiedenen *Lactobacillen*, ausgewählten *Bifidobakterien*, *Lactococcen* und *Pediococcus*, mit der aus der Literatur erworbenen Annealing-Temperatur von 59 °C, durchgeführt. Diese Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen.

Wie diese beiden AGE-Bilder erkennen lassen erhält man mit dem Primerpaar GC_LbtufF/ LbtufR schöne Bandenmuster für die *Lactobacillen*, auf der Höhe 214 bp, wie in der Literatur beschrieben, aber keine eindeutigen Muster für die anderen Stämme. Die *Lactobacillen* Lb 32, Lb 92, Lb 95, Lb 96 und Lb 198 geben auf diesen Bildern kein Produkt, hier wird zunächst mit den DGGE-Gelen (Abbildung 12 und Abbildung 13) verglichen, die genau bei diesen Bakterien auch keine Banden zeigen.

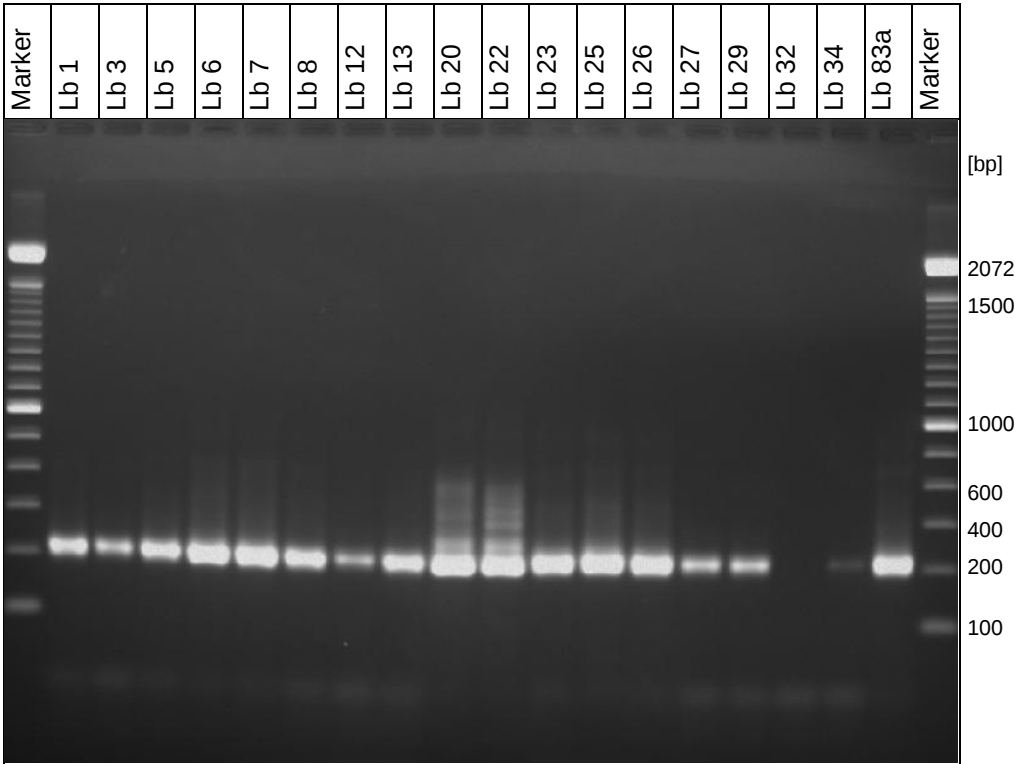


Abbildung 10: AGE mit GC_LbtuffF/ LbtuffR, 59 °C

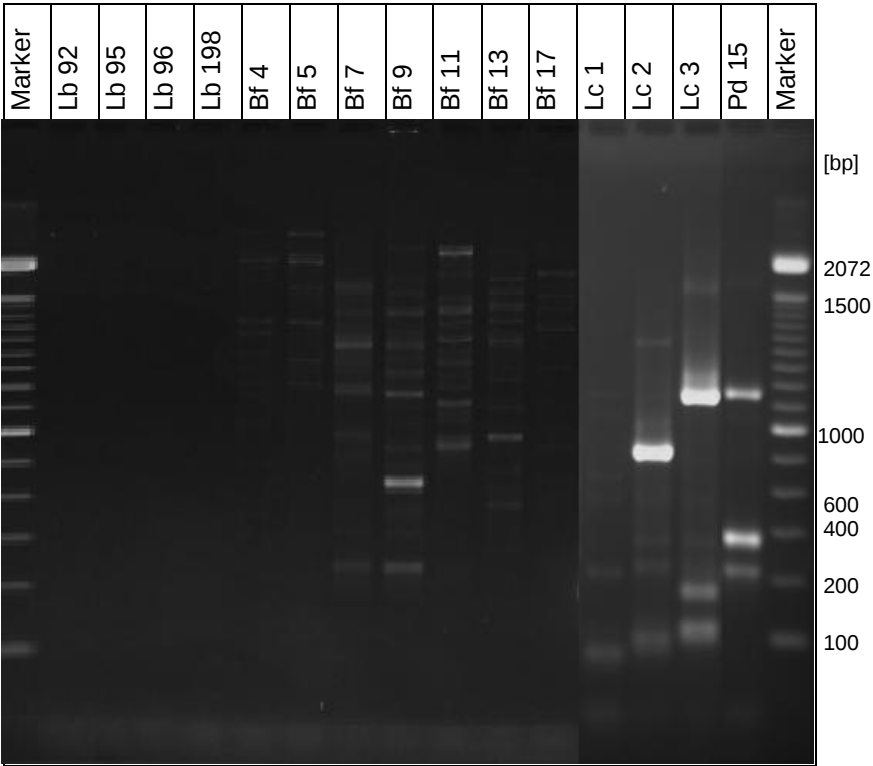


Abbildung 11: AGE mit GC_LbtuffF/ LbtuffR, 59 °C

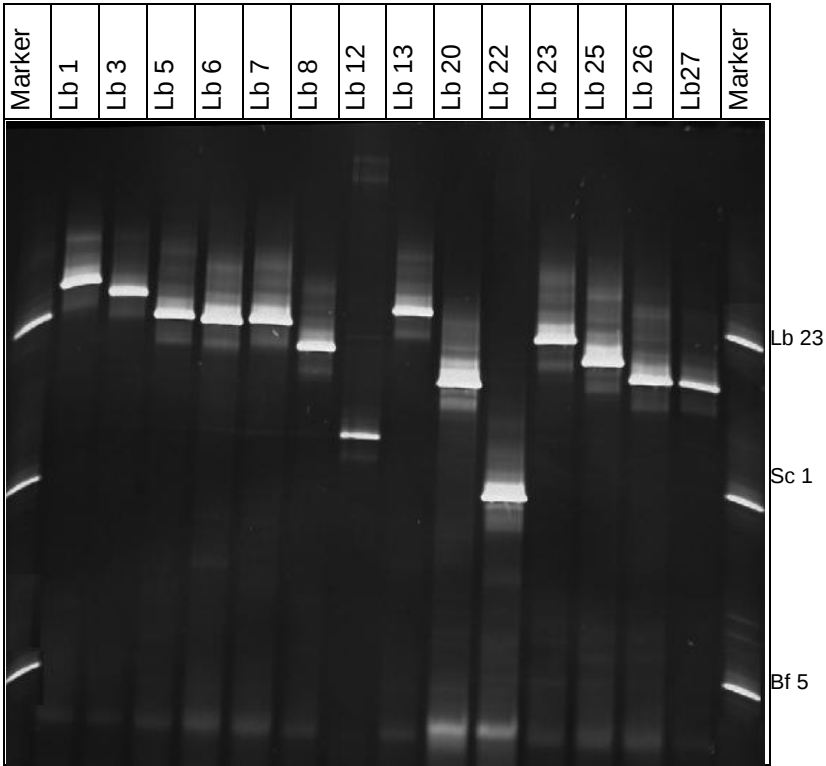


Abbildung 12: DGGE mit GC_LbtuffF/ LbtufR, 59 °C, Gradient: 35-65 %

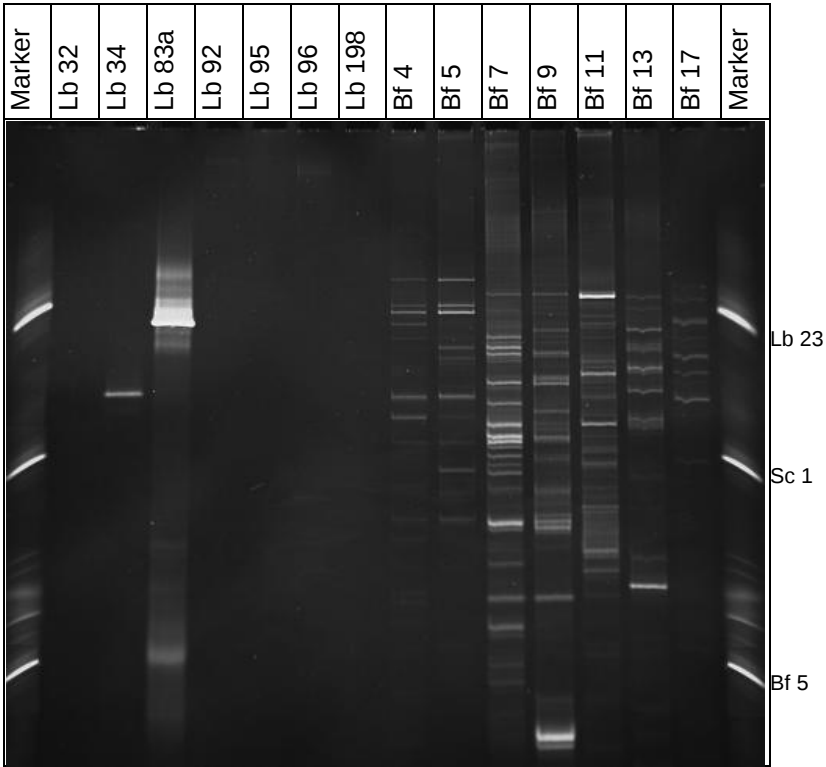


Abbildung 13: DGGE mit GC_LbtuffF/ LbtufR, 59 °C, Gradient: 35-65 %

Um auch hier eventuell Banden erhalten zu können wird versucht die Annealingtemperatur so zu optimieren, dass diese Stämme auch amplifizieren. Es wurden Temperaturversuche mit 50 °C und 52 °C (Abbildung 14), 55 °C und 56 °C (Abbildung 15), 57 und 59 °C (Abbildung 16) und mit 61 °C und 63 °C (Abbildung 17) durchgeführt. Die stärksten Banden werden mit 56 °C erhalten, daher wird mit dieser Annealingtemperatur weitergearbeitet, obwohl hier Lb 32, Lc 1 und Bf 4 nicht angezeigt werden. Das GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaar amplifiziert die Lactococcen-Stämme nicht, daher werden nun Lactobacillen und Bifidobakterien weiteruntersucht.

Da für die Bifidobakterien keine eindeutigen Bandenmuster entstanden sind, diese haben eine untypische „Bandenreihe“, die sich über die ganze Spur zieht, gezeigt, wird versucht mit sehr hohen Annealingtemperaturen zu arbeiten um eine eindeutige Identifizierung vornehmen zu können. (Abbildung 18) Mit 65 °C und 67 °C wurde der Versuch durchgeführt, jedoch verschwinden dann die Banden für die *Bifidobakterien*, daraus wird geschlossen nur mit Lactobacillen in Zusammenhang mit dem GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaar zu arbeiten.

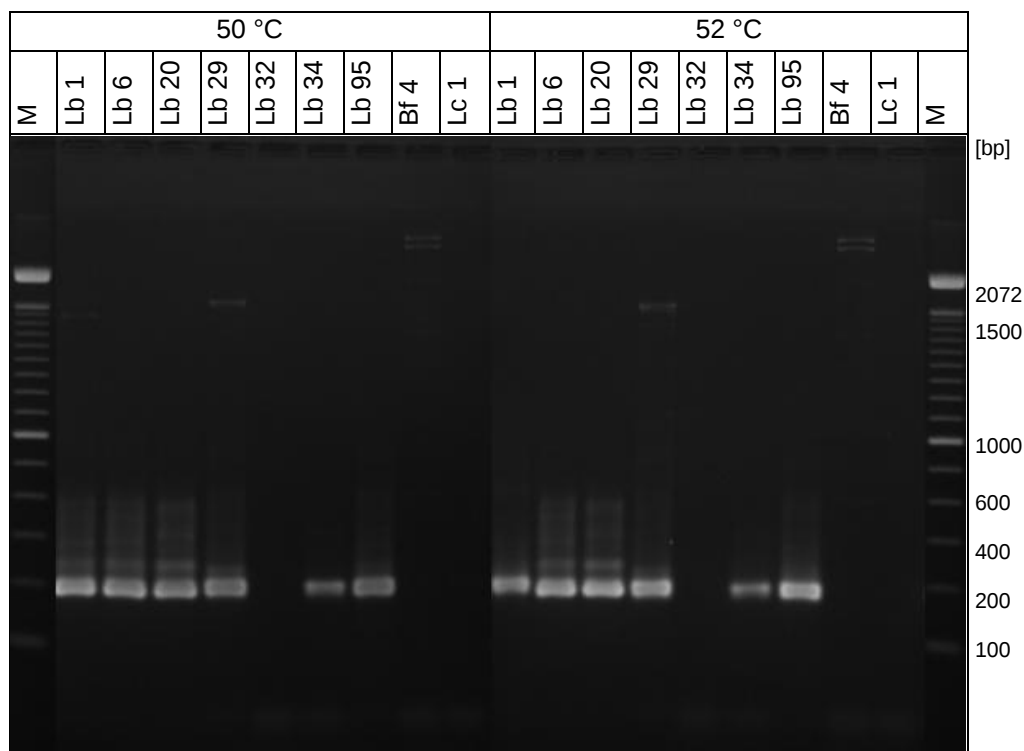


Abbildung 14: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, Temperaturversuch

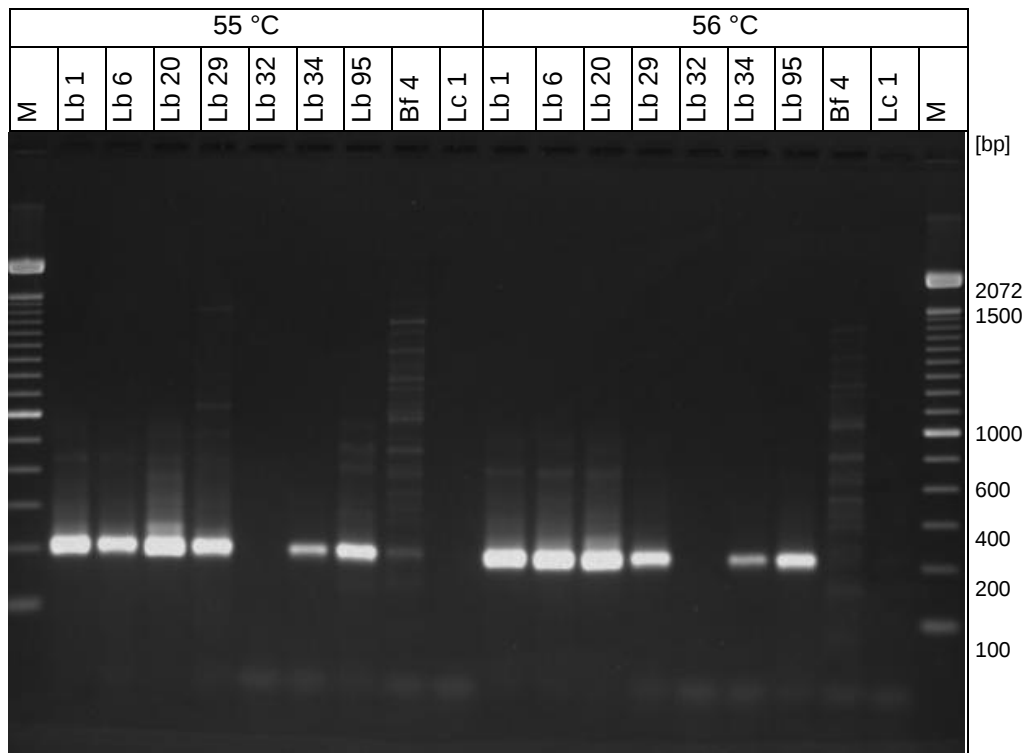


Abbildung 15: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, Temperaturversuch

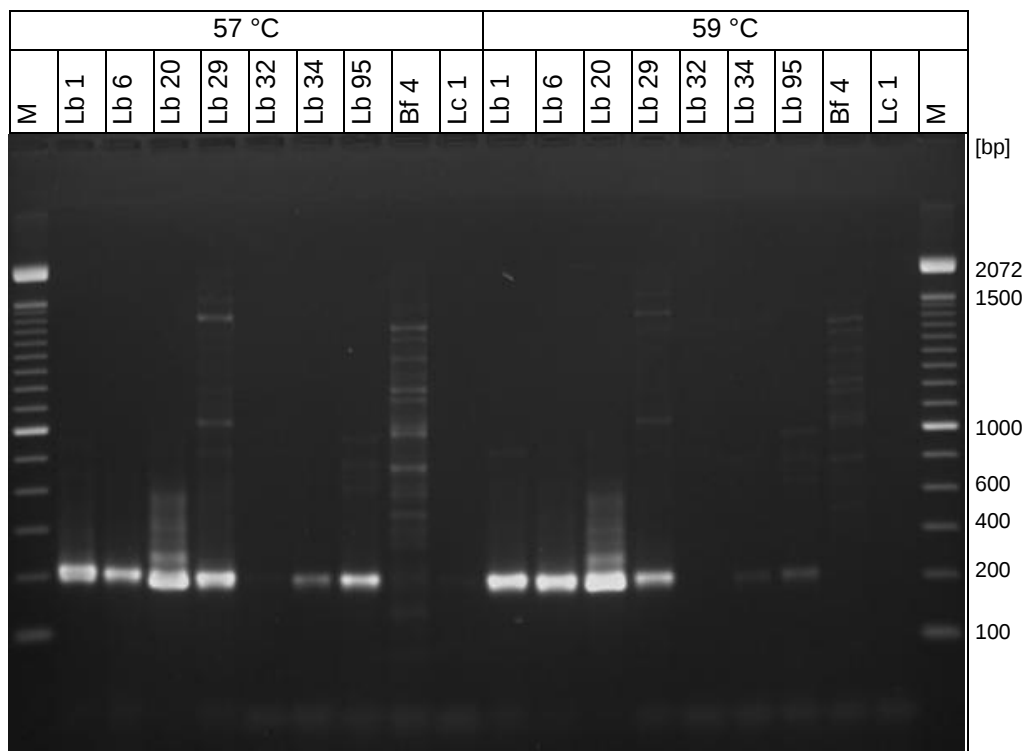


Abbildung 16: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, Temperaturversuch

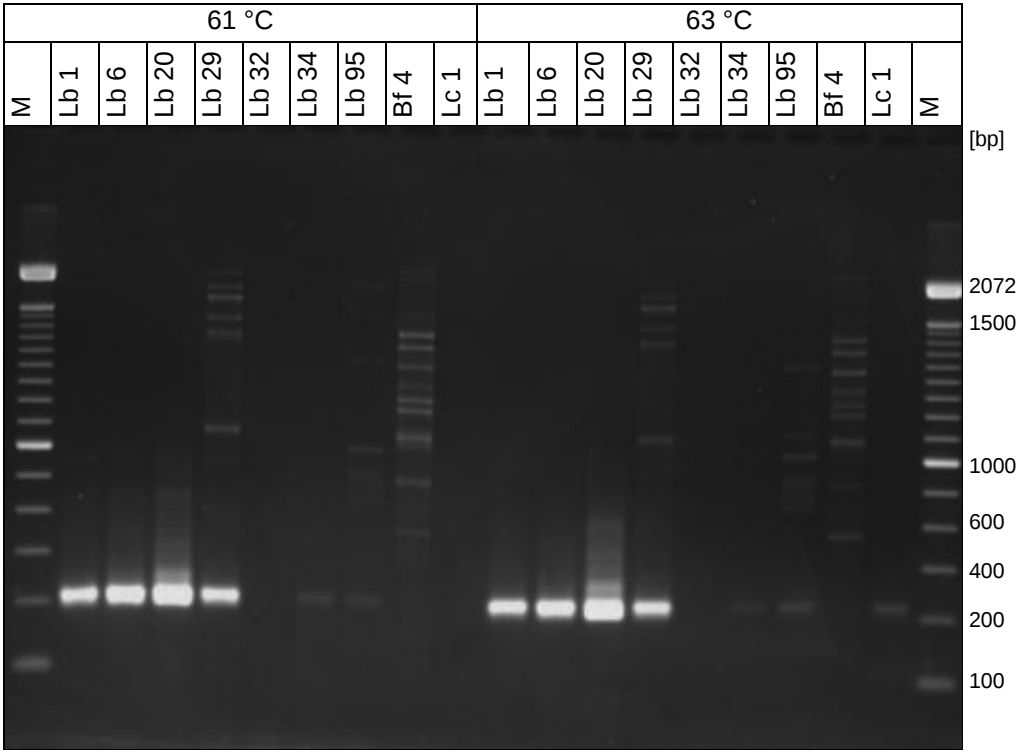


Abbildung 17: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, Temperaturversuch

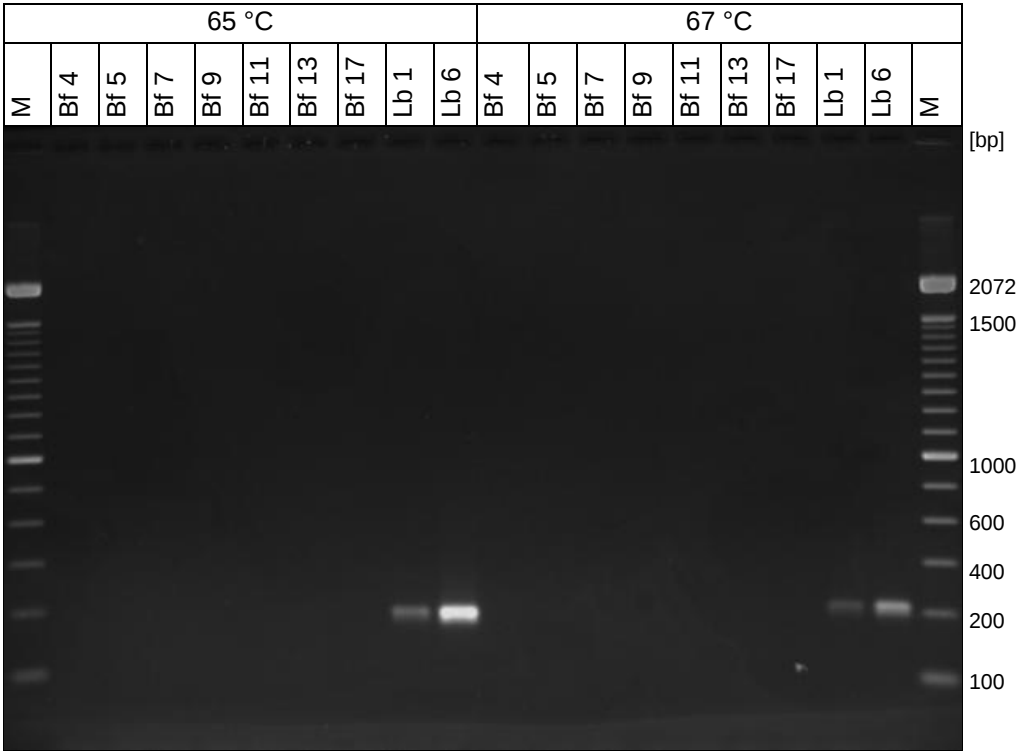


Abbildung 18: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, Temperaturversuch

In Abbildung 13 sieht man keine Banden bei den Lactobacillen: Lb 32, Lb 92, Lb 95, Lb 96 und Lb 198. Daher werden die Bakterien mit anderen Primern ausprobiert, um festzustellen, ob es an der Probe oder dem Primerpaar liegt, dass keine Amplifizierung stattfindet. Außerdem werden neue Aliquote der Typstämme verwendet, um hier eine Fehlerquelle ausschließen zu können und anschließend wird erneut eine Agarosegelelektrophorese mit dem Primerpaar GC_LbtufF/ LbtufR durchgeführt um eine Kontrolle zu haben.

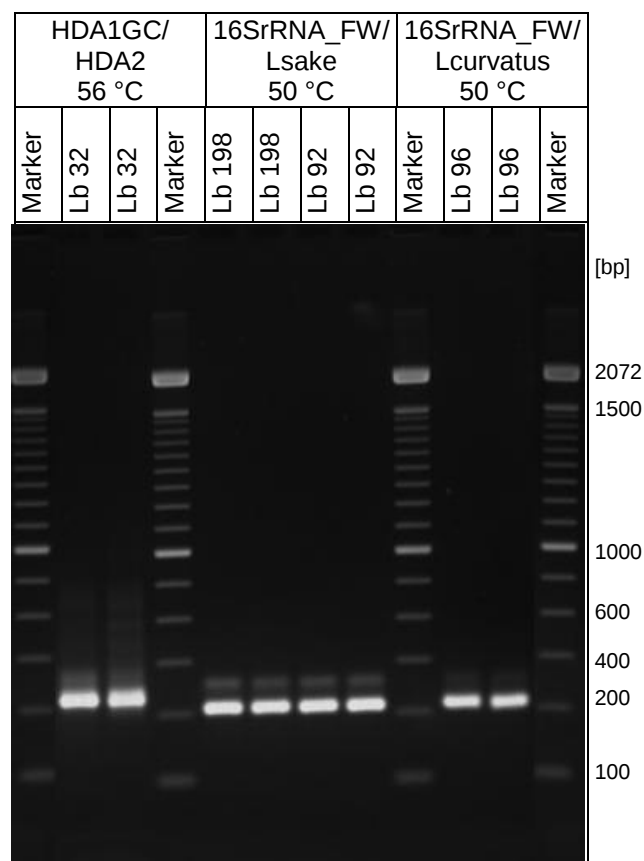


Abbildung 19: AGE, DNA-Kontrolle mittels alternativer Primerpaare

Abbildung 19 lässt nun erkennen, dass die Typstämme jeweils die spezifische DNA enthalten und ein Fehler bei der DNA-Isolierung auszuschließen ist.

Nun wird erneut eine PCR der „Problemstämme“ mit dem GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaar bei 56 °C Annealingtemperatur durchgeführt und auf ein Agarosegel und ein DGGE-Gel aufgetragen. Lb 32, Lb 92, Lb 96 und Lb 198 amplifizieren mit dem GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaar nicht. (Abbildung 20)

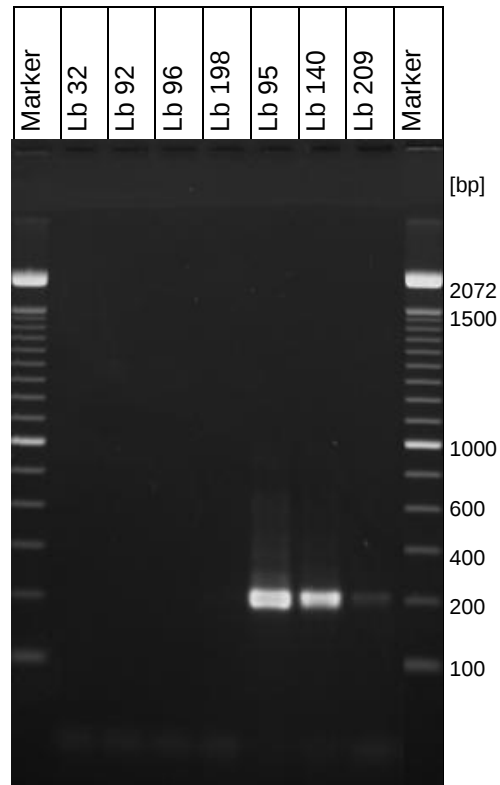


Abbildung 20: AGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C

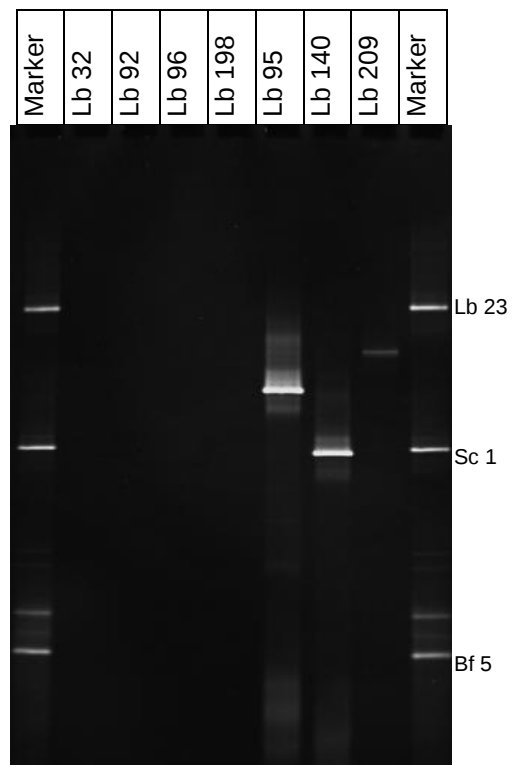


Abbildung 21: DGGE mit GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C

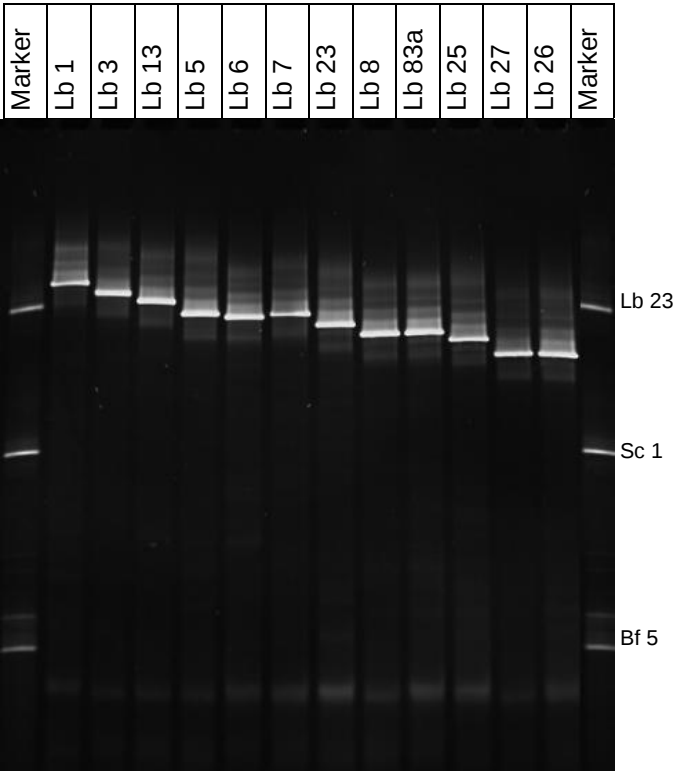


Abbildung 22: DGGE mit GC_LbtuffF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **35-65 %**

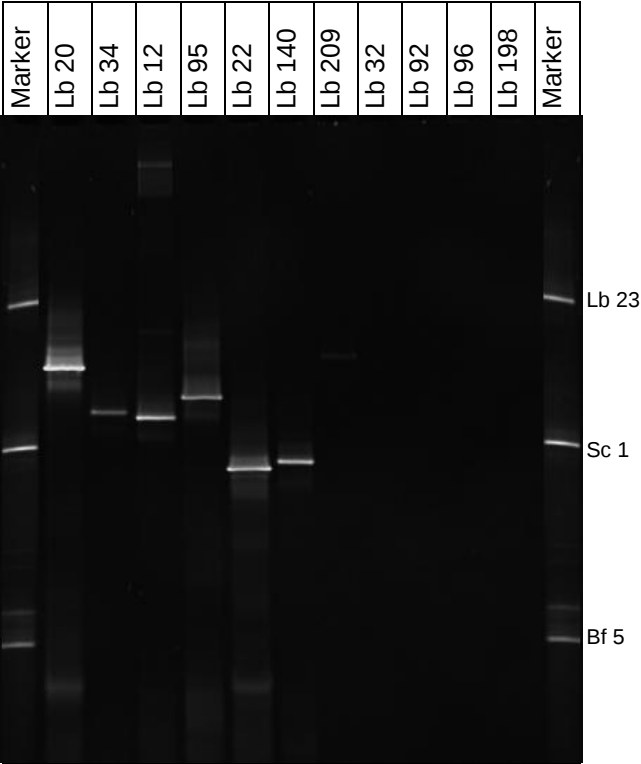


Abbildung 23: DGGE mit GC_LbtuffF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **35-65 %**

Leiterförmige Reihenfolge in 14 Stufen:

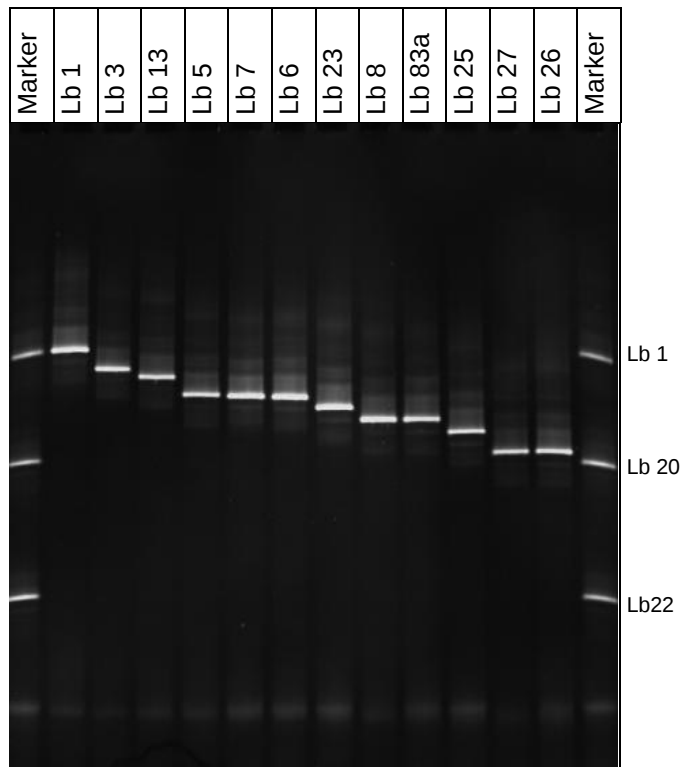


Abbildung 24: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **35-55 %**

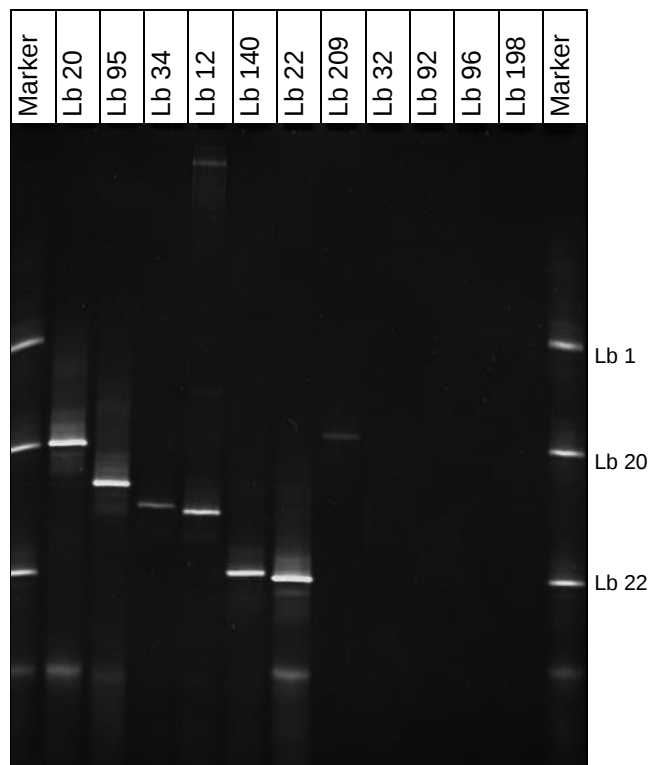


Abbildung 25: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **35-55 %**

Aus Abbildung 12 und Abbildung 13 wurden die Höhen anhand der Marker-Banden als Referenzlinie abgenommen und eine Reihenfolge in Leiterform erstellt. In Abbildung 22 und Abbildung 23 sieht man den ersten Versuch der GC_LbtufF/ LbtufR-Leiter mit dem Gradienten 35-65 %, wobei die Reihung noch nicht optimal ist und das Gel in seiner Höhe noch nicht gut ausgenutzt ist. Es werden nun verschiedene Gradienten ausprobiert um eine weitere Spanne und somit eine bessere und klarere Auftrennung zu erreichen. Außerdem werden nun Marker-Banden verwendet, die auch mit dem GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaar vervielfältigt worden sind: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* und *Lactobacillus casei*.

Abbildung 24 und Abbildung 25 zeigen nun die Lactobacillen-Datenbank in richtiger Reihenfolge mit 14 Stufen. 23 verschiedene Lactobacillen wurden aufgetragen und davon liegen *Lb. johnsonii*, *Lb. crispatus* und *Lb. amylovorus* auf der gleichen Höhe. Des Weiteren sind *Lb. gallinarum* und *Lb. helveticus* nicht voneinander unterscheidbar. Außerdem zeigen sich *Lb. delbrueckii ssp. lactis* und *Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii* ebenso auf selber Bandenhöhe. Der *Lb. amylolyticus* bildet eine sehr schwache Bande, wird daher am Schluss der Leiter aufgetragen, ebenso die Lactobacillen: *Lb. buchneri*, *Lb. sakei*, *Lb. curvatus ssp. curvatus* und *Lb. sakei ssp. carnosus*, welche keine Banden mit dem GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaar bilden.

Abbildung 26 und Abbildung 27 zeigen die Leiter nun mit dem Gradienten 35-50 %. Hier sind wiederum gleich viele Abstufungen erkennbar, 14 wie zuvor, jedoch kommen die Banden tief im Gel, daher sind die untersten zwei *Lb. casei* und *Lb. mucosae* nicht mehr auf dem Gel.

Die Bilder der weiter ausprobierten Gradienten: 38-52 %, 40-50 % und 40- 55 % sind im Anhang zu finden.

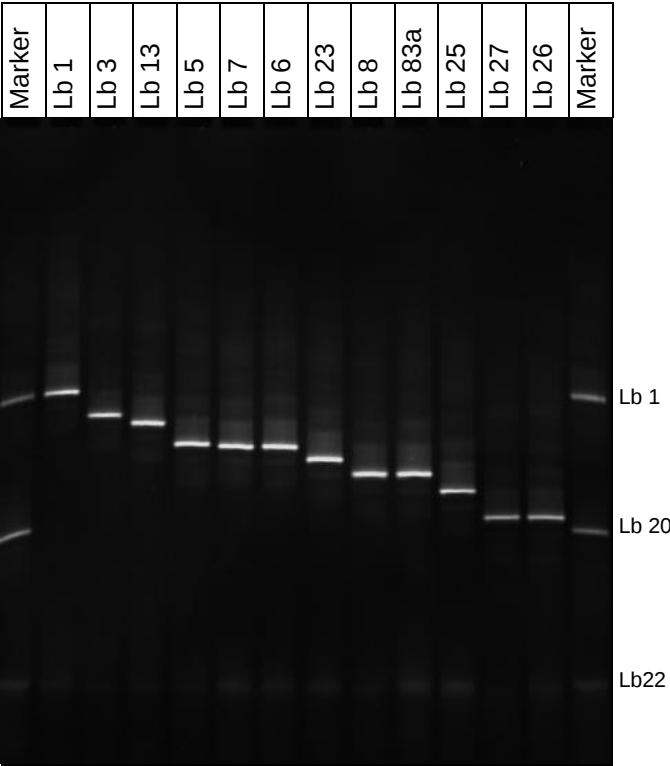


Abbildung 26: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **35-50 %**

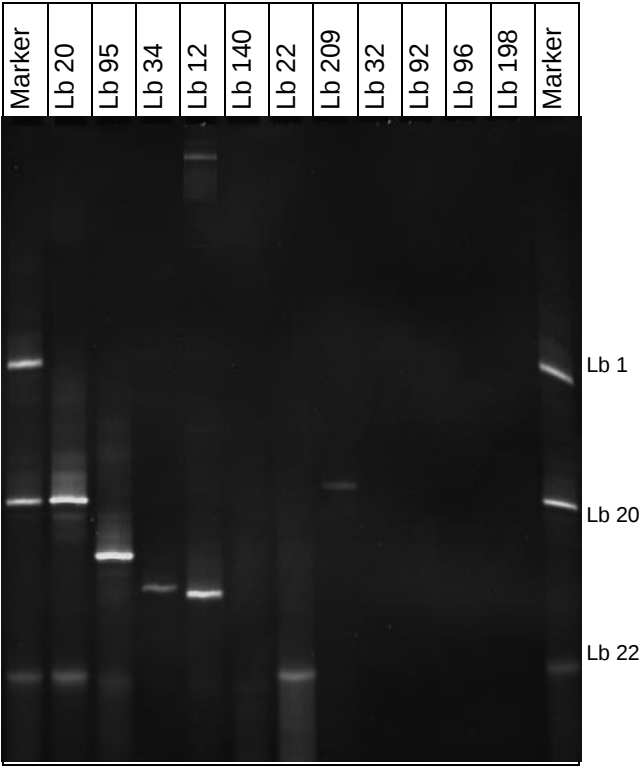


Abbildung 27: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **35-50 %**

Tabelle 24: Vergleich der Primerpaare HDA1GC/ HDA2 und GC_LbtufF/ LbtufR

Bakterienstämme	HDA1GC/ HDA2		GC_LbtufF/LbtufR	
	amplifizierbar ja/ nein	eindeutig unterscheidbar ja/ nein	amplifizierbar ja/ nein	eindeutig unterscheidbar ja/ nein
Lb 1	ja	nein	ja	ja
Lb 3	ja	nein	ja	ja
Lb 5	ja	nein	ja	nein
Lb 6	ja	nein	ja	nein
Lb 7	ja	nein	ja	nein
Lb 8	ja	nein	ja	nein
Lb 12	ja	nein	ja	ja
Lb 13	ja	ja	ja	ja
Lb 20	ja	nein	ja	ja
Lb 22	ja	ja	ja	nein
Lb 23	ja	ja	ja	ja
Lb 25	ja	nein	ja	ja
Lb 26	ja	ja	ja	nein
Lb 27	ja	ja	ja	nein
Lb 32	ja	ja	nein	-
Lb 34	ja	ja	ja	ja *
Lb 83a	ja	nein	ja	nein
Lb 92	ja	nein	nein	-
Lb 95	ja	ja	ja	ja
Lb 96	ja	nein	nein	-
Lb 140	ja	ja	ja	nein
Lb 198	ja	nein	nein	-
Lb 209	ja	nein	ja	ja *
	23	9	19	10

* ... schwache Bande

Tabelle 24 zeigt eine Gegenüberstellung der universellen Primerpaare HDA1GC/ HDA2 (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9) und GC_LbtufF/ LbtufR. Es wurden jeweils Bakterienstämme der Gattung *Lactobacillus* auf die DGGE aufgetragen, um eine Identifizierung aufzuzeigen. Insgesamt wurden jeweils 20 µl der 23 verschiedene *Lactobacillen*-Stämme aufgetragen wobei mit dem HDA1GC/ HDA2- Primerpaar bei 54 °C, 35 Zyklen und einem Gradienten von 38-52 % gearbeitet wurde und mit dem GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaar bei 56 °C, 35 Zyklen und dem Gradienten 35-55 %. Der Vergleich zeigt, dass zwar das HDA1GC/ HDA2- Primerpaar alle 23 Spezies amplifizieren kann, das GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaar nur 19, jedoch nur 9 davon eindeutig unterscheiden lässt, der GC-LbtufF/ LbtufR-Primerpaar 10. Wenn beide Primerpaare verwendet werden und die Ergebnisse verglichen, können 14 Spezies eindeutig unterschieden werden. Diese eindeutige Unterscheidung bedeutet, dass sich diese Banden alleine auf einer „basepairs“-Höhe befinden und somit nicht mit einer anderen Spezies verwechselt werden können. Das HDA1GC/ HDA2-Primerpaar unterscheidet die leiterförmig aufgetragenen Spezies in 12 Stufen, das GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaar in 14. Die grau hinterlegten Felder des GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaares bedeuten eine eindeutige Unterscheidung der *Lactobacillen*, die mit dem HDA1GC/ HDA2-Primerpaar nicht unterschieden werden können. Zusammenfassend bedeutet dies, dass zwar das HDA1GC/ HDA2-Primerpaar mehr Stämme amplifiziert, jedoch die Differenzierung der Stämme Lb 20, Lb 25 und Lb 209 nur mit dem GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaar erfolgt.

4.2 Verdünnungsreihen

Mit den Bakterienstämmen *Lb. rhamnosus* (Lb 29), *Lb. acidophilus* (Lb 19), und *Streptococcus thermophilus* (Sc 1) wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Es wurde von der bereits isolierten DNA der Stämme ausgegangen, die eine Anzahl von 10^9 KBE/ ml enthält. Diese Ausgangskonzentration wurde in 8 Verdünnungsstufen bis 10^1 herunter verdünnt. Hierfür wurde ein Aliquot aus der bereits isolierten DNA genommen und in acht weitere Reagenzgefäße, in welche 180 µl AE-Puffer vorgelegt worden sind, jeweils 20 µl weiter pipettiert, sodass sich die Lösung in jedem Schritt um den Faktor 10 weiter verdünnt. Mit den hergestellten Verdünnungsreihen wurden eine PCR mit den speziesspezifischen Primerpaaren für die Agarosegelelektrophorese und eine im doppelten Ansatz, mit dem Universalprimerpaar HDA1GC/ HDA2, für die denaturierende Gradientengelelektrophorese, mit 45 Zyklen, durchgeführt. Weiters wurde eine Real-Time PCR ausgeführt um die methodenspezifische Nachweisgrenze der einzelnen Bakterienstämme zu bestimmen und vergleichen zu können.

4.2.1 Verdünnungsreihe *Lactobacillus rhamnosus* 10^9 - 10^1

4.2.1.1 Universelle und speziesspezifische PCR

Wenn mit dem universellen Primerpaar HDA1GC/ HDA2 die PCR durchgeführt wird und die Produkte der Verdünnungsreihe auf ein Agarosegel aufgetragen werden, amplifizieren alle Proben auf der Höhe 250 bp mit einer gleich starken Bande, da nicht nur das spezifische Produkt angezeigt wird, sondern auch unspezifische Produkte amplifizieren (Abbildung 28). Wird nun die PCR mit dem Speziesspezifischen Primerpaar Rham/ Y2 durchgeführt und die Verdünnungsreihe wieder auf eine Agarosegelelektrophorese aufgetragen erhält man Banden, die im Verlauf abschwächen, da umso höher die Verdünnung wird, weniger Produkt amplifiziert werden kann. Es wurden einerseits mit Verdünnungsreihen von Elisabeth Hochreiter gearbeitet, die 2007 hergestellt wurden und in der Zwischenzeit eingefroren wurden, andererseits wurden Verdünnungsreihen aus den 3 Bakterienstämmen, wie oben beschrieben, selbst hergestellt.

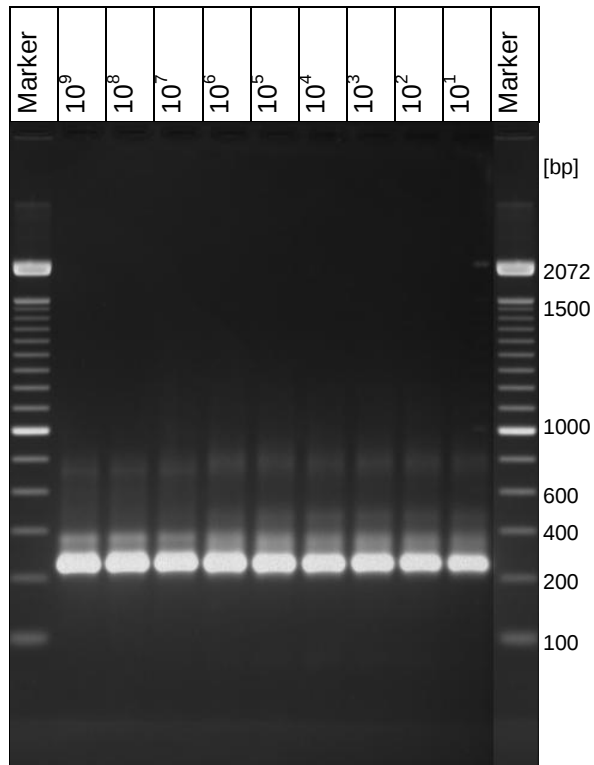


Abbildung 28: Lb 29, AGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C

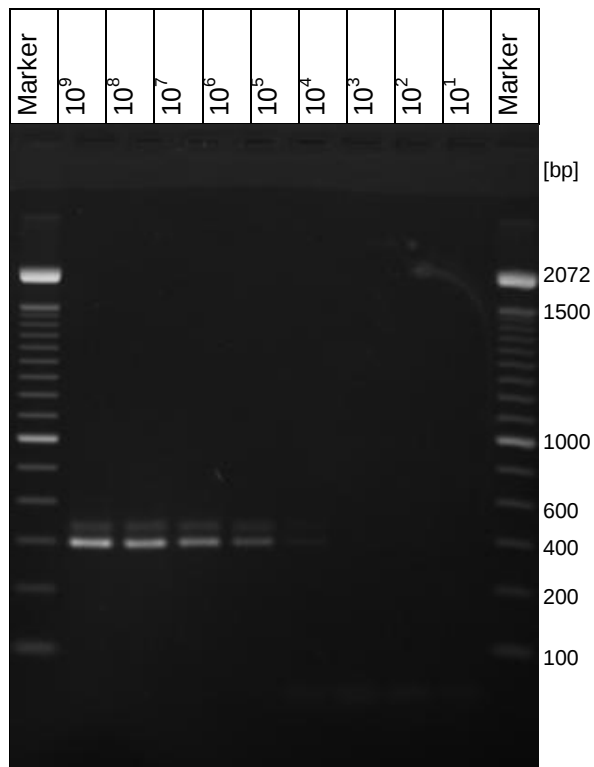


Abbildung 29: Lb 29, AGE mit Rham/ Y2, 55 °C, alte Verdünnung

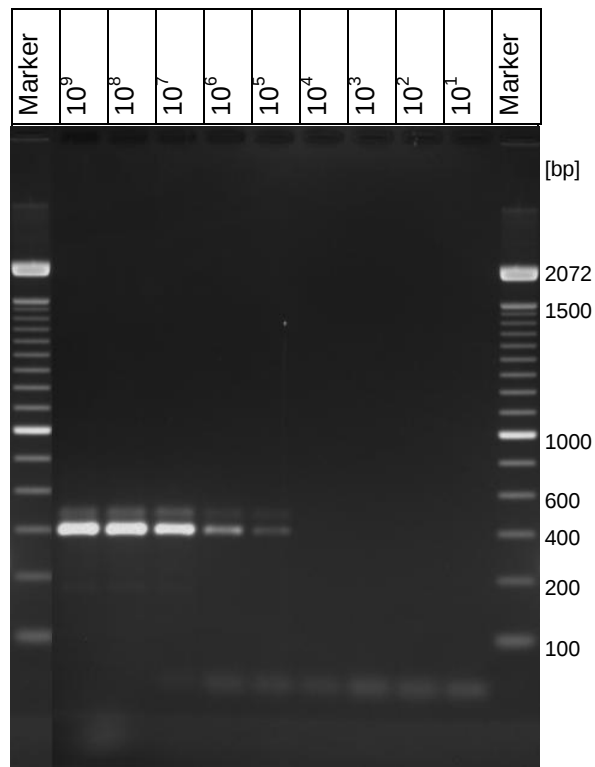


Abbildung 30: Lb 29, AGE mit Rham/ Y2, 55 °C, neue Verdünnung

In Abbildung 29 und Abbildung 30 liegt in beiden Fällen die Nachweisgrenze bei der Verdünnungsstufe 10^5 KBE/ ml und es ist eine Abschwächung des Bandenmusters nach Verdünnungsgrad mitverfolgbar, doch ist deutlich erkennbar, dass die Bandenintensität in der neuen Verdünnung stärker ausgeprägt ist, als in der Alten.

4.2.1.2 Denaturierende Gradientengelelektrophorese

Die DGGE-Bilder können nun mit den AGE-Bildern verglichen werden, die auch ihre Nachweisgrenze bei der Verdünnungsstufe 10^5 KBE/ ml finden. In den DGGE-Bildern ist zwischen alter und neuer Verdünnung kein großer Unterschied erkennbar. Ungefähr auf der Höhe des *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* finden sich auf den DGGE-Bildern unspezifische Banden, die sich verstärken umso geringer das spezifische Produkt wird. Dies sind die Banden, die wie in Abbildung 28 sichtbar, durch das Universalprimerpaar amplifiziert werden.

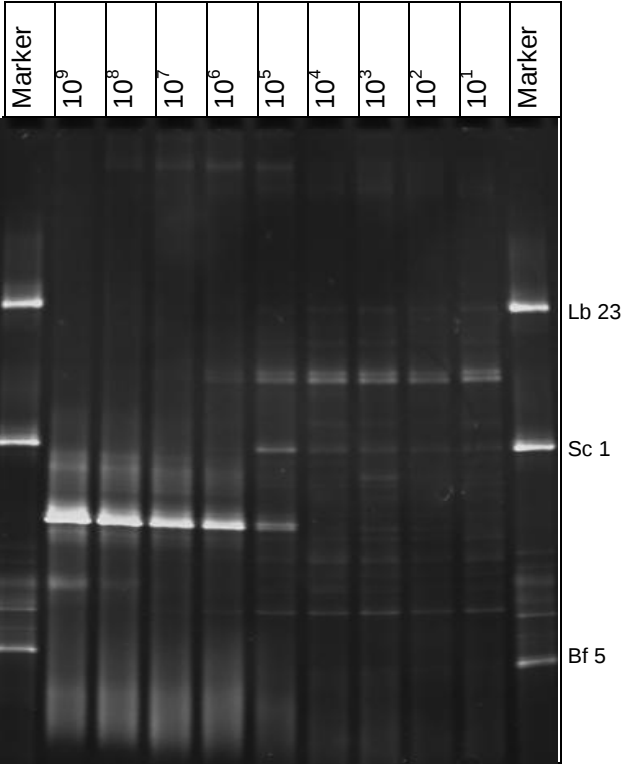


Abbildung 31: Lb 29, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, alte Verdünnung

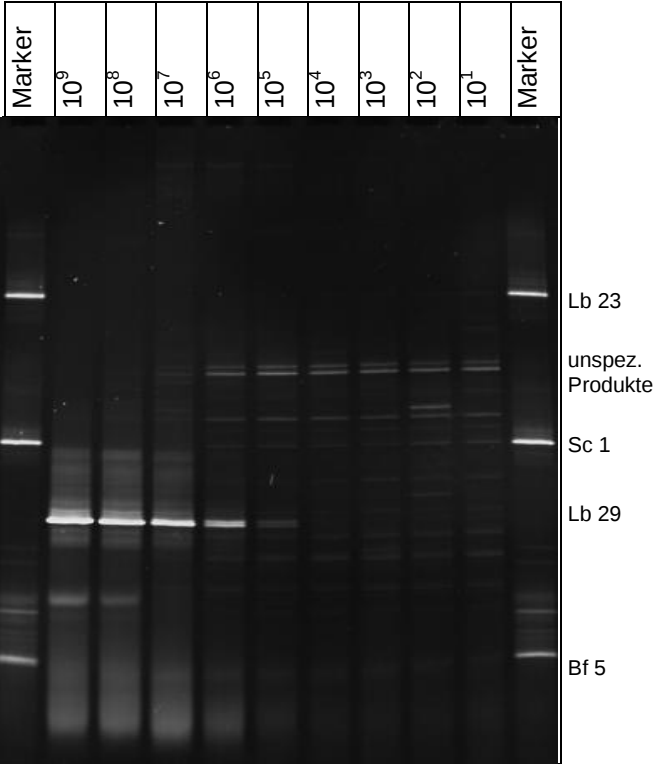


Abbildung 32: Lb 29, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, neue Verdünnung

4.2.1.3 Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR wurden die Verdünnungsreihen von 10^9 KBE/ ml bis 10^1 KBE/ ml nochmals 1:10 verdünnt. Es wurde für jedes Bakterium eine Real-Time PCR mit dem Universalprimerpaar HDA1GC/ HDA2, bei 54 °C und eine mit dem speziesspezifischen Primerpaar mit der jeweilig spezifischen Annealing-Temperatur durchgeführt. Richtwerte für eine optimale Real-Time PCR liegen bei einer Effizienz zwischen 90-105 %, einer Regression von ungefähr 0,98 und einer Geradensteigung von etwa -3,32.

4.2.1.3.1 *Lactobacillus rhamnosus* mit Universalprimer

- Lb 29: 10^9 - 10^1
- Primer: HDA1GC/ HDA2, 54 °C
- Methode: SYBR Green

Tabelle 25: Lb 29, Temperaturprogramm, HDA1GC/ HDA2

Cycle 1	Cycle 2 (45 x)			Cycle 3 (1 x)		Cycle 4 (81 x)	Temp. Change	End. Temp
Step 1	Step 1	Step 2	Step 3	Step 1	Step 2			
95 °C	95 °C	54 °C	72 °C	95 °C	54 °C	54 °C	0.5 °C	95 °C
3 min	15 sec.	40 sec.	20 sec.	20 sec.	30 sec.	10 sec.		
		PCR	Real Time			Melt Curve		

Die obige Tabelle zeigt das verwendete Temperaturprogramm für den *Lactobacillus rhamnosus* mit dem Universalprimerpaar HDA1GC/ HDA2. Dieses wurde für den *Lactobacillus acidophilus* und *Streptococcus thermophilus* auch verwendet, wenn mit diesem Universalprimerpaar gearbeitet wurde.

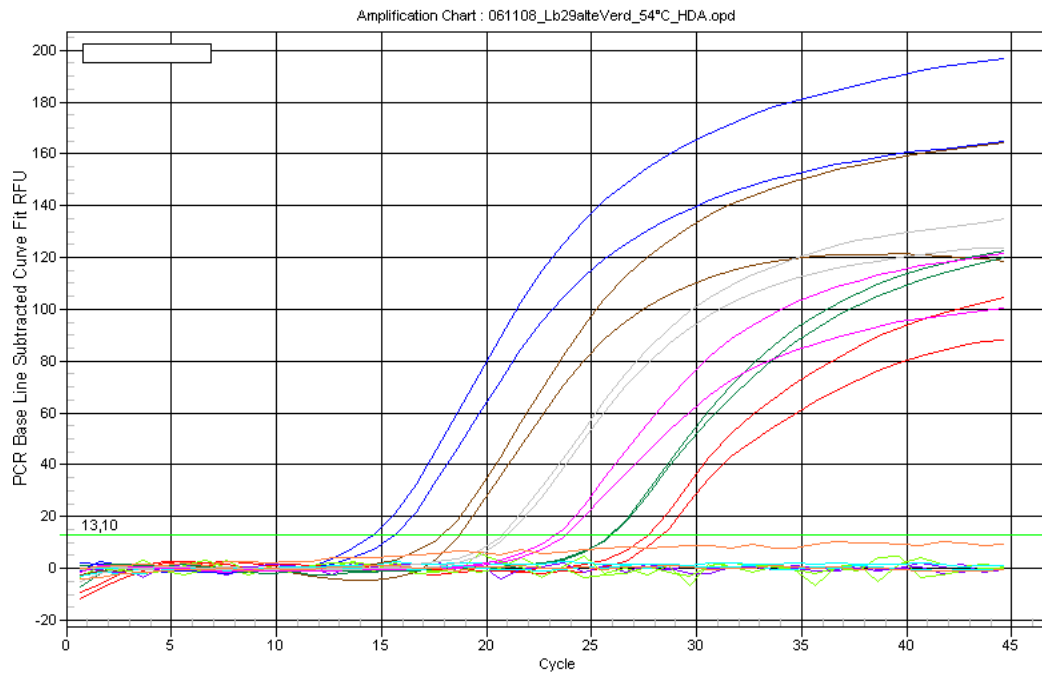


Abbildung 33: Lb 29, Amplifikationskurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , NTC

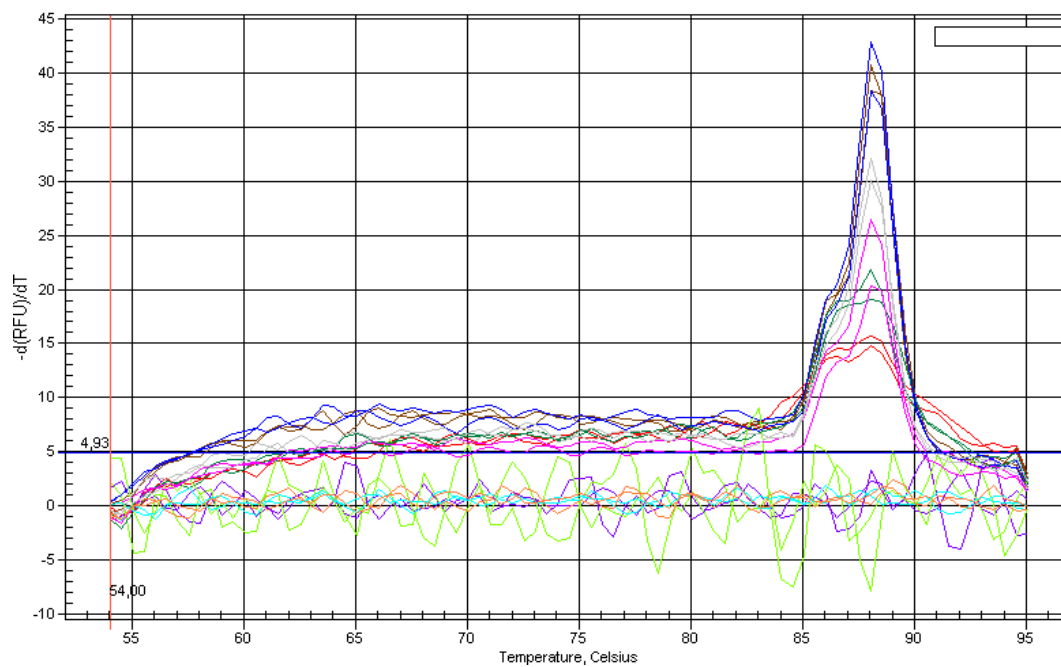
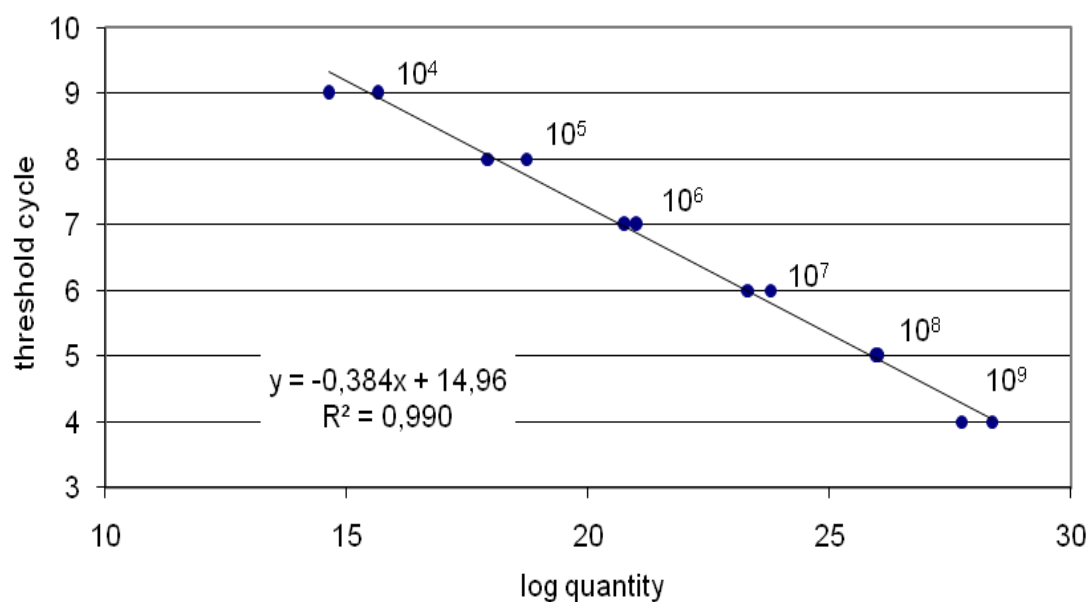


Abbildung 34: Lb 29, Schmelzkurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

Tabelle 26: Lb 29, Threshold Cycle

Probennummer	C _T -Wert	KBE/ ml	log
5	28,38	10 ⁴	4
5	27,73	10 ⁴	4
6	25,95	10 ⁵	5
6	26,00	10 ⁵	5
7	23,78	10 ⁶	6
7	23,33	10 ⁶	6
8	20,77	10 ⁷	7
8	21,02	10 ⁷	7
9	18,73	10 ⁸	8
9	17,95	10 ⁸	8
10	14,64	10 ⁹	9
10	15,65	10 ⁹	9

Abbildung 35: Lb 29, Standardgerade, E= 135,6%, R²= 0,990

4.2.1.3.2 *Lactobacillus rhamnosus* mit speziesspezifischem Primer

- Lb 29: 10^9 - 10^1
- Primer: Rham1/ Y2, 60 °C
- Methode: SYBR Green1

Tabelle 27: Lb 29, Temperaturprogramm, Rham1 /Y2

Cycle 1	Cycle 2 (45 x)			Cycle 3 (1 x)		Cycle 4 (81 x)	Temp. Change	End. Temp
Step 1	Step 1	Step 2	Step 3	Step 1	Step 2			
95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	95 °C	60 °C	60 °C	0.5 °C	95 °C
3 min	15 sec.	40 sec.	20 sec.	20 sec.	30 sec.	10 sec.		
		PCR	Real Time			Melt Curve		

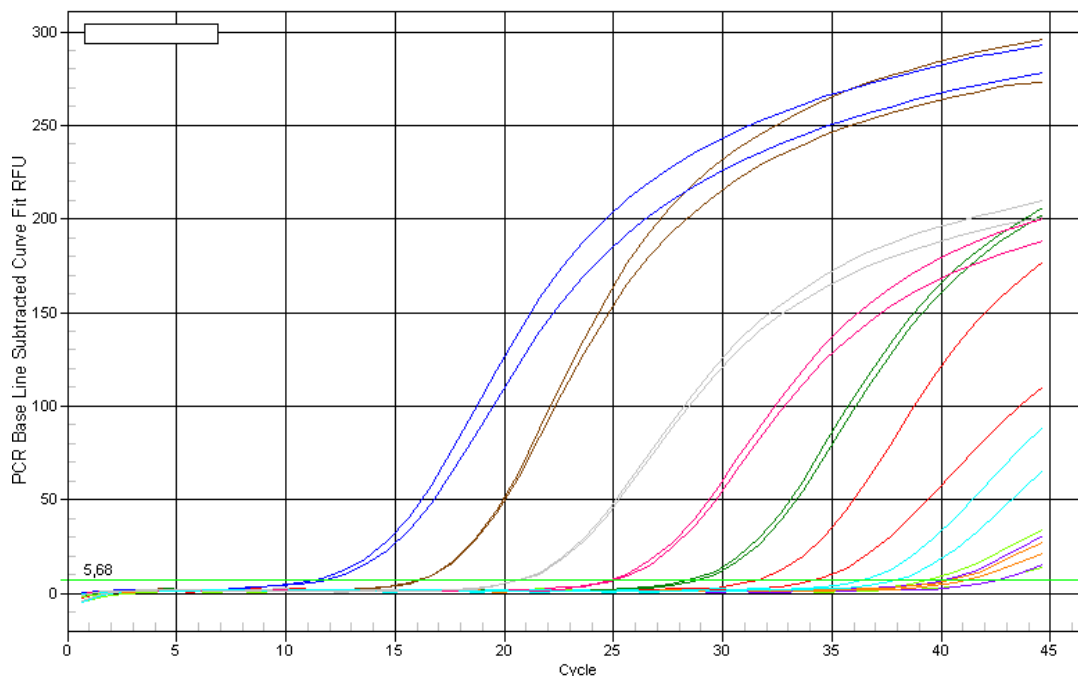


Abbildung 36: Lb 29, Amplifikationskurve, Rham1 /Y2 , 60 °C

10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , NTC

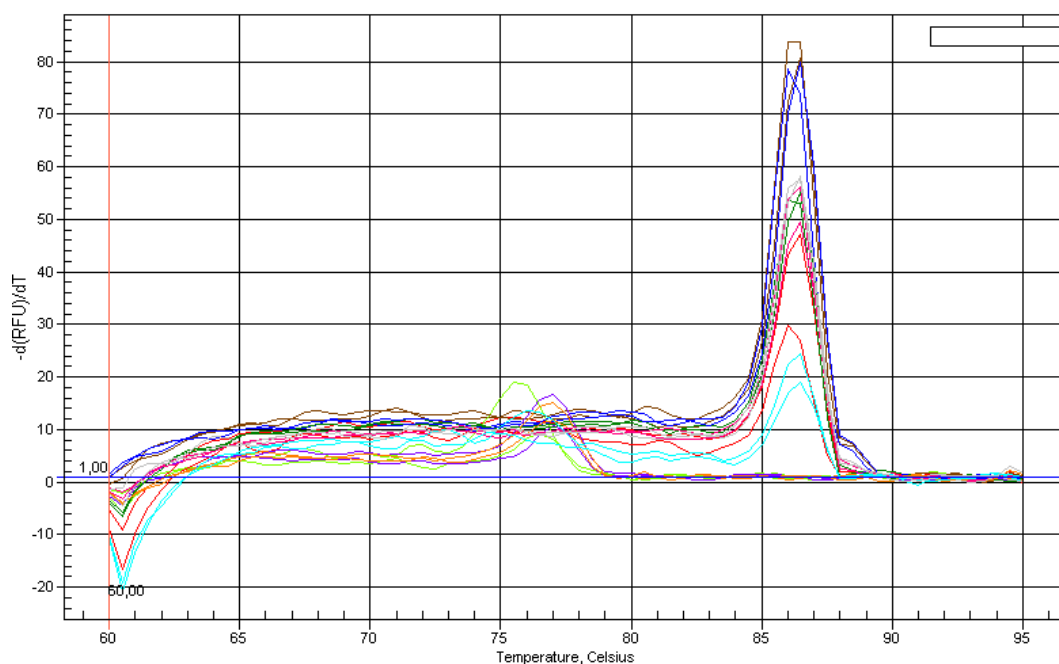


Abbildung 37: Lb 29, Schmelzkurve, Rham1 /Y2 , 60 °C

Tabelle 28: Lb 29, Threshold Cycle

Probennr.	C _T -Wert	KBE/ ml	log
1	39,41	0	NTC
1	42,67	0	NTC
2	40,12	10 ¹	1
2	42,66	10 ¹	1
3	40,43	10 ²	2
3	41,14	10 ²	2
4	37,97	10 ³	3
4	36,33	10 ³	3
5	34,22	10 ⁴	4
5	31,61	10 ⁴	4
6	28,47	10 ⁵	5
6	28,93	10 ⁵	5
7	24,82	10 ⁶	6
7	25,06	10 ⁶	6
8	20,75	10 ⁷	7
8	20,62	10 ⁷	7
9	16,07	10 ⁸	8
9	16,08	10 ⁸	8
10	11,22	10 ⁹	9
10	11,87	10 ⁹	9

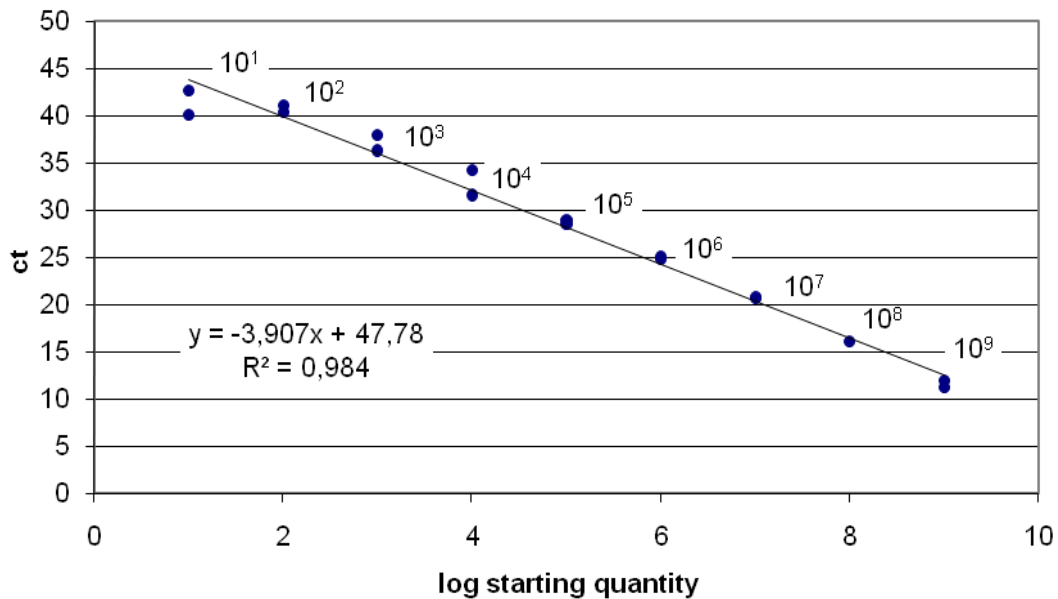


Abbildung 38: Lb 29, Standardgerade, E= 80,3 %, $R^2 = 0,984$

Wenn man nun die RealTime-PCR mit Universalprimerpaar und die mit dem speziesspezifischen Primerpaar miteinander vergleicht bekommt man ein schöneres Ergebnis mit dem Rham1/ Y2- Primerpaar. Die Regression mit 0,984 und Geradensteigung mit -3,907 liegen im optimalen Bereich. Die Effizienz liegt mit dem HDA1 /HDA2- Primerpaar über dem Optimum mit 135,6 % und mit dem spezifischen Primerpaar mit 80,3 % unter dem Optimum. Betrachtet man die Nachweisgrenzen, lässt sich erkennen, dass sie zwischen 10^4 KBE/ ml und im zweiten Fall bei 10^3 KBE/ ml, liegen, da die Amplifikationskurve auch noch einen Anstieg aufweist. Ab 10^4 KBE/ ml liegen die Verdünnungspaare nicht mehr deckungsgleich übereinander, liegen aber noch deutlich auf der Standardgeraden bis 10^2 KBE/ ml. Werden diese Ergebnisse im Vergleich mit der AGE und DGGE betrachtet, erkennt man einen genaueren Nachweis bis in höhere Verdünnungen mit der Real-Time PCR.

4.2.2 Verdünnungsreihe *Lactobacillus acidophilus* 10^9 - 10^1

4.2.2.1 Universelle und speziesspezifische PCR

Es wird auch hier mit dem universellen Primerpaar HDA1GC/ HDA2 eine PCR durchgeführt und die Verdünnungsreihe auf ein Agarosegel aufgetragen. Auch bei diesem Bakterium treten alle Proben auf der Höhe 250 bp mit gleich starken Banden auf. Wird die PCR mit dem speziesspezifischen Primerpaar Aci1Neu/ AciCris bei 60 °C ausgeführt, erscheinen die Banden wieder absteigend in der Stärke umgekehrt proportional zur Verdünnungsstufe. Die folgenden Abbildungen (Abbildung 18 und Abbildung 19) lassen erkennen, dass die Nachweisgrenzen bei 10^5 KBE/ ml in der alten Verdünnung und bei 10^4 KBE/ ml (schwache Bande) der neuen Verdünnung liegen.

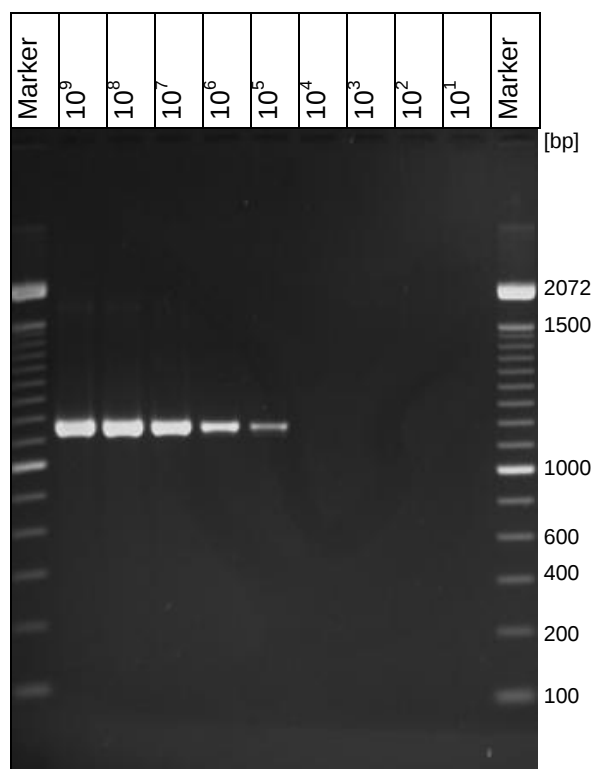


Abbildung 39: Lb 19, AGE mit Aci1Neu/ AciCris, 60 °C, alte Verdünnung

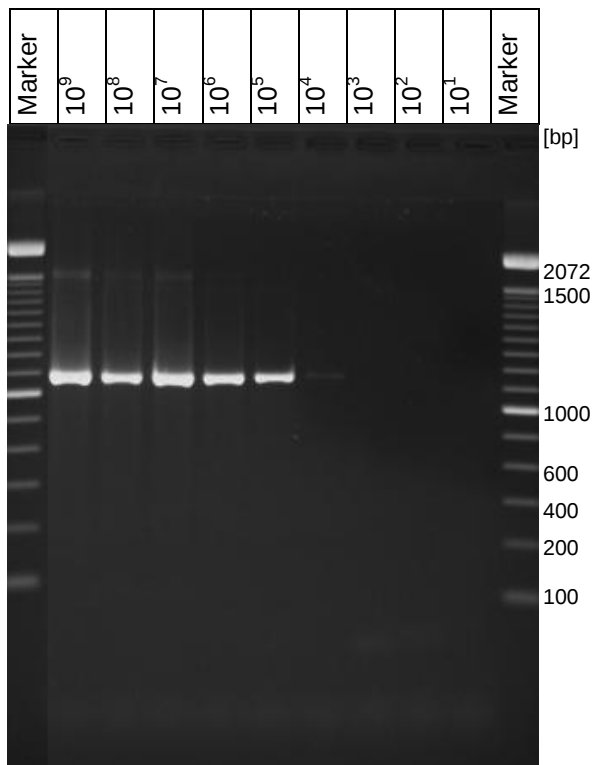


Abbildung 40: Lb 19, AGE mit Aci1Neu/ AciCris, 60 °C, neue Verdünnung

4.2.2.2 Denaturierende Gradientengelelektrophorese

Abbildung 41 und Abbildung 42 zeigen die Verdünnung von Elisabeth Hochreiter im Vergleich mit der neu hergestellten Verdünnung. In beiden Fällen ist die Nachweisgrenze schwer erkennbar, da sich die unspezifischen Banden fast auf derselben bp-Höhe befinden und sich die Intensität der unspezifischen Produkte mit dem Weniger-werden des spezifischen Produkts indirekt Proportional steigert. In beiden Verdünnungen zeigen sich im Verlauf von 10^9 bis 10^5 KBE/ml klar abschwächende Banden, ab 10^4 KBE/ml ist das spezifische Produkt nicht mehr eindeutig von den unspezifischen Banden zu trennen, da diese in einer Doppelbande verlaufen. Wenn mit den AGE-Bildern ein Vergleich gezogen wird, liegt die Nachweisgrenze für beide Methoden für den *Lactobacillus acidophilus* bei 10^5 KBE/ml.

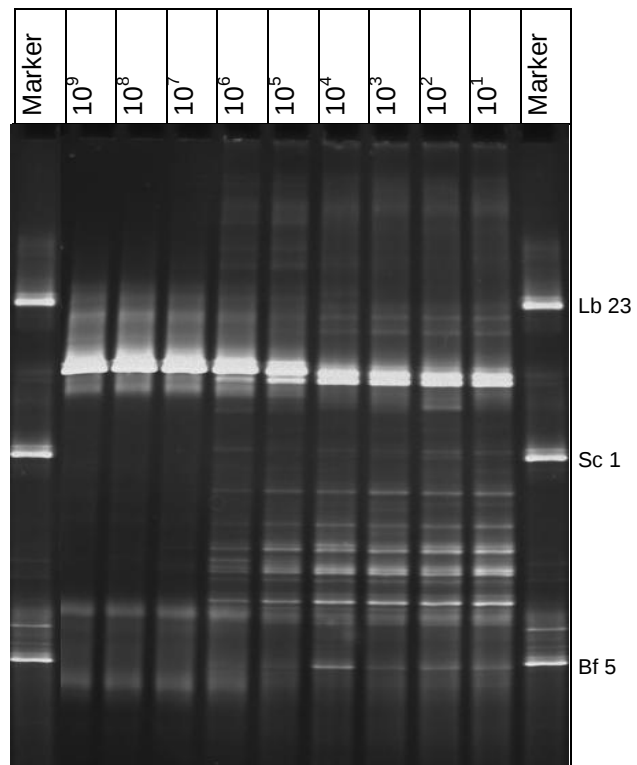


Abbildung 41: Lb 19, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, alte Verdünnung

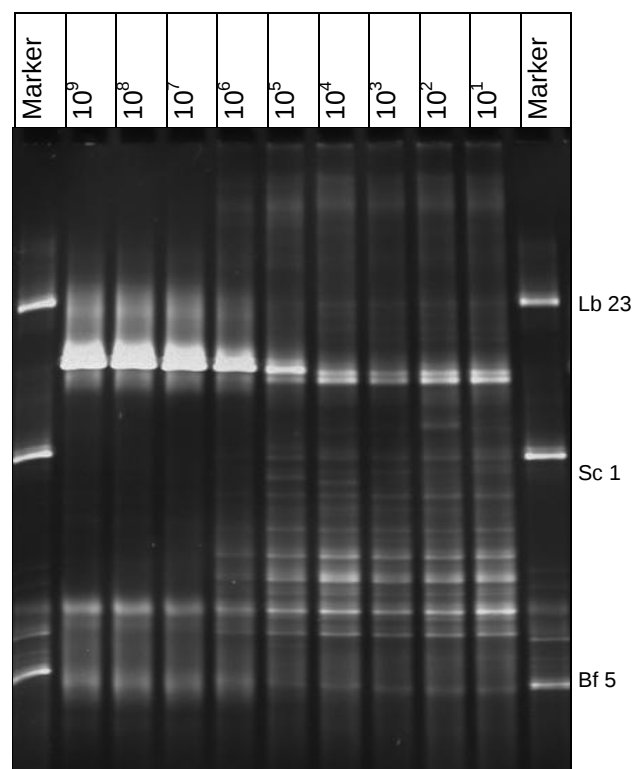


Abbildung 42: Lb 19, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, neue Verdünnung

4.2.2.3 Real-Time PCR

4.2.2.3.1 *Lactobacillus acidophilus* mit Universalprimer

- Lb 29: 10^9 - 10^1
- Primer: HDA1GC/ HDA2, 54 °C
- Methode: SYBR Green1
- Temperaturprogramm: siehe Tabelle 25

Tabelle 29: Lb 19, Treshold Cycle

Probennr.	C _T -Wert	KBE/ ml	log
1	34,97	0	NTC
1	38,73	0	NTC
2	37,07	10^1	1
2	36,37	10^1	1
3	37,00	10^2	2
3	40,35	10^2	2
4	39,19	10^3	3
4	36,35	10^3	3
5	34,72	10^4	4
5	35,83	10^4	4
6	33,40	10^5	5
6	33,23	10^5	5
7	30,27	10^6	6
7	30,69	10^6	6
8	27,82	10^7	7
8	26,88	10^7	7
9	21,76	10^8	8
9	22,88	10^8	8
10	18,70	10^9	9
10	18,39	10^9	9

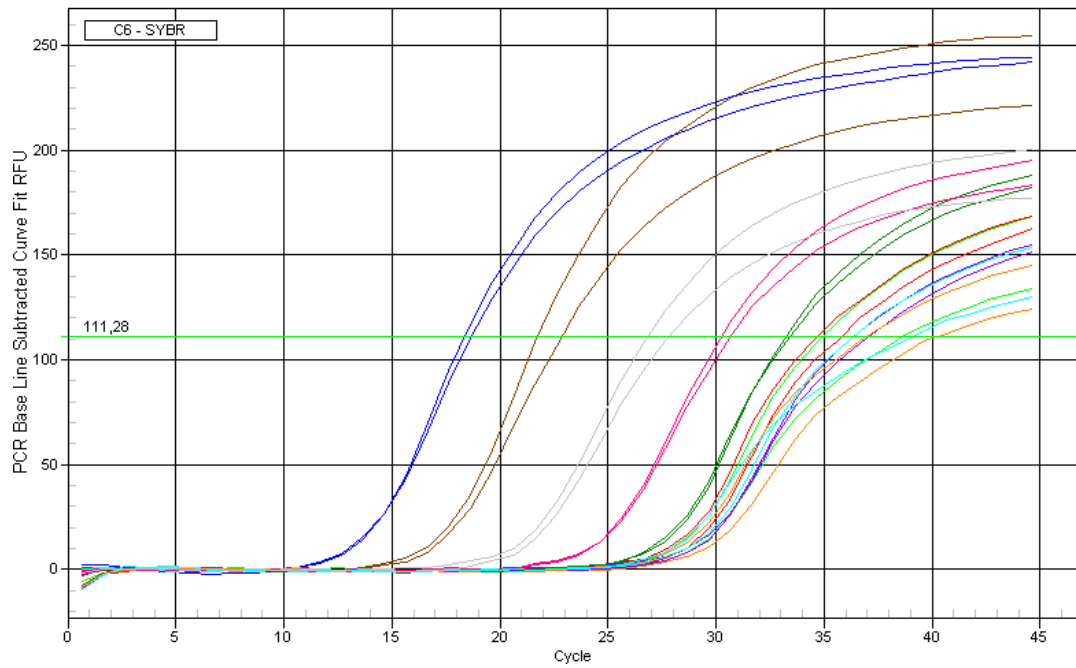


Abbildung 43: Lb 19, Amplifikationskurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , NTC

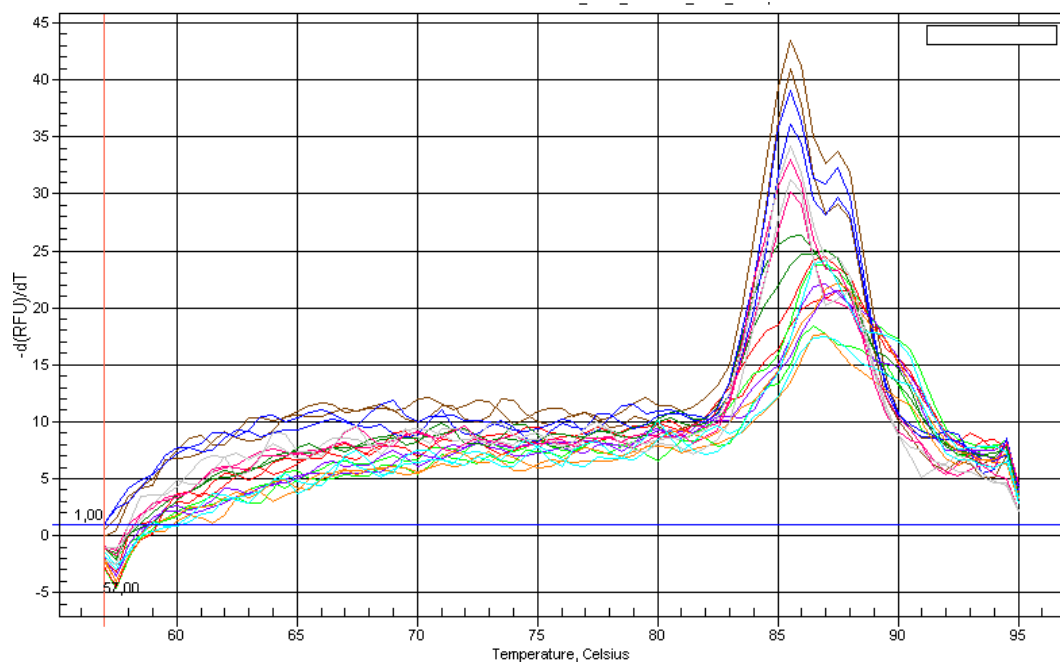


Abbildung 44: Lb 19, Schmelzkurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

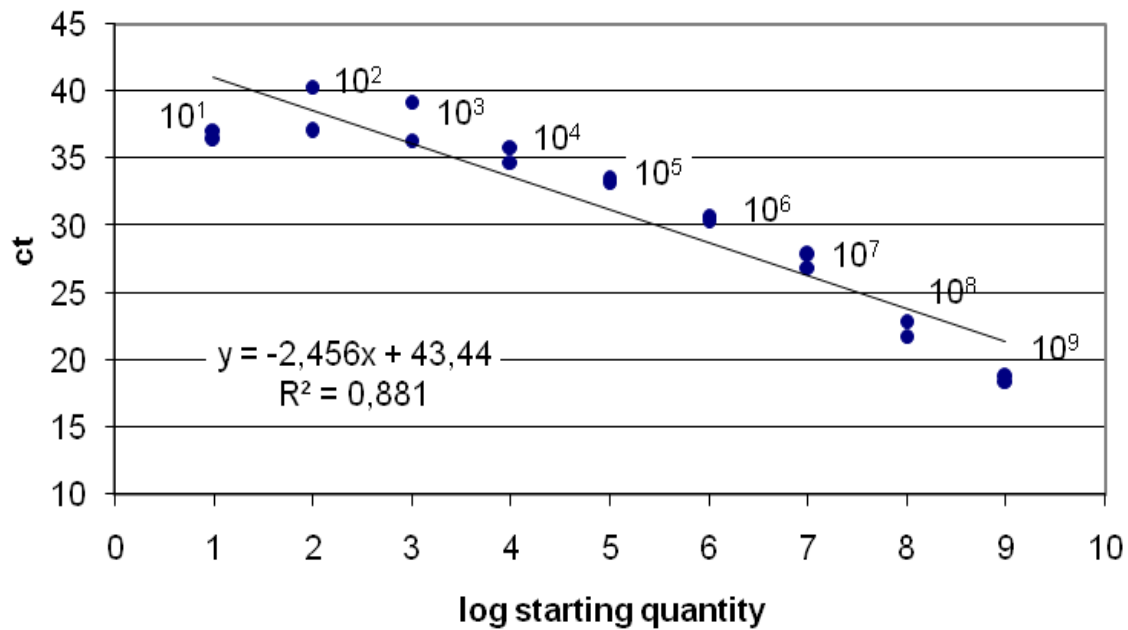


Abbildung 45: Lb 19, Standardgerade, E= 154,4 %, $R^2 = 0,881$

Wenn man nun die beiden höchsten Verdünnungen herausnimmt, erhält man bessere Regressionswerte und die Effizienz kann auch gesenkt werden, die mit 81,1 % dann unterhalb des Optimums zu liegen kommt.

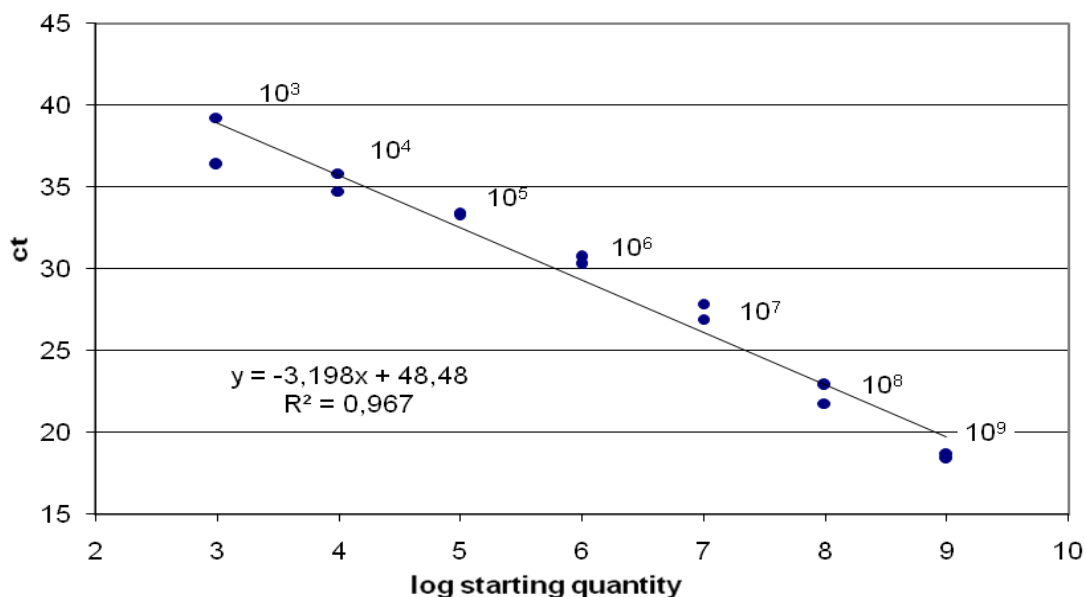


Abbildung 46: Lb 19, Standardgerade, E= 81,1 %, $R^2 = 0,967$

4.2.2.3.2 *Lactobacillus acidophilus* mit speziesspezifischem Primer

- Lb 19: 10^9 - 10^1
- Primer: Acilneu/ AciCrisJohll, 60 °C
- Methode: SYBR Green1

Tabelle 30: Lb 19, Temperaturprogramm, Acilneu/ AciCrisJohll,

Cycle 1	Cycle 2 (45 x)			Cycle 3 (1 x)		Cycle 4 (81 x)	Temp. Change	End. Temp
Step 1	Step 1	Step 2	Step 3	Step 1	Step 2			
95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	95 °C	60 °C	60 °C	0.5 °C	95 °C
3 min	15 sec.	40 sec.	20 sec.	20 sec.	30 sec.	10 sec.		
		PCR	Real Time			Melt Curve		

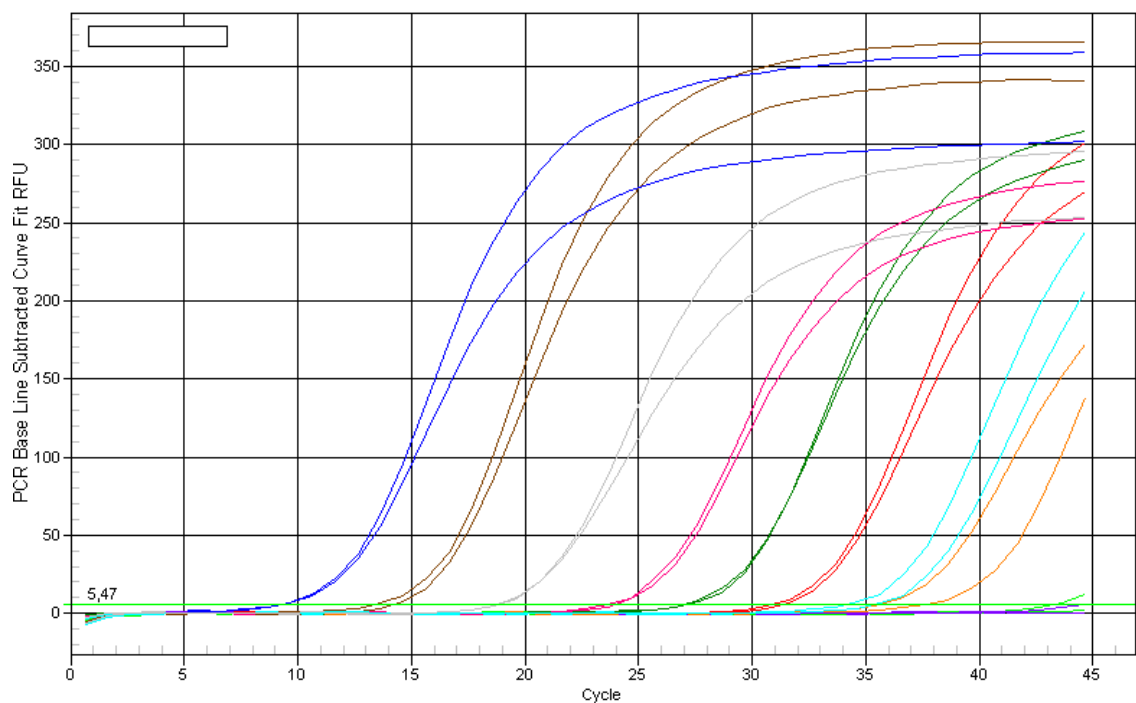


Abbildung 47: Lb 19, Amplifikationskurve, Acilneu/ AciCrisJohll, 60 °C

10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , NTC

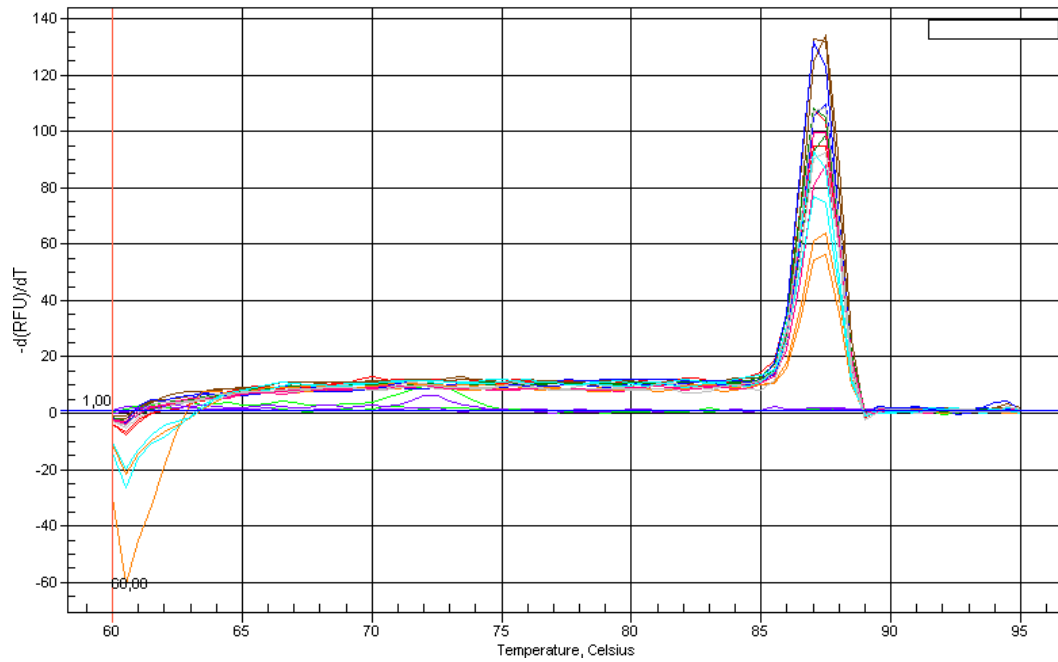


Abbildung 48: Lb 19, Schmelzkurve, Acilneu/ AciCrisJohll, 60 °C

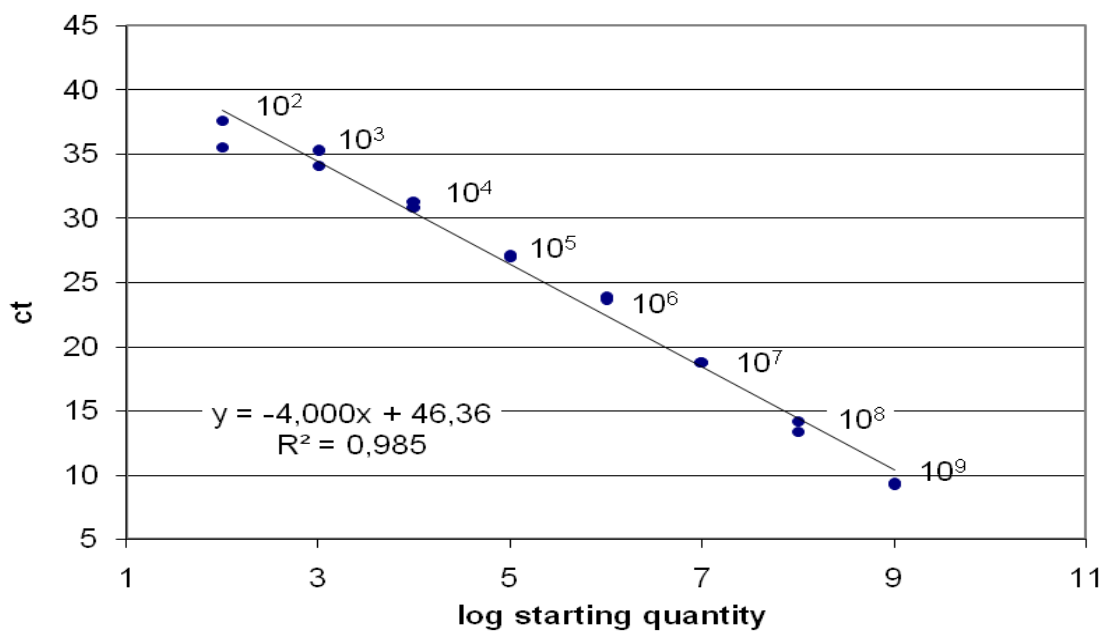


Abbildung 49: Lb19, Standardgerade, E=77,8 %, $R^2 = 0,985$

Tabelle 31: Lb 19, Threshold Cycle

Probennr.	C _T -Wert	KBE/ ml	log
1	N/A	0	NTC
1	43,27	0	NTC
2	N/A	10 ¹	1
2	N/A	10 ¹	1
3	37,60	10 ²	2
3	35,54	10 ²	2
4	35,23	10 ³	3
4	34,10	10 ³	3
5	30,85	10 ⁴	4
5	31,30	10 ⁴	4
6	26,96	10 ⁵	5
6	27,15	10 ⁵	5
7	23,59	10 ⁶	6
7	23,92	10 ⁶	6
8	18,77	10 ⁷	7
8	18,77	10 ⁷	7
9	13,35	10 ⁸	8
9	14,20	10 ⁸	8
10	9,27	10 ⁹	9
10	9,18	10 ⁹	9

Vergleicht man nun wieder die Ergebnisse der drei Methoden AGE, DGGE und Real-Time PCR, lässt sich auch hier erneut erkennen, dass die Real-Time PCR die sensibelste Methode ist und daher eine Identifizierung bis in höheren Verdünnungsstufen zulässt. Wird das Universalprimerpaar verwendet, kommt es zu einer erhöhten Effizienz von 154,4 %, in diesem Versuch, zu einer Regression von 0,881 und zur Geradensteigung von -2,456. Betrachtet man nun den Lauf mit dem speziesspezifischen Primerpaar erhält man eine Effizienz von 77,8 %, einer Regression von 0,985 und Geradensteigung -4. Der Nachweis ist bis zur Verdünnung 10³ KBE/ ml sehr gut verfolgbar, die Stufe 10² KBE/ ml liefert auch noch zwei Amplifikationskurven, die jedoch nicht mehr deckungsgleich liegen und im Intervall zu früh kommen.

4.2.3 Verdünnungsreihe *Streptococcus thermophilus* 10⁹-10¹

4.2.3.1 Universelle und speziesspezifische PCR

Das dritte bearbeitete Bakterium ist der *Streptococcus thermophilus*, von diesem auch die Verdünnung von Elisabeth Hochreiter verwendet wurde und eine eigene, wie oben beschrieben, hergestellt wurde. Mit diesen Verdünnungsreihen wurde wieder eine AGE mit dem Universalprimerpaar HDA1GC/ HDA2 durchgeführt und danach eine mit dem speziesspezifischen Primerpaar STherm1/ STherm 2 mit 54 °C. Im Anschluss daran wurde jeweils eine DGGE mit dem Universalprimerpaar HDA1GC/ HDA2 vorgenommen.

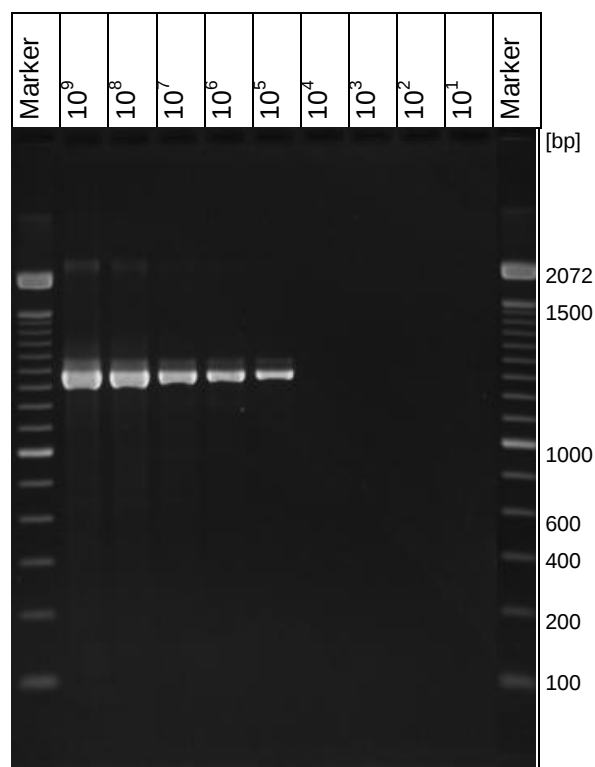


Abbildung 50: Sc 1, AGE mit STherm1/ STherm2, 54 °C, alte Verdünnung

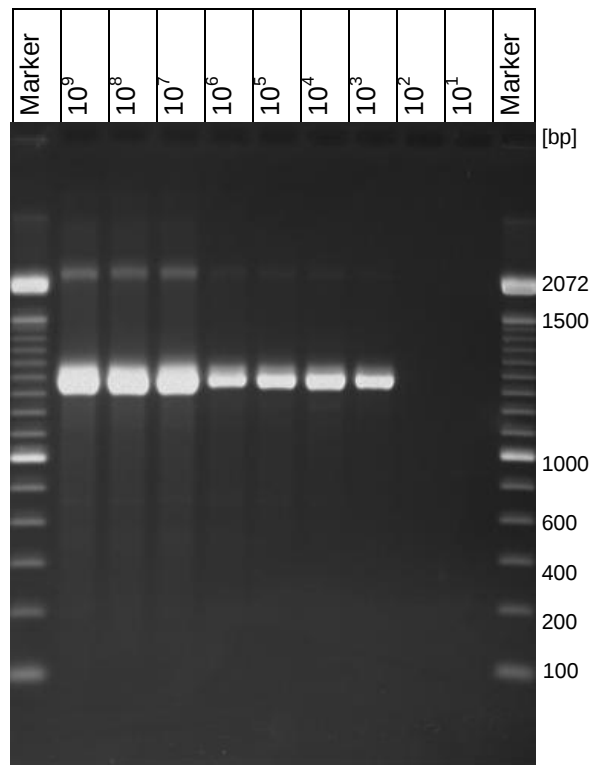


Abbildung 51: Sc 1, AGE mit STherm1/ STherm2, 54 °C, neue Verdünnung

4.2.3.2 Denaturierende Gradientengelelektrophorese

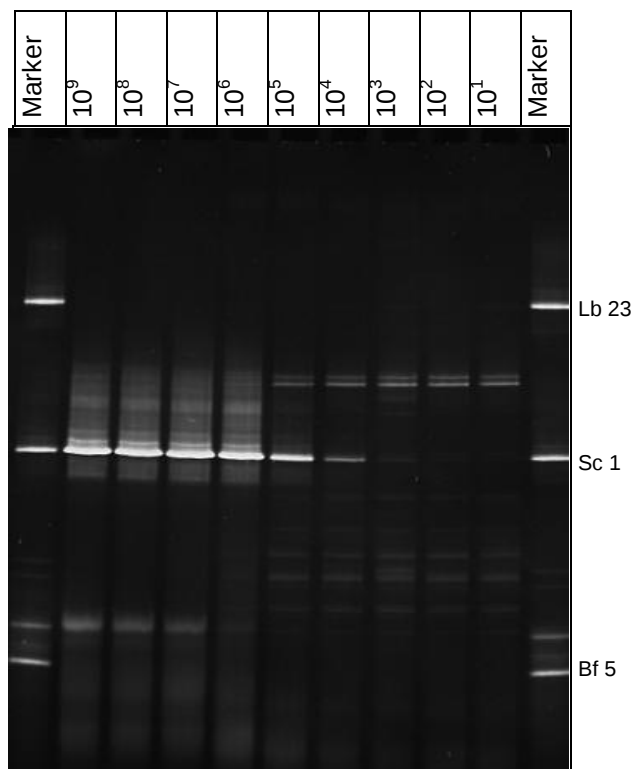


Abbildung 52: Sc 1, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, alte Verdünnung

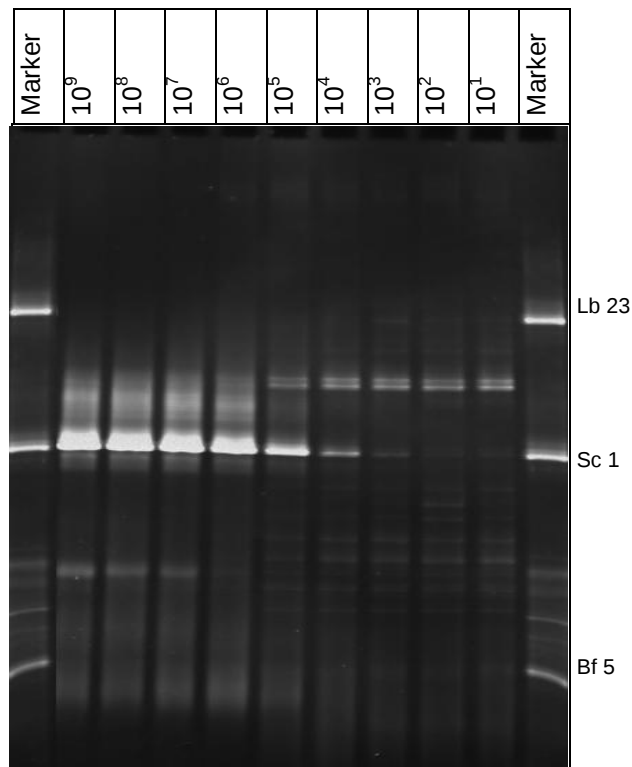


Abbildung 53: Sc 1, DGGE mit HDA1GC/ HDA2, 54 °C, neue Verdünnung

Wenn nun die Bilder miteinander verglichen werden, sieht man, dass die Nachweisgrenze für den *Streptococcus thermophilus* bei der neuen Verdünnung in einer höheren Verdünnungsstufe liegt. Die alte Verdünnung kann mit der Agarosegelelektrophorese bis 10^5 KBE/ ml und in der DGGE bis 10^4 KBE/ ml nachgewiesen werden. Die neue Verdünnung zeigt im AGE-Bild bis 10^3 KBE/ ml und im DGGE-Bild bis 10^4 bzw. 10^3 (sehr schwach) Banden, die in ihrer Dicke ausgeprägter auftreten.

4.2.3.3 Real-Time PCR

4.2.3.3.1 *Streptococcus thermophilus* mit Universalprimerpaar

- Sc 1: 10^9 - 10^1
- Primer: HDA1GC/ HDA2, 54 °C
- Methode: SYBR Green1
- Temperaturprogramm: siehe Tabelle 25

Tabelle 32: Sc 1, Threshold Cycle

Probennr.	C _T -Wert	KBE/ ml	log
1	28,02	0	NTC
1	29,16	0	NTC
2	28,13	10^1	1
2	28,17	10^1	1
3	29,02	10^2	2
3	29,21	10^2	2
4	28,74	10^3	3
4	28,56	10^3	3
5	27,88	10^4	4
5	28,22	10^4	4
6	25,75	10^5	5
6	25,79	10^5	5
7	22,35	10^6	6
7	22,61	10^6	6
8	18,77	10^7	7
8	18,60	10^7	7
9	14,68	10^8	8
9	14,87	10^8	8
10	10,84	10^9	9
10	10,95	10^9	9

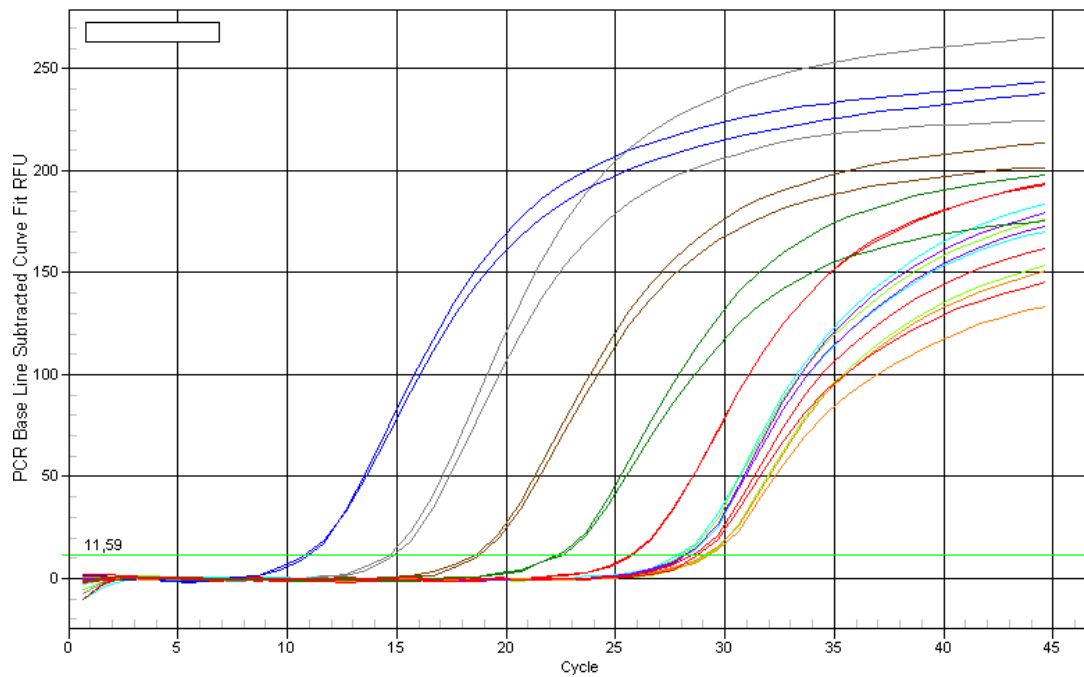


Abbildung 54: Sc 1, Amplifikationskurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , NTC

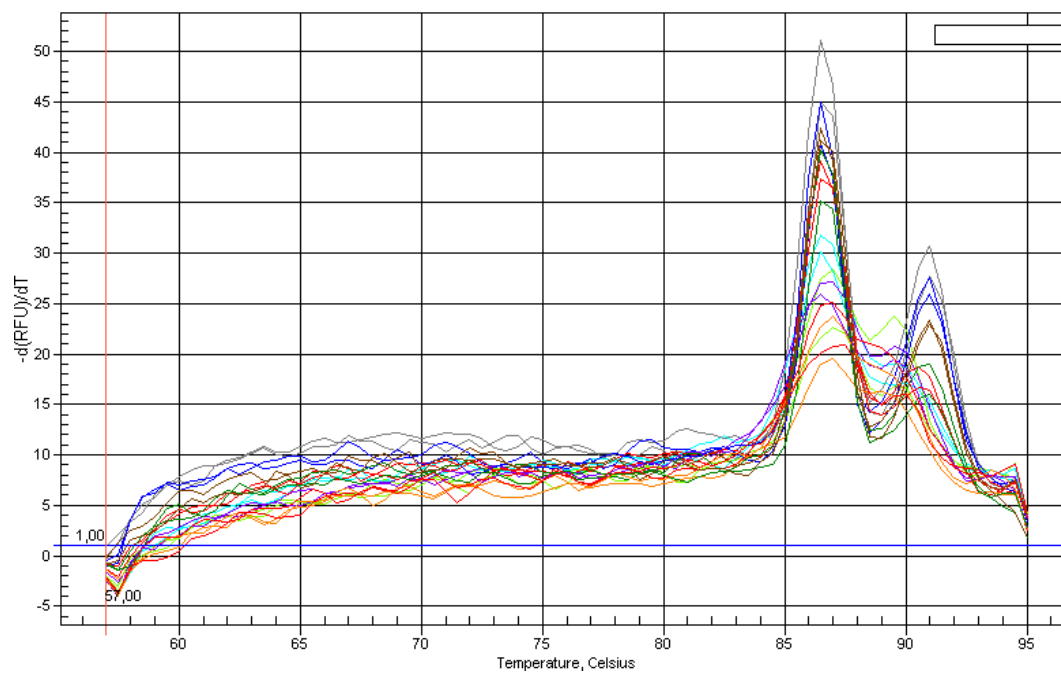


Abbildung 55: Sc 1, Schmelzkurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

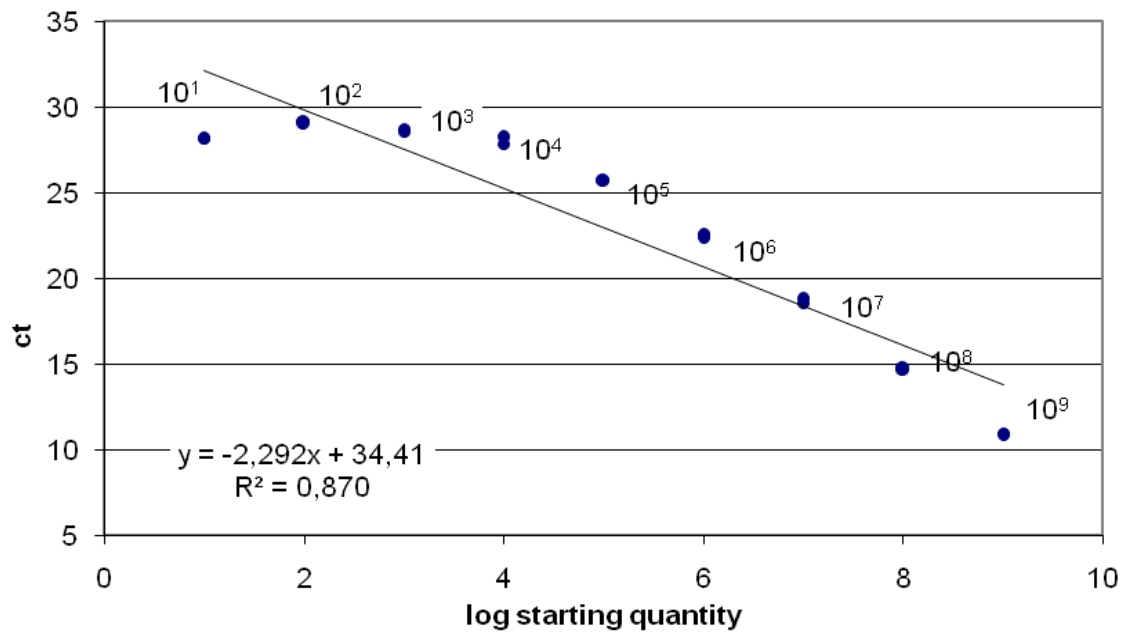


Abbildung 56: Sc 1, Standardgerade, E=173,0 %, $R^2=0,870$

Die Effizienz und die Regression können verbessert werden, indem die höchsten drei Verdünnungen entfernt werden (siehe Anhang).

4.2.3.3.2 *Streptococcus thermophilus* mit speziesspezifischem Primer

- Sc 1: 10⁹-10¹
- Primer: STherm1/ STherm2, 57 °C
- Methode: SYBR Green1

Tabelle 33: Sc 1, Temperaturprogramm, STherm1/ STherm2

Cycle 1	Cycle 2 (45 x)			Cycle 3 (1 x)		Cycle 4 (81 x)	Temp. Change	End. Temp
Step 1	Step 1	Step 2	Step 3	Step 1	Step 2			
95 °C	95 °C	57 °C	72 °C	95 °C	57 °C	57 °C	0.5 °C	95 °C
3 min	15 sec.	40 sec.	20 sec.	20 sec.	30 sec.	10 sec.		
		PCR	Real Time			Melt Curve		

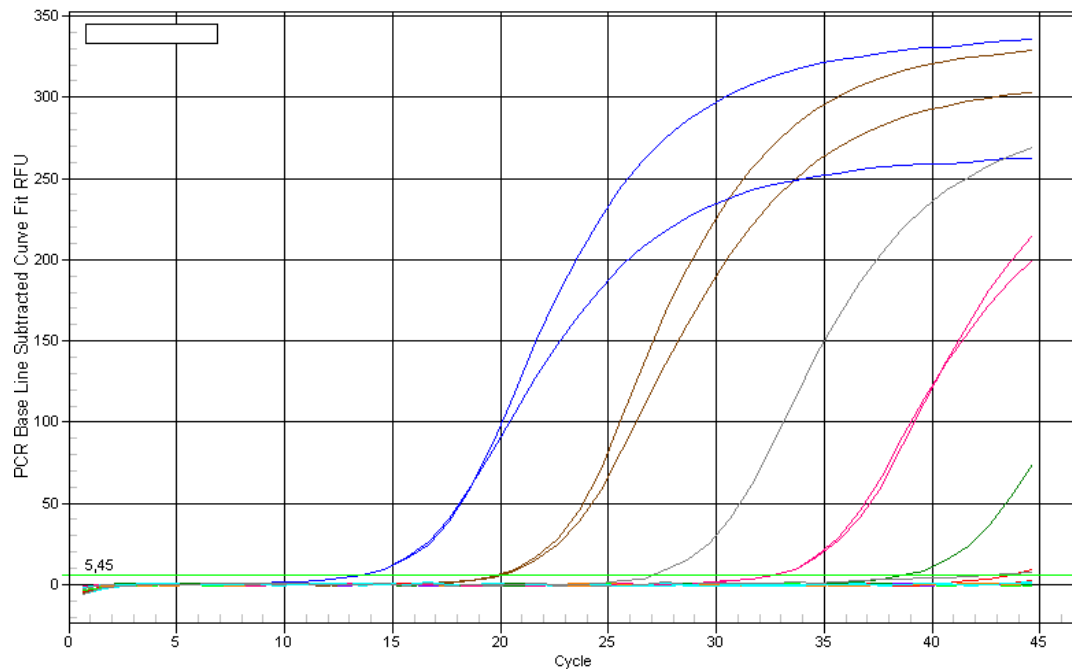


Abbildung 57: Sc 1, Amplifikationskurve, STherm1/ STherm2, 57 °C

10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , NTC

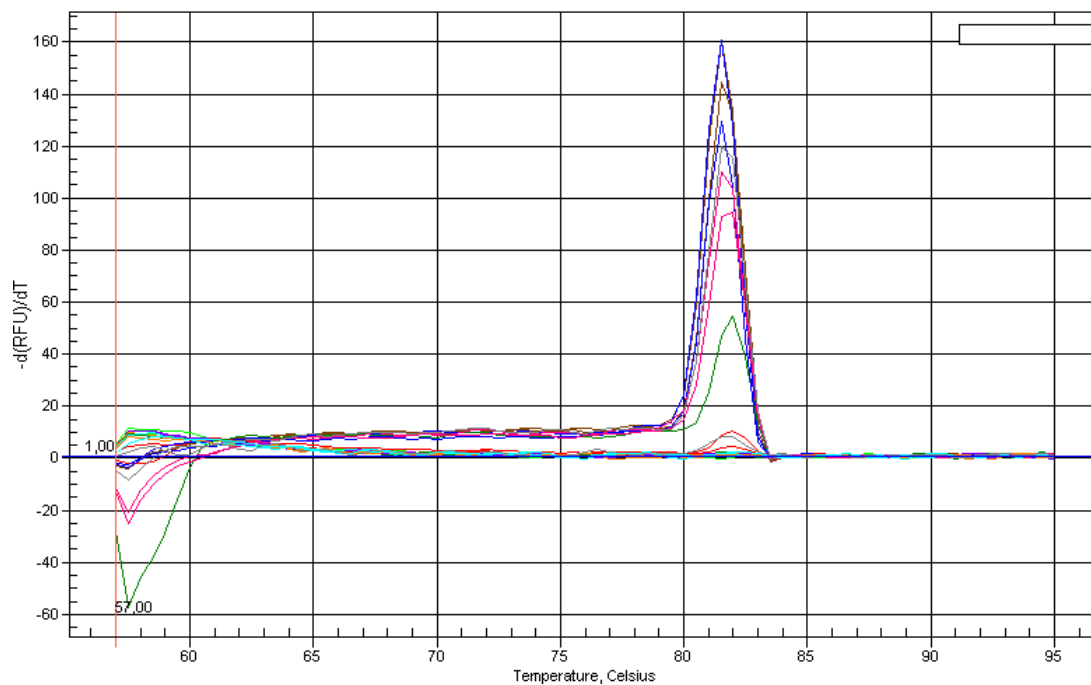
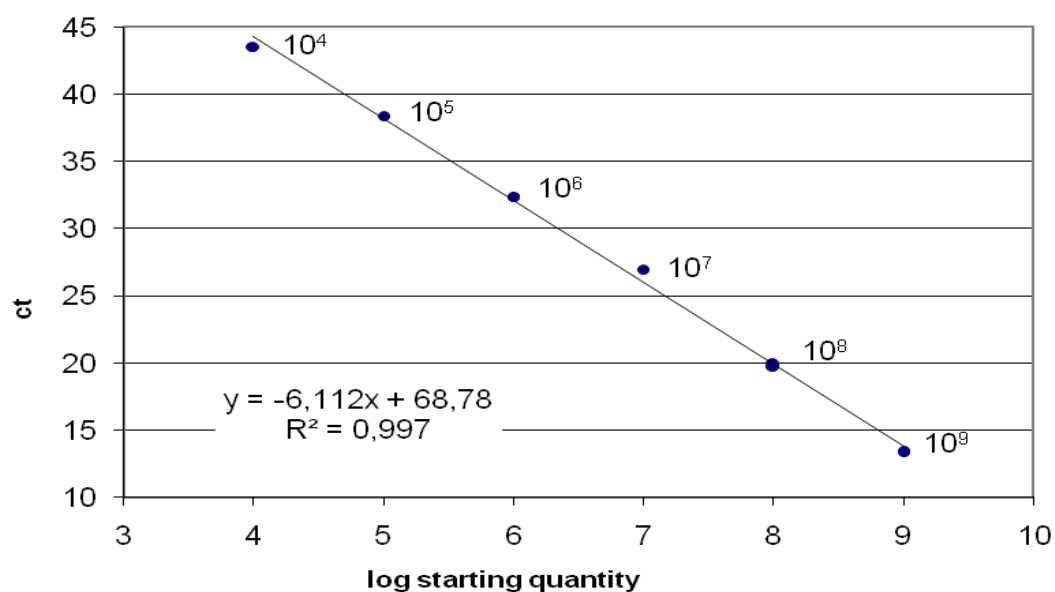


Abbildung 58: Sc 1, Schmelzkurve, STherm1/ STherm2, 57 °C

Tabelle 34: Sc 1, Threshold Cycle

Probennr.	C _T -Wert	KBE/ ml	log
1	N/A	0	NTC
1	N/A	0	NTC
2	N/A	10 ¹	1
2	N/A	10 ¹	1
3	N/A	10 ²	2
3	N/A	10 ²	2
4	43,52	10 ³	3
4	43,52	10 ³	3
5	N/A	10 ⁴	4
5	38,41	10 ⁴	4
6	32,36	10 ⁵	5
6	32,36	10 ⁵	5
7	26,99	10 ⁶	6
7	N/A	10 ⁶	6
8	32,36	10 ⁷	7
8	26,99	10 ⁷	7
9	19,75	10 ⁸	8
9	19,88	10 ⁸	8
10	13,45	10 ⁹	9
10	13,38	10 ⁹	9

Abbildung 59: Sc 1, Standardgerade, E=46,3 %, R²=0,997

Vergleicht man nun die erhaltenen Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese, denaturierenden Gradientengelelektrophorese und Real-Time PCR miteinander, erhält man zusammenfassend eine Nachweisgrenze für dieses Bakterium bei 10^4 KBE/ ml.

Die Real-Time PCR zeigt schöne Werte mit dem Universalprimerpaar HDA1GC/ HDA2, vor allem wenn die höchsten drei Verdünnungen aus der Berechnung genommen werden und die Standardgerade erstellt wird. Hier bekommt man eine Regression von 0,993 und eine Effizienz von 93,9 %, wobei beide Werte im Optimum liegen.

Wird die Real-Time PCR mit dem speziespezifischen Primerpaar STherm1/ STherm2 durchgeführt, erhält man die Nachweisgrenze bei 10^5 KBE/ ml mit einer Regression von 0,997 und einer Effizienz von 46,3 %, die eindeutig zu niedrig ist. Die Annealingtemperatur wurde mit 57 °C möglicherweise noch nicht optimal gewählt.

Untersuchung von 8 probiotischen Joghurts

4.2.4 Vorstellung der Produkte

Die acht Joghurtproben wurden in verschiedenen Supermärkten innerhalb einer Woche gekauft (25.09.2008-2.10.2008), wobei 2 von ihnen, „Carrefour Sanus“ und „Biac Probiotischer Fitnesss-Drink“, nicht in Österreich verkauft werden, und deshalb direkt bei der Herstellerfirma (Nöm) besorgt wurden. Von den Proben sind alle acht probiotisch, drei von ihnen sind Drinks, eine ist lactosefrei und eine ist mit Fruchtstücken in der Masse. Probe und Verpackungsangabe:

1. **Biac**: Probiotischer Fitness-Drink mit L-Carnitin und Vitaminen; Bifidobakterium BB-12, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 und *L. casei* werden auf der Verpackung angegeben. Direkt von Nöm bezogen; (MHD: 03.11.2008)
2. **Carrefour Sanus Yoghurt Drink**: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* y otros fermentos lacticos BB-12. Dieser Joghurt drink als gute Vitamin C-Quelle beworben. [BUSINESS INSIGHTS., 2009]; Direkt von Nöm bezogen, wird in Spanien und Griechenland verkauft. (MHD: 30.10.2008)
3. **Voll Fit Pur 0,1 %**: probiotischer Drink mit L-carnitin, Vitamin B6, C und E; *L. casei*; Magerjoghurt aus past. Milch mit probiotischen Kulturen LA-5 *Lactobacillus acidophilus*, BB-12 *Bifidobacterium*. (MHD: 26.10.2008)
4. **Milfina Heidelbeere**: *Bifidobacterium* BB-12. (MHD: 23.10.2008)
5. **Milfina Lactiv Joghurt**: natur; Bifiduskulturen BB-12. (MHD: 03.11.2008)
6. **Minus L**: lactosefreier, probiotischer Joghurt mild, 3,5 % Fett im Milchanteil; Vanille; Omira Milch, Deutschland (MHD: 28.10.2008)
7. **Nöm Fasten**: Kaffee Joghurt, 0,1 % Fett (MHD: 22.10.2008)
8. **Spar, Natur pur**, probiotischer Bio-Naturjoghurt; 1 % Fett (MHD: 24.10.2008)

4.2.5 Vorgehensweise der Untersuchung

Es wurde von den 8 Joghurtproben jeweils 150 mg [„x 150“] in ein Reagenzgefäß eingewogen und jeweils 500 µl [„x G“] gefriergetrocknet und danach die DNA daraus isoliert. Nach der Isolierung erfolgte die Polymerasekettenreaktion mit 35 Zyklen, mit Universal-, Genus-, Spezies- und Subspeziesspezifischen Primerpaaren, um die Joghurtproben näher auf die einzelnen Gattungen *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Bifidobacterium* zu untersuchen. Die beiden unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden wurden jeweils mit der Agarosegelelektrophorese und der denaturierenden Gradientengelelektrophorese in Vergleich gestellt, um genauere Aufschlüsse über das Vorhandensein einzelner Bakterien in den Proben ziehen zu können.

4.2.5.1 Agarosegelelektrophorese

Die ersten Spezies- und Subspeziesspezifischen Tests nahmen Bezug auf *Bifidobakterien*. Es wurde eine PCR-Agarosegelelektrophorese mit folgenden Primerpaaren durchgeführt:

- PbiF1/ PbiR2: 54 °C (Abbildung 60)
- LWA/ LWB: 55 °C (Abbildung 61)
- BiLON-1/ BiLON-2: 55 °C (Abbildung 62)
- LonU7/ LonU8: 67 °C (Abbildung 103, im Anhang)
- BreU3/ BeL4: 67 °C (Abbildung 104, im Anhang)
- BiINF-1/ BiINF-2: 66 °C (Abbildung 63)
- BiBIF-1/BiBIF-2: 60 °C (Abbildung 64)
- BiADO-1/ BiADO-2: 60 °C (Abbildung 65)

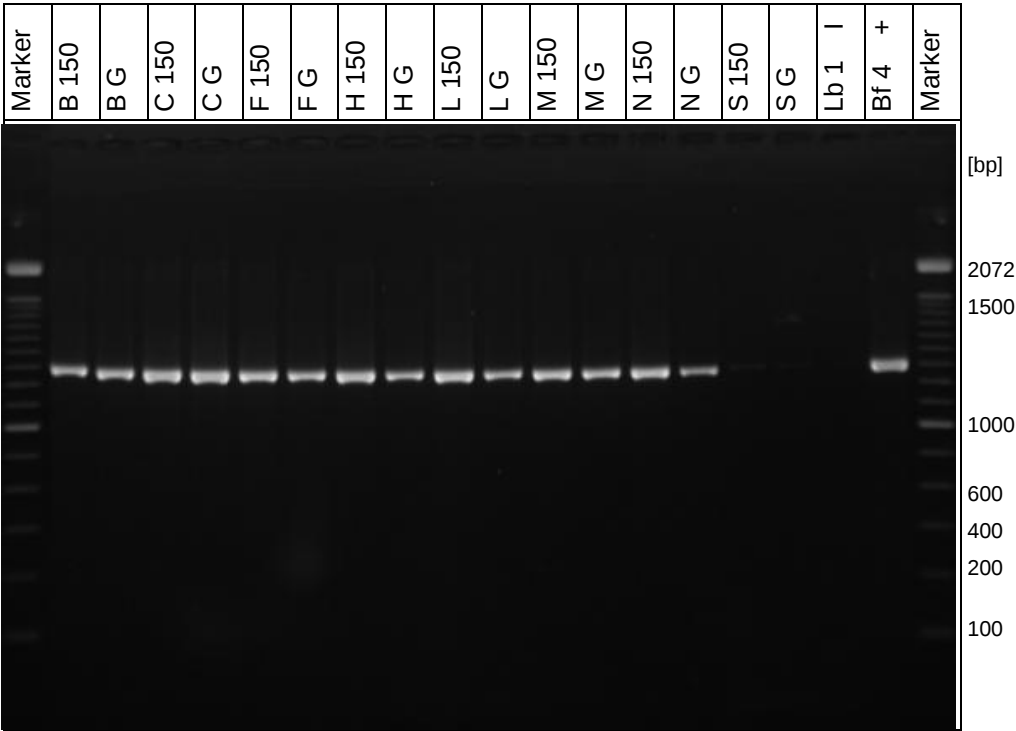


Abbildung 60: AGE, PbiF1/ PbiR2, 54 °C, Bifidobakterien

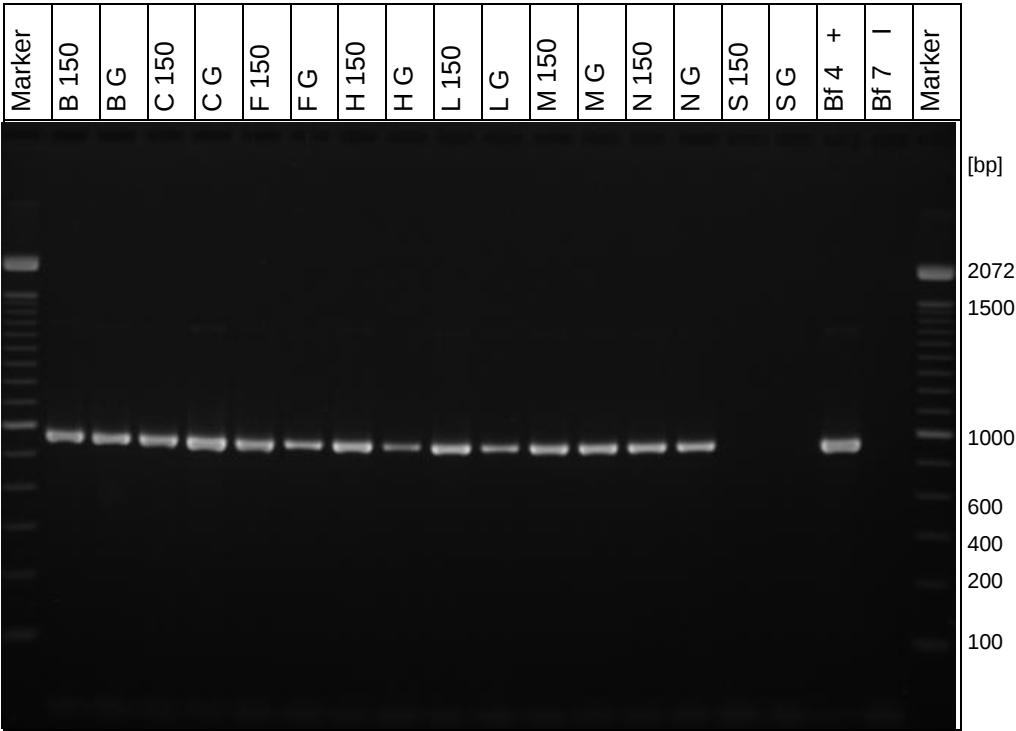


Abbildung 61: AGE, LWA/ LWB, 55 °C, *Bf. animalis* ssp. *lactis*

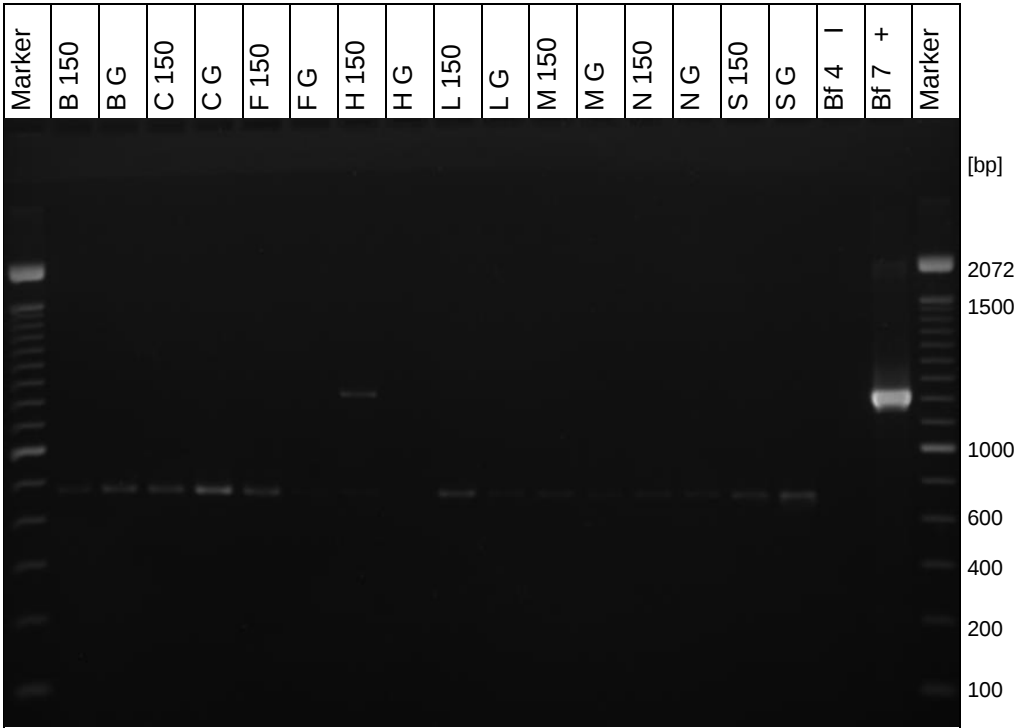


Abbildung 62: AGE, BiLON-1/ BiLON-2, 55 °C, *Bf. longum*

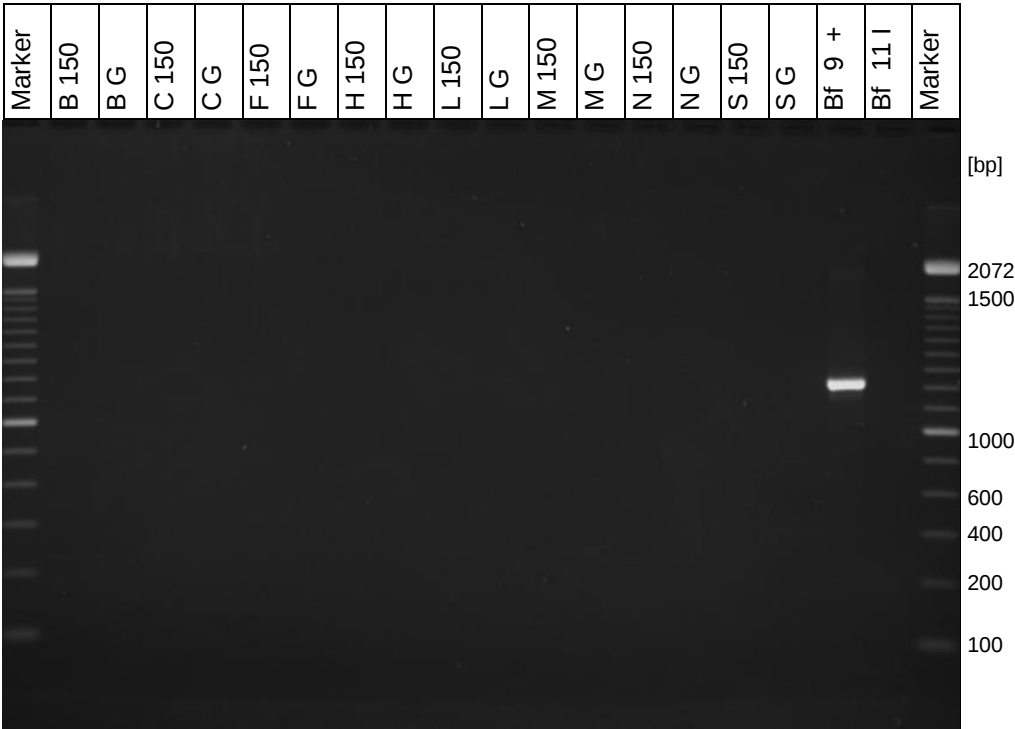


Abbildung 63: AGE, BiInf-1/ BiInf-2, 66 °C, *Bf. infantis*

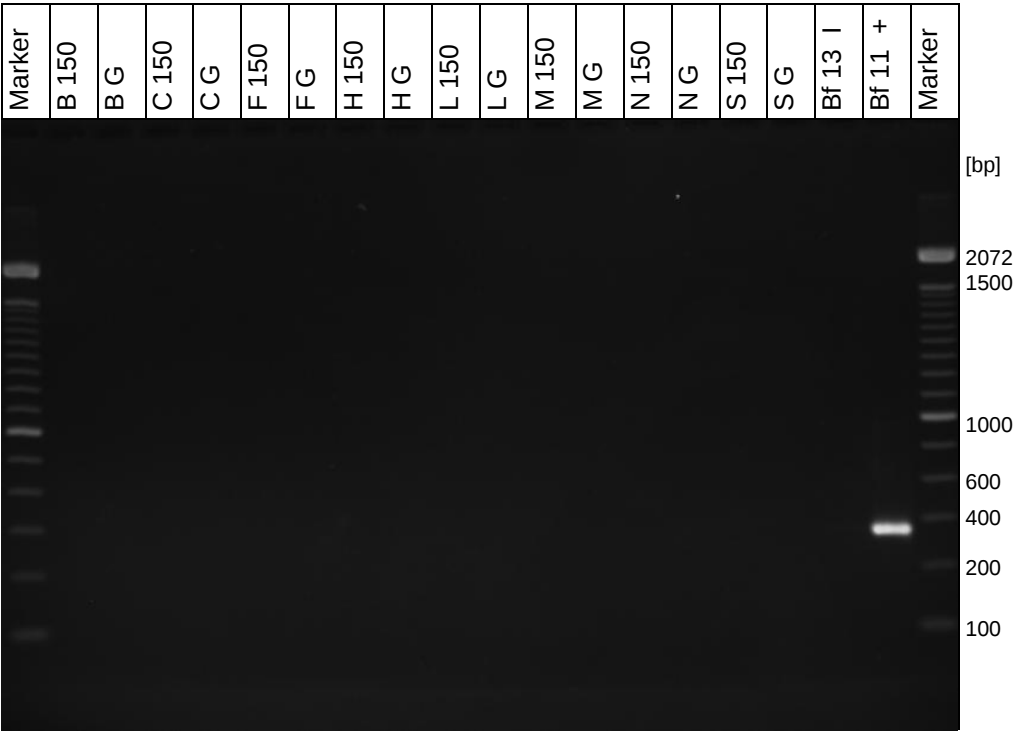


Abbildung 64: AGE, BiBIF-1/ BiBIF-2, 60 °C, *Bf. bifidum*

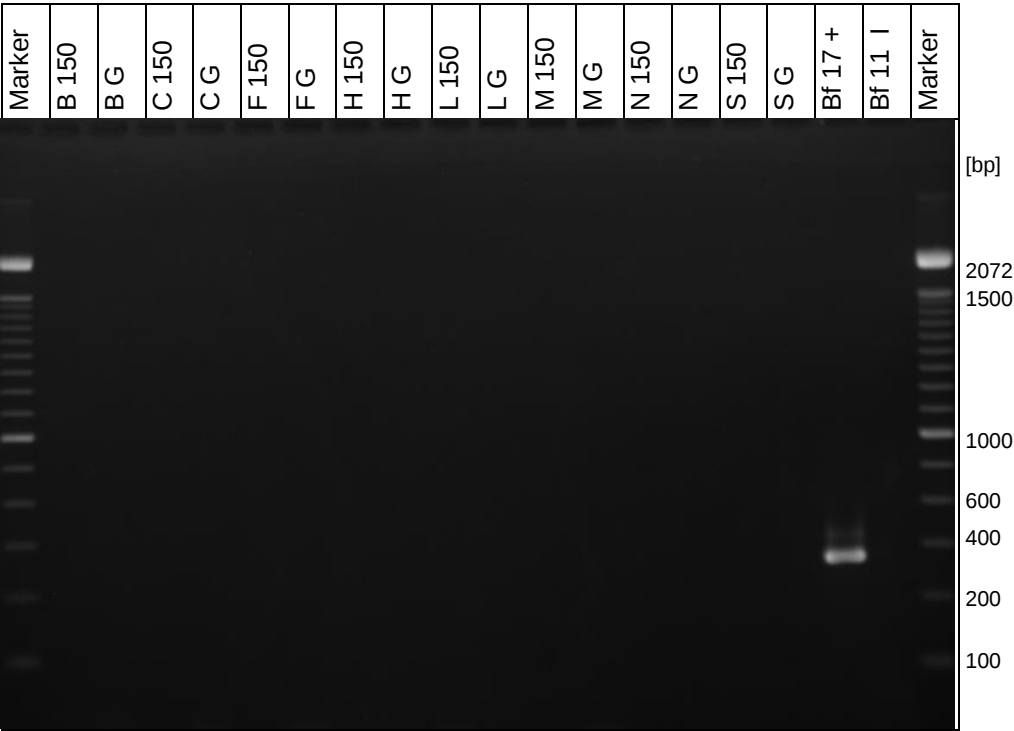


Abbildung 65: AGE, BiADO-1/ BiADO-2, 60 °C, *Bf. adolescentis*

Nun folgen die PCR-Agarosegelelektrophoresen auf *Lactobacillen* mit den Primerpaaren:

- Para/ Y2: 56 °C (Abbildung 66)
- Rham/ Y2: 55 °C (Abbildung 67)
- Aci-I-Neu/ Aci-Cris-JohII: 62 °C (Abbildung 68)
- Del20A/ Del23B: 60 °C (Abbildung 69)
- Bulg34/2/ Bulg37/1: 67 °C (Abbildung 70)
- Lact33/ Lact37A: 50 °C (Abbildung 105, im Anhang)
- Lreu-1/ Lreu-4: 58 °C (Abbildung 71)
- Joh-I/ Aci-Cris-JohII: 60 °C (Abbildung 72)

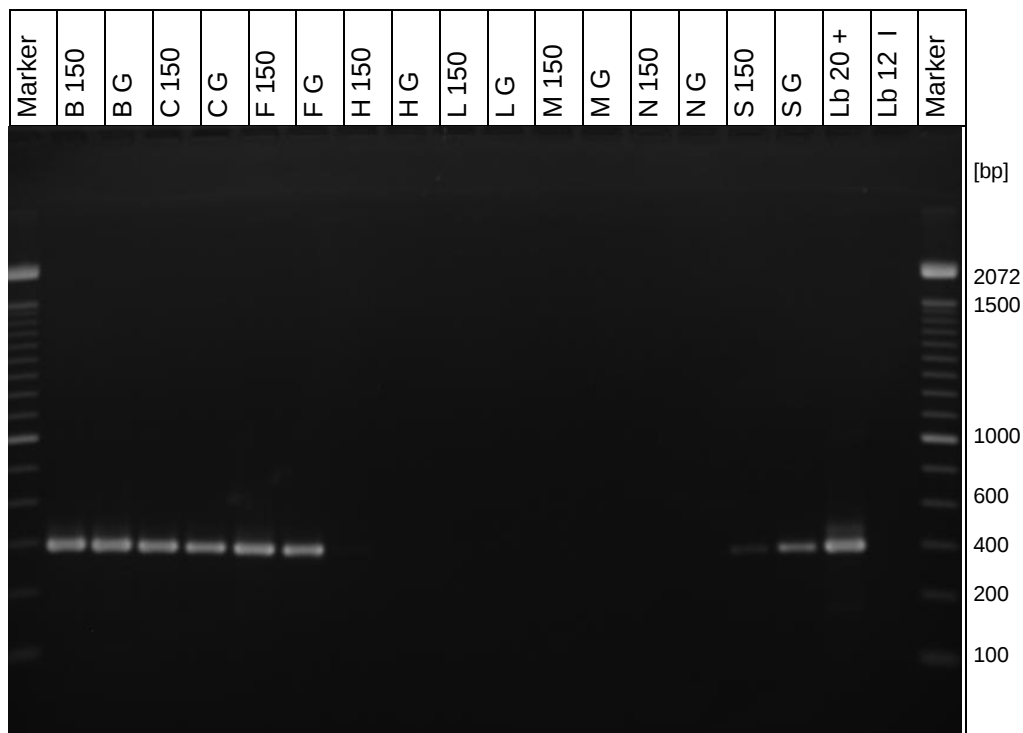


Abbildung 66: AGE, Para/ Y2, 56 °C, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*

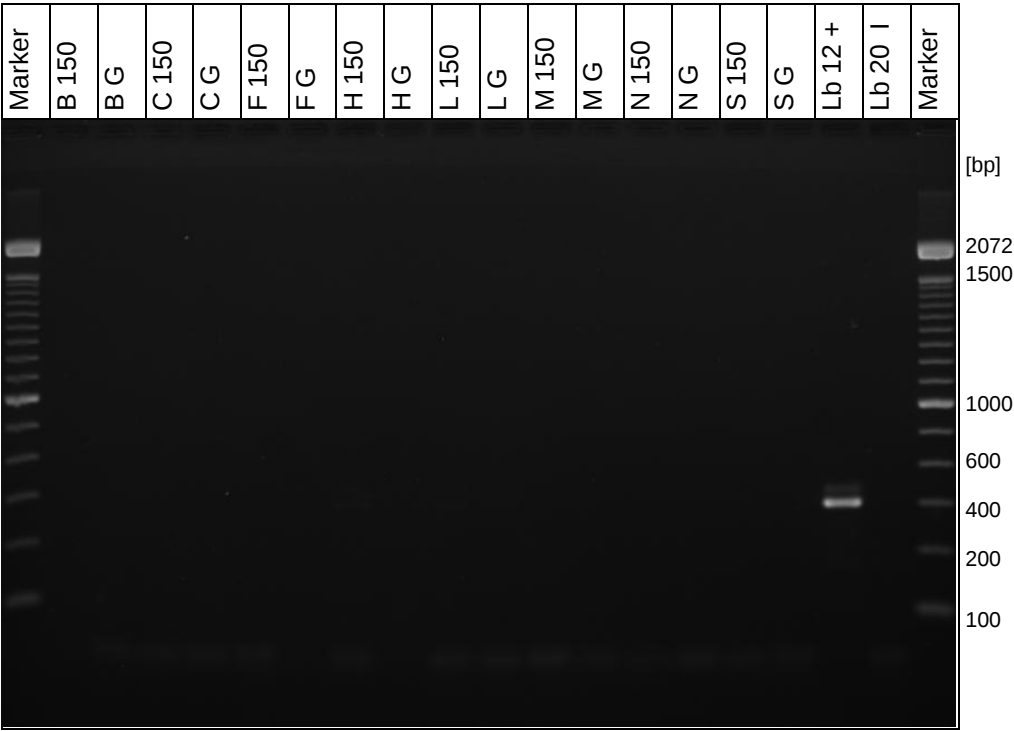


Abbildung 67: AGE, Rham/ Y2, 55 °C, *Lb. rhamnosus*

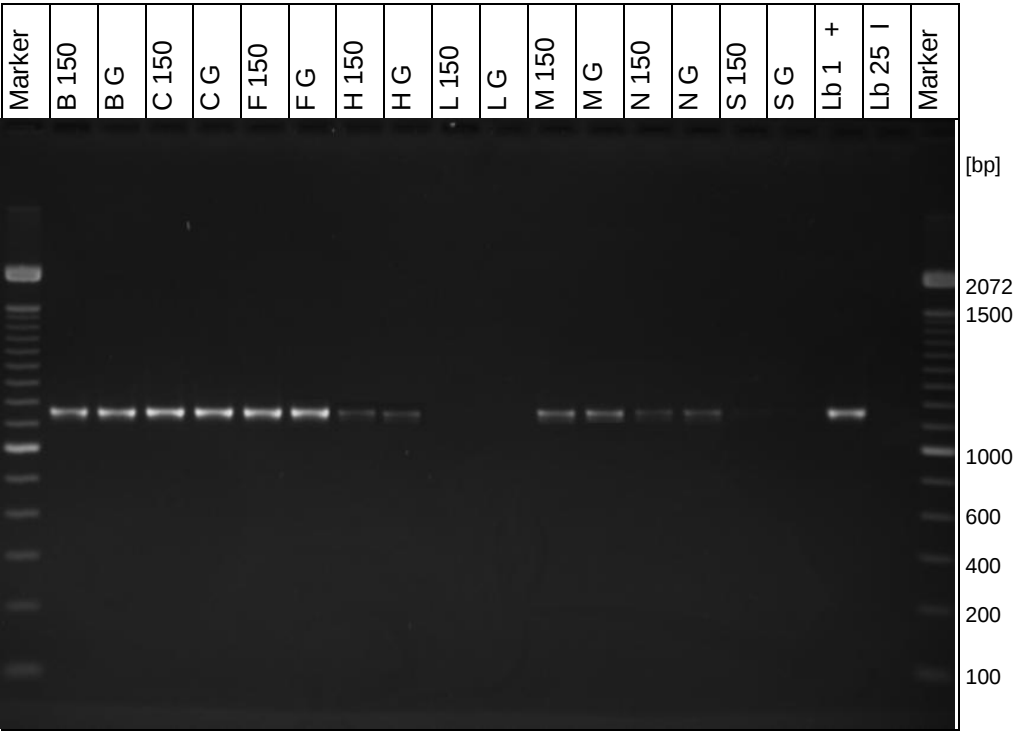
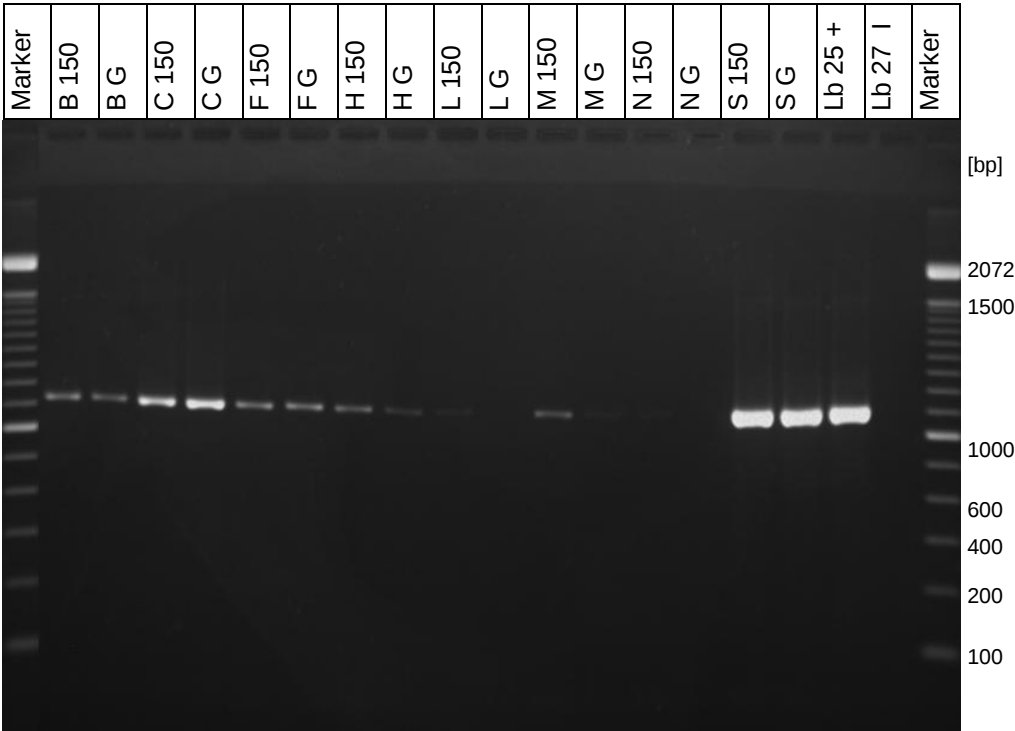
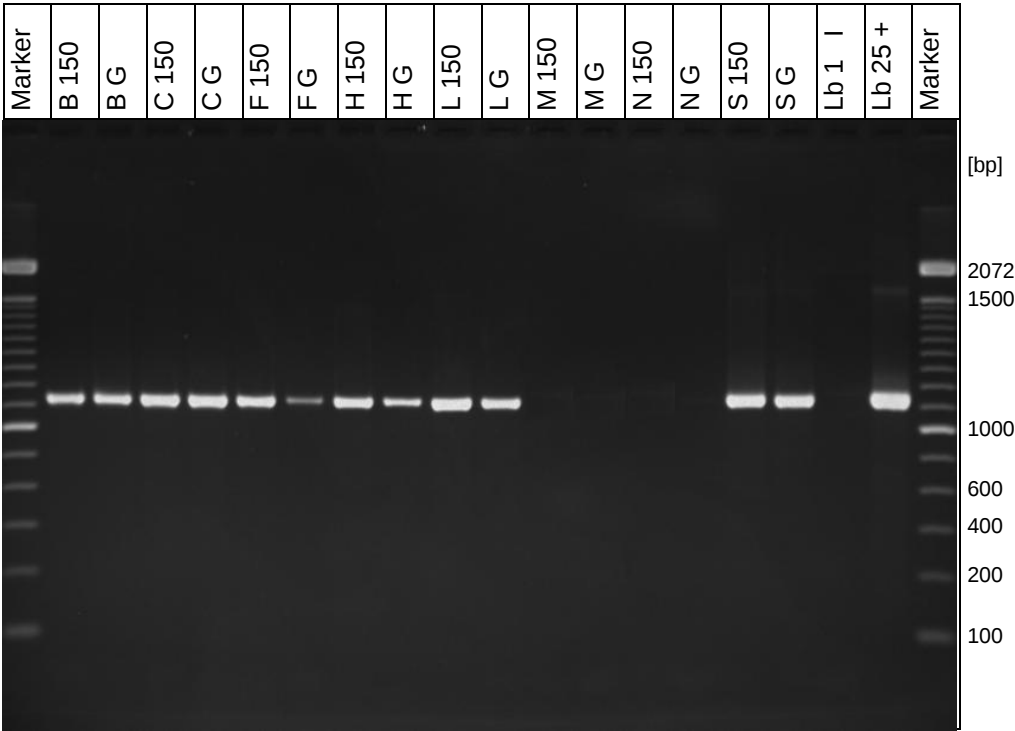


Abbildung 68: AGE, AcilNeu/ AciCrisJohII, 62 °C, *Lb. acidophilus*



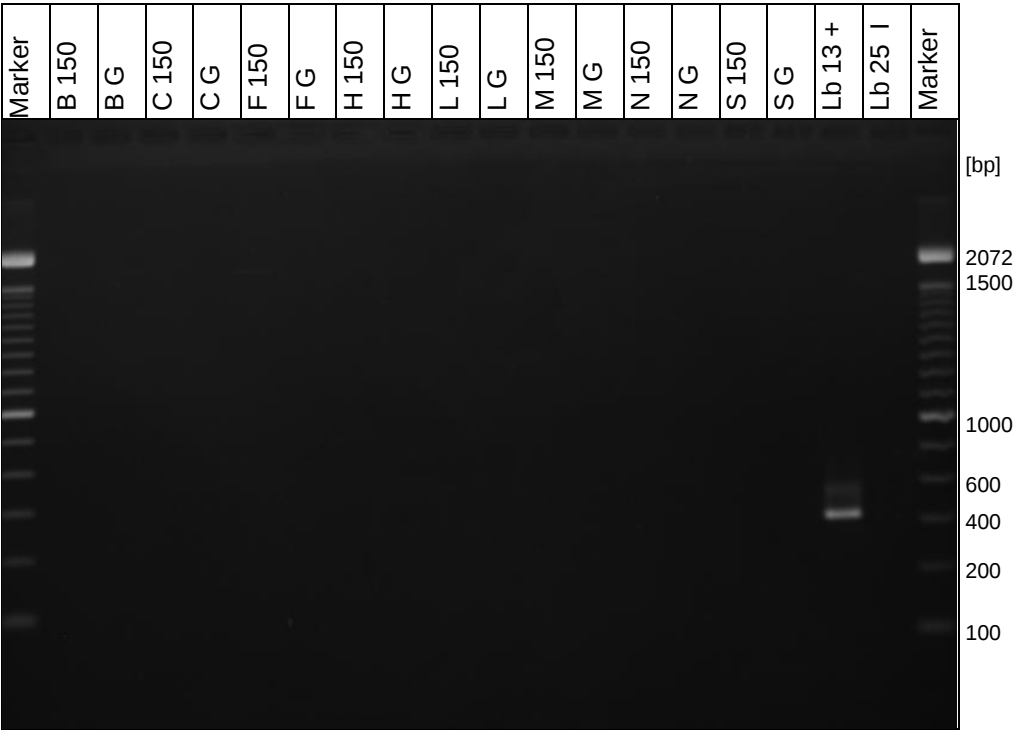


Abbildung 71: AGE, Lreu1/ Lreu4, 58 °C, *Lb. reuteri*

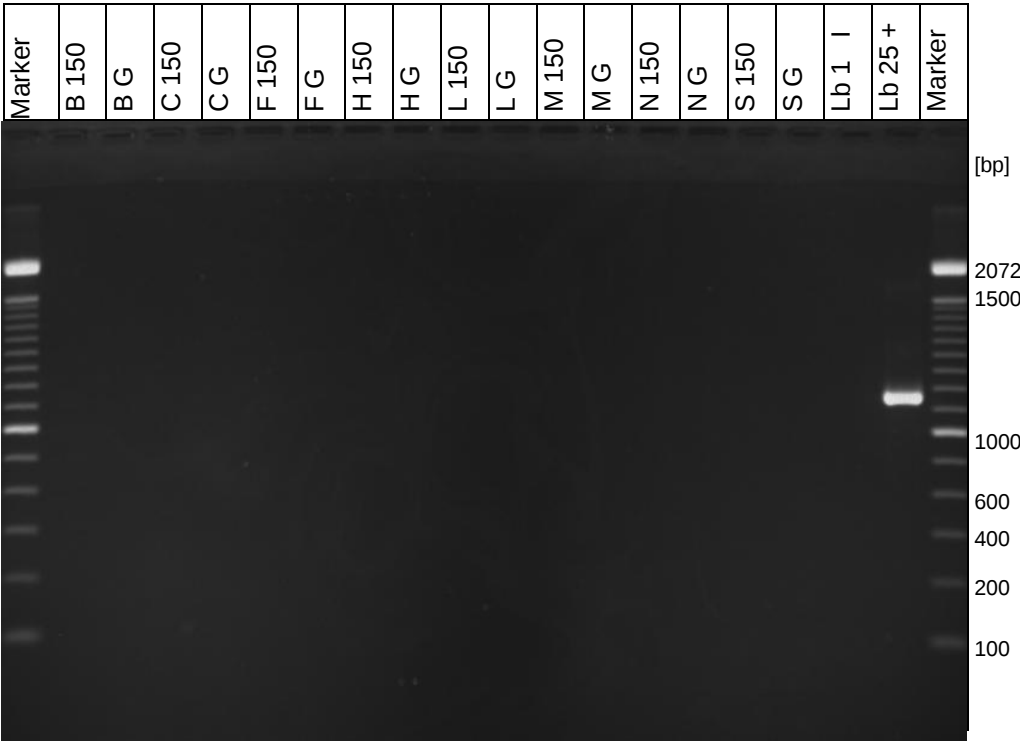


Abbildung 72: AGE, JohI/ AciCrisJohII, 60 °C, *Lb. johnsonii*

Die folgenden AGE-Bilder zeigen die Tests auf *Lactococcen* mit den Primerpaaren:

- gadB21FLc/ GAD7r_Lc: 50 °C (Abbildung 73)
- LLhis3F/ LLhis4R: 45 °C (Abbildung 74)
- Lhis5F/ Lhis6R: 46 °C (Abbildung 75)
- Lchis1F/ Lchis2R: 44 °C (Abbildung 76)

und auf den *Streptococcus thermophilus* mit dem Primerpaar:

- STherm1/ STherm2: 54 °C (Abbildung 77)

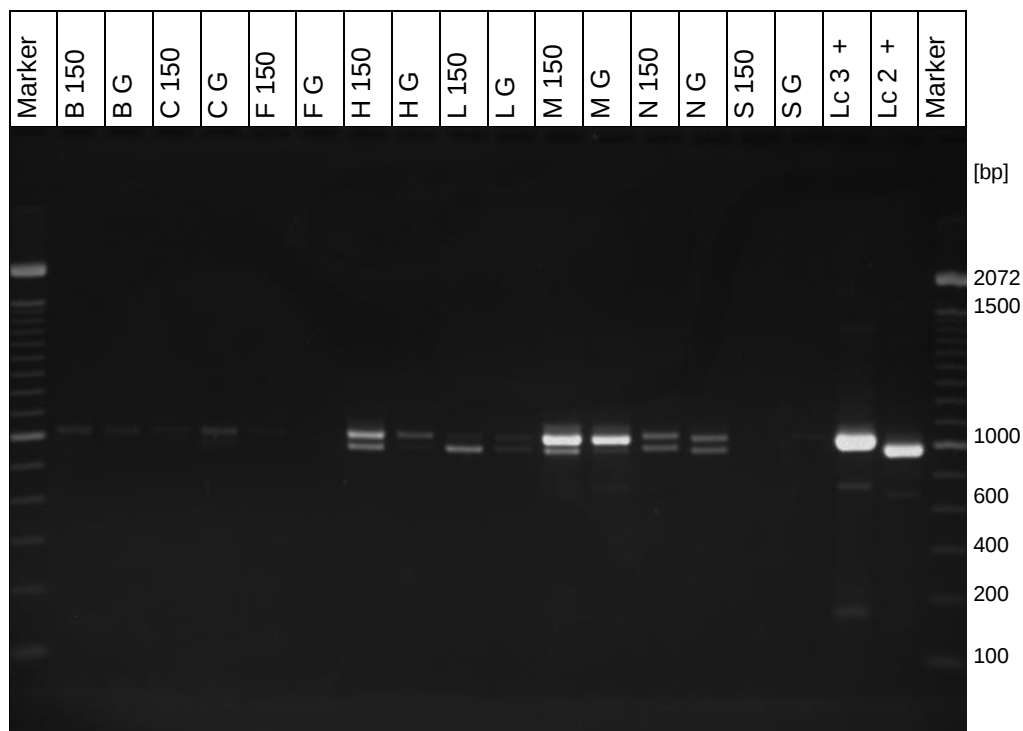


Abbildung 73: AGE, gadB21F_Lc/ GAD7r_Lc, 50 °C, Lc 1/3 und Lc 2

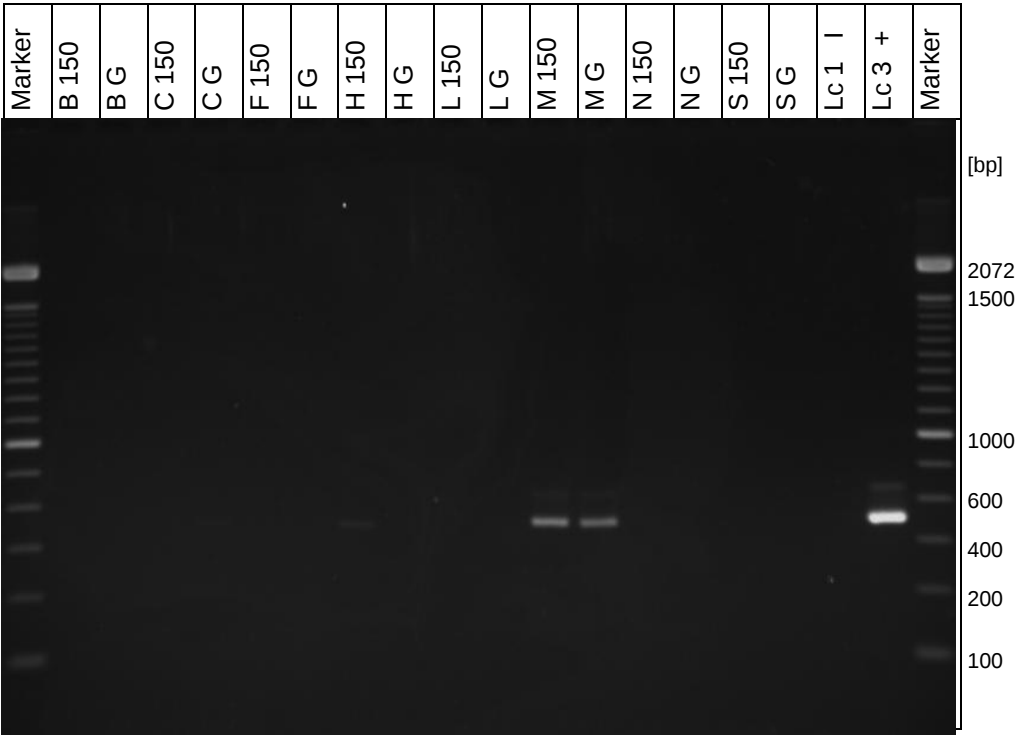


Abbildung 74: AGE, LLhis3F/ LLhis4R, 45 °C, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

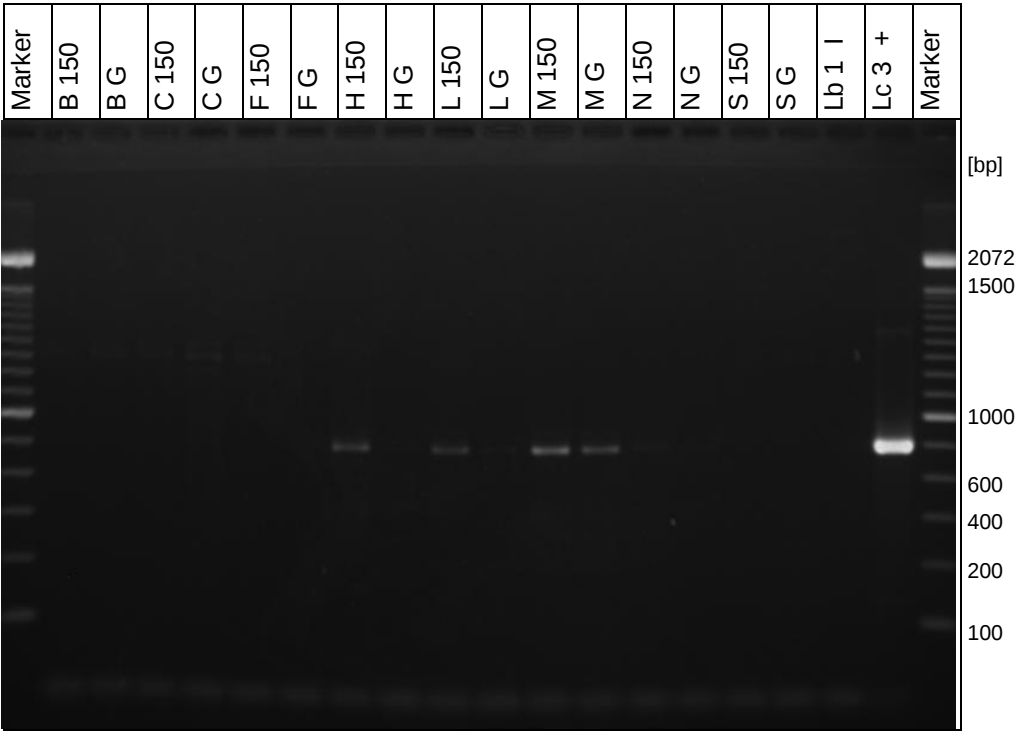


Abbildung 75: AGE, Lhis5F/ Lhis6R, 46 °C, Lc 1 und Lc 3

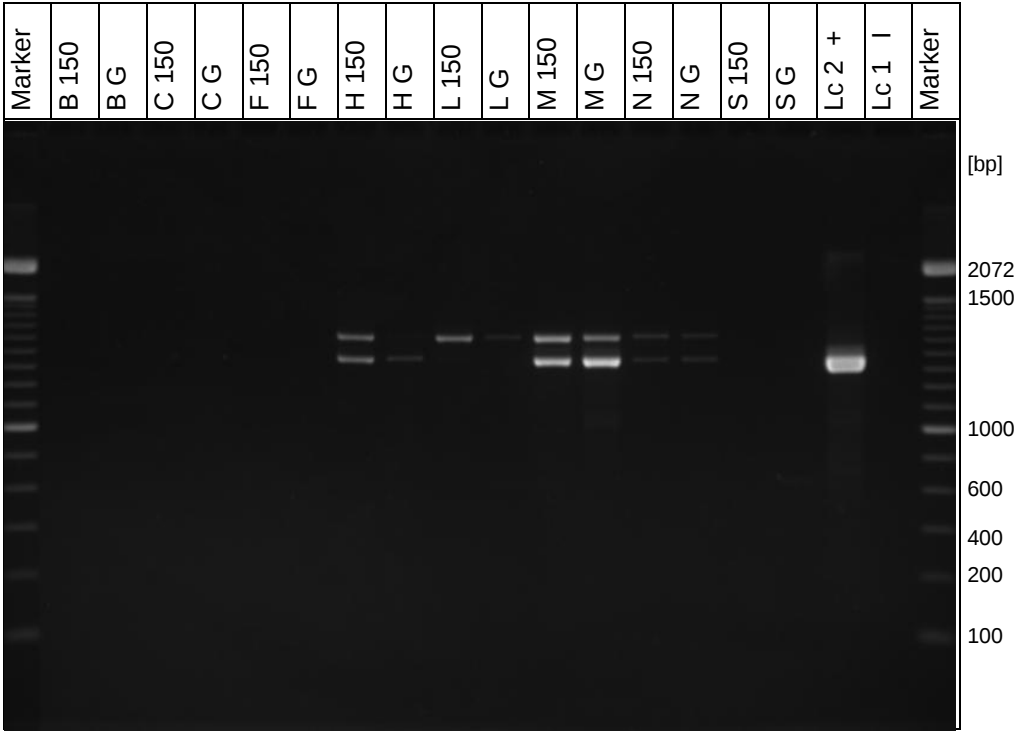


Abbildung 76: AGE, Lchis1F/ Lchis2R, 44 °C, *Lactococcus lactis ssp cremoris*

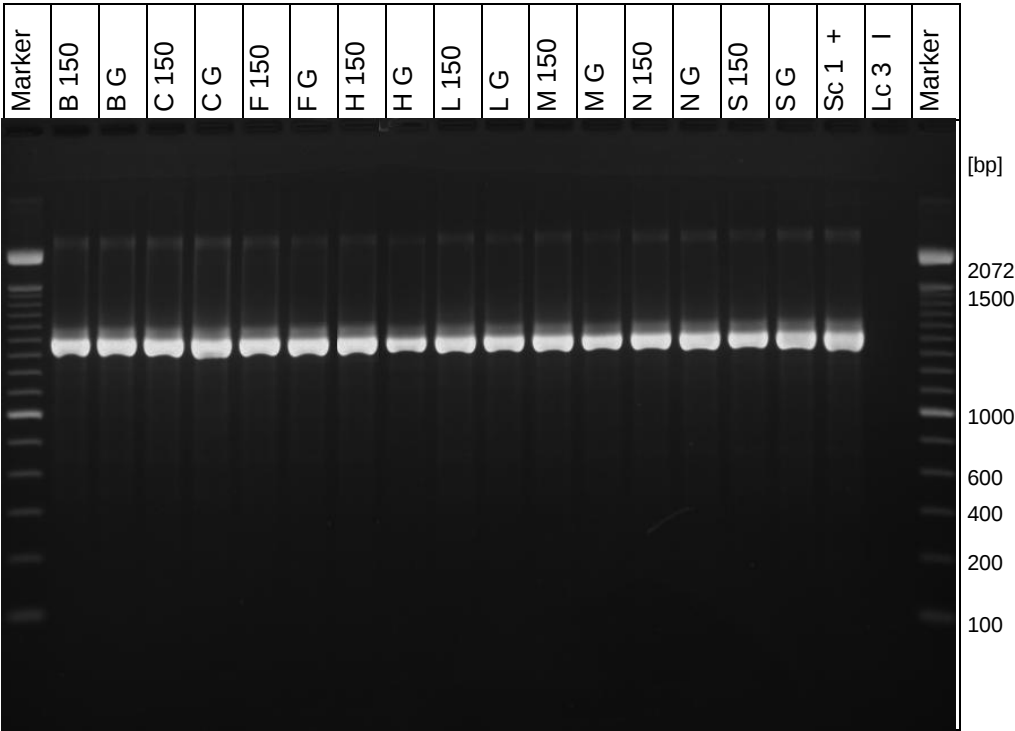


Abbildung 77: AGE, STherm1/ STherm2, 54 °C, *Streptococcus thermophilus*

Die Auswertung der AGE-Bilder findet man in der Tabelle 35, Tabelle 36 und in der Besprechung danach.

4.2.5.2 Denaturierende Gradientengelelektrophorese

Nun wurde mit den acht Joghurtproben eine PCR mit dem Universalprimerpaar HDA1GC/ HDA2, mit 35 Zyklen durchgeführt und jeweils mit den Typstämmen Lb 1, Lb 25, Lc 3, Sc1, Lb 12, Bf 7, Bf 4 und dem Isolat Lb 20, als Vergleich, auf DGGE-Gele aufgetragen. Die Annealingtemperatur beträgt bei allen Bildern 54 °C und der Gradient 35-65 %. Durch Verwendung des Universalprimerpaares erhält man Banden in verschiedenen Höhen, die mit den Referenzstämmen und mit der Lactobacillen-Datenbank Abbildung 8 und Abbildung 9 verglichen werden können. Die Zusammenfassung der Ergebnisse findet man in der Tabelle 35 und der Tabelle 36, sowie in der Besprechung danach.

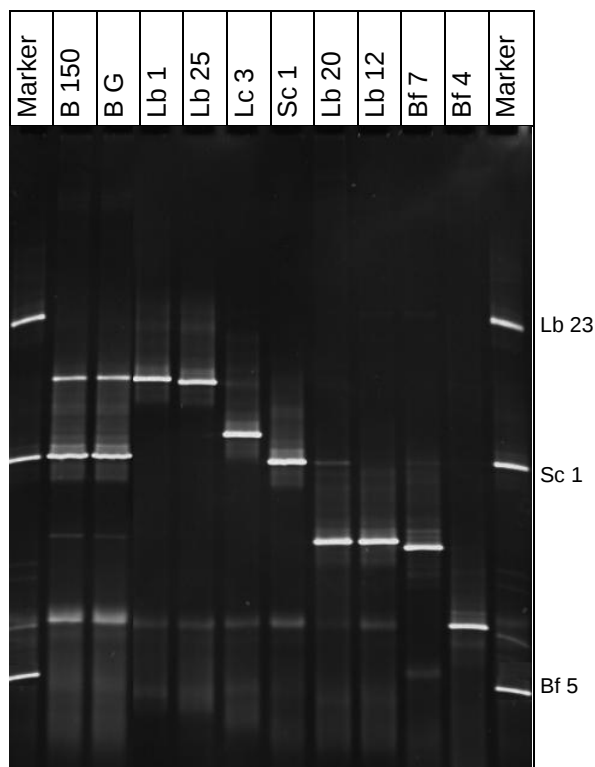


Abbildung 78: DGGE, Biac, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

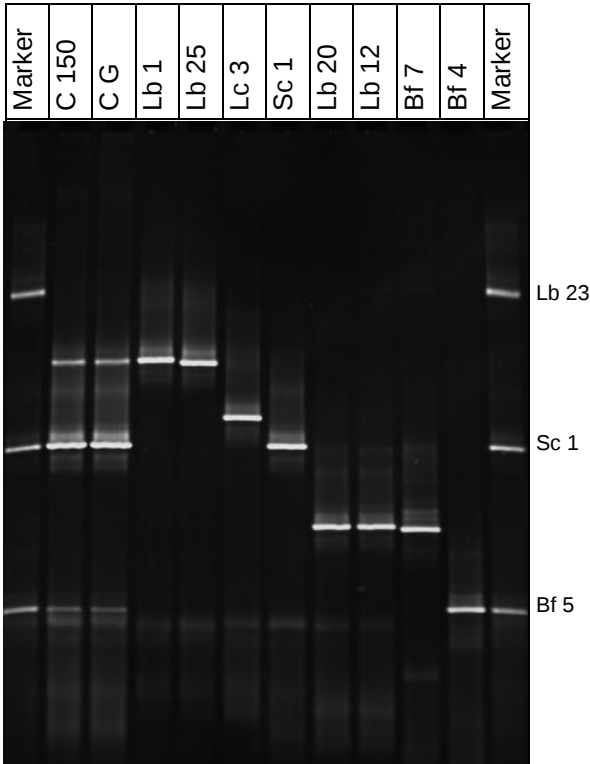


Abbildung 79: DGGE, Carrefour Sanus, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

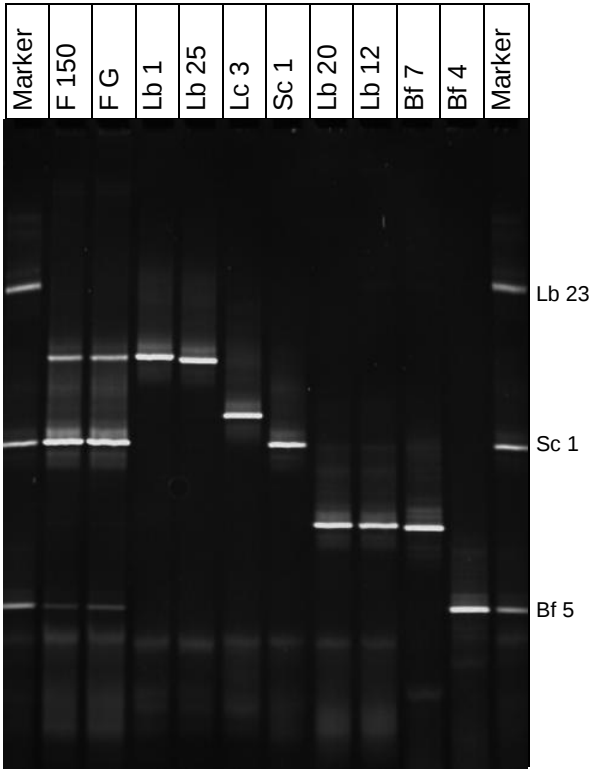


Abbildung 80: DGGE, Voll Fit Pur, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

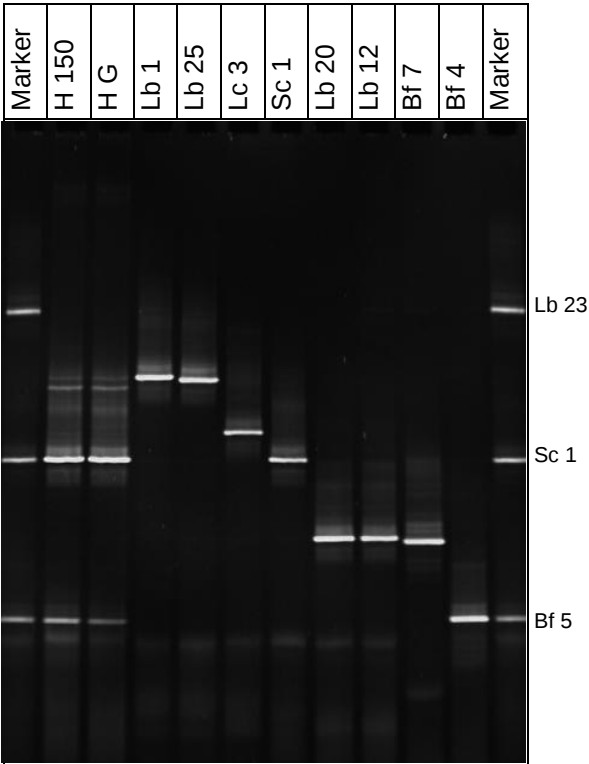


Abbildung 81: DGGE, Milfina Heidelbeere, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

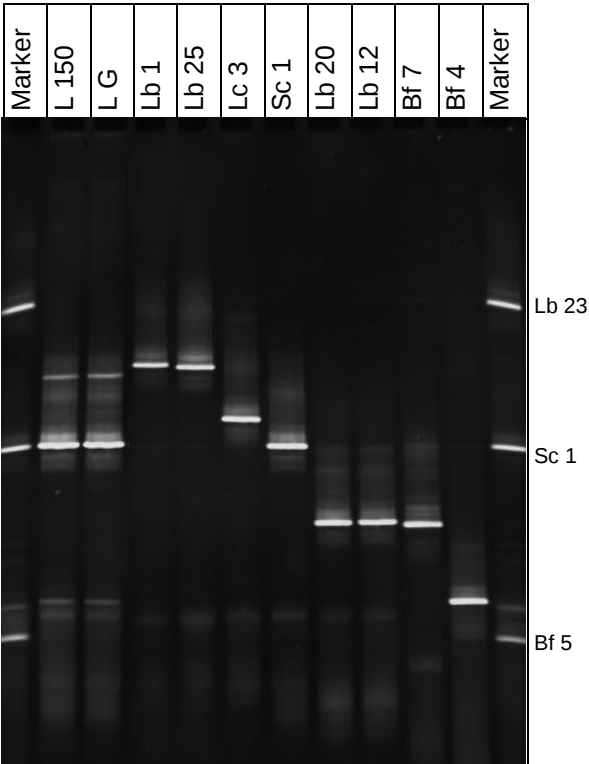


Abbildung 82: DGGE, Milfina Lactiv, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

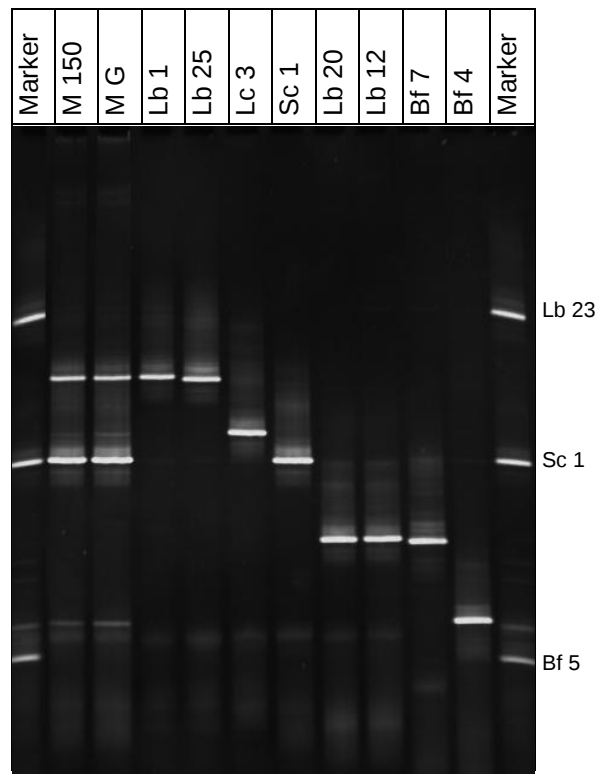


Abbildung 83: DGGE, Minus L, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

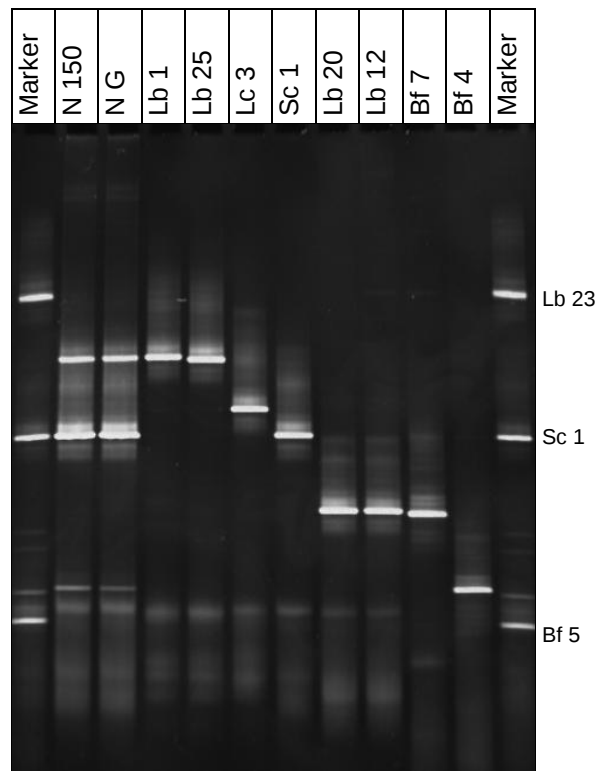


Abbildung 84: DGGE, Nöm Fasten, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

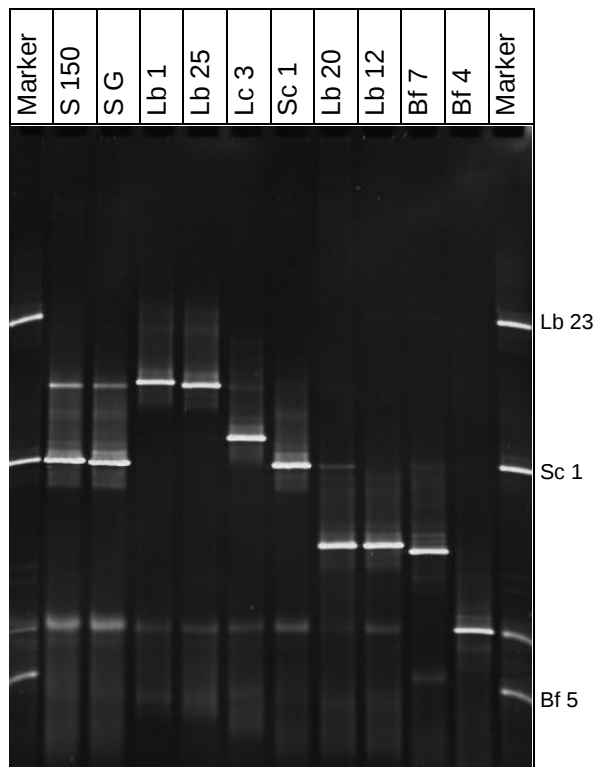


Abbildung 85: DGGE, Spar, natur pur, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

Die Abbildungen (Abbildung 78 bis Abbildung 85) zeigen die denaturierenden Gradientengelelektrophorese-Bilder der 8 probiotischen Joghurts, wobei pro Bild ein Joghurt links aufgetragen wurde und daneben die Referenzstämme. Man erkennt bei allen Proben eine Bande auf der Höhe des *Streptococcus thermophilus*. *Bifidobakterien* sind auch sehr stark vertreten, denn man findet sie in allen Proben, außer in der Spar, Natur pur-Probe. Auf der Höhe *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* findet man in den Joghurts Biac, Carrefour Sanus, Voll Fit Pur, Minus L, Nöm Fasten und Spar jeweils eine Bande, wobei diese nicht eindeutig einem der beiden Bakterien zuordenbar ist. Aus diesem Grund wurde versucht die beiden zu trennen, durch die Veränderung des Gradienten auf 40-55 % (siehe Abbildung 86 und Abbildung 87). Die Joghurts Milfina Heidelbeer und Milfina Lactiv weisen unspezifische Banden in der Mitte zwischen der ersten und zweiten Markerbande auf, daher wurden weitere Referenzstämme aufgetragen, um das gesuchte Bakterium zu finden. (siehe dazu Abbildung 88 bis Abbildung 91)

Tabelle 35: Identifizierung und Quantifizierung der MSB in den ersten 4 Joghurtproben

+++...sehr starke Bande ++-....starke Bande +--.....schwächere Bande -.....keine Bande			Biac		Carrefour		Voll Fit		Heidelbeere	
			150	G	150	G	150	G	150	G
Bif's	PbiF1/ PbiR2	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++-
		D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Bf 4	LWA/ LWB	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++-
		D	+++	+++	+++	+++	++-	++-	+++	+++
Bf 7	BiLon-1/ BiLon-2	A	-	-	-	-	-	-	+--	-
		D	-	-	-	-	-	-	-	-
Bf 7	LonU7/ LonU8	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D	-	-	-	-	-	-	-	--
Bf 11	BreU3/ BeL4	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Bf 9	BiINF-1/ BiINF-2	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Bf 13	BiBIF-1/ BiBIF-2	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Bf 17	BiADO-17 BiADO-2	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Lb 20	Para/ Y2	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
		D	+++	+++	-	-	-	-	-	-
Lb 12	Rham/ Y2	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb 1	AciNeu/ AciCrisJohII	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+--	+--
		D							-	-
Lb 25- Lb27	Del20A/ Del23B	A	+++	+++	+++	+++	+++	++-	+++	++-
		D	++-	++-	++-	++-	++-	++-	-	-
Lb 25	Bulg37/1 Bulg34/2	A	++-	++-	+++	+++	++-	++-	+--	+--
		D	++-	++-	++-	++-	++-	++-	-	-
Lb 26	Lact33/ Lact37A	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Lb 13	Lreu-1/ Lreu-4	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Lb 5	Joh-I/ AciCrisJohII	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Lc 1 Lc 3	gadB21FLc/ GAD7r_Lc	A	-	-	-	-	-	-	+++	++-
		D								
Lc 3	LLhis3F/ LLhis4R	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D	-	-	-	--	-	-	-	-
Lc 1 Lc 3	Lhis5F/ Lhis6R	A	-	-	-	-	-	-	+--	-
		D								
Lc 2	Lchis1F/ Lchis2R	A	-	-	-	-	-	-	++-	-
		D								
Sc 1	STherm1/ STherm2	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

A...Agarosegelelektrophorese; D...denaturierende Gradientengelelektrophorese

Tabelle 36: Identifizierung und Quantifizierung der MSB in den weiteren 4 Joghurtproben

+++...sehr starke Bande ++-....starke Bande +--.....schwächere Bande -.....keine Bande			Lactiv		Minus L		Nöm		Spar	
			150	G	150	G	150	G	150	G
Bif's	PbiF1/ PbiR2	A	+++	++-	+++	+++	+++	++-	-	-
		D	++-	++-	++-	++-	++-	++-	-	-
Bf 4	LWA/ LWB	A	+++	++-	+++	+++	+++	+++	-	-
		D	++-	++-	++-	++-	++-	++-	-	-
Bf 7	BiLon-1/ BiLon-2	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D	-	-	-	-	-	-	-	-
Bf 7	LonU7/ LonU8	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D	-	-	-	-	-	-	-	--
Bf 11	BreU3/ BeL4	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Bf 9	BiINF-1/ BiINF-2	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Bf 13	BiBIF-1/ BiBIF-2	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Bf 17	BiADO-17 BiADO-2	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Lb 20	Para/ Y2	A	-	-	-	-	-	-	+-	++-
		D	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb 12	Rham/ Y2	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Lb 1	AciNeu/ AciCrisJohII	A	-	-	++-	++-	+-	+-	-	-
		D	-	-	++-	++-	+-	+-	-	-
Lb 25- Lb 27	Del20A/ Del23B	A	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++
		D	-	-	-	-	-	-	+++	+++
Lb 25	Bulg37/1 Bulg34/2	A	+-	-	+-	-	-	-	+++	+++
		D	-	-	-	-	-	-	+++	+++
Lb 26	Lact33/ Lact37A	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Lb 13	Lreu-1/ Lreu-4	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Lb 5	Joh-I/ AciCrisJohII	A	-	-	-	-	-	-	-	-
		D								
Lc 1 Lc 3	gadB21FLc/ GAD7r_Lc	A	++-	+-	+++	+++	++-	++-	-	-
		D								
Lc 3	LLhis3F/ LLhis4R	A	-	-	+++	+++	-	-	-	-
		D	-	-	+-	+-	-	-	-	-
Lc 1 Lc 3	Lhis5F/ Lhis6R	A	+-	-	++-	++-	-	-	-	-
		D								
Lc 2	Lchis1F/ Lchis2R	A	+-	+-	+++	+++	+-	+-	-	-
		D								
Sc 1	STherm1/ STherm2	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

A...Agarosegelelektrophorese; D...denaturierende Gradientengelelektrophorese

Die obige Tabelle zeigt einen Überblick über alle 8 Joghurtproben, in beiden Aufarbeitungsmethoden und ihren Ergebnissen mit verschiedenen Primern in der Agarosegelelektrophorese und mit dem Universalprimerpaar HDA1GC/HDA2 in der denaturierenden Gradientengelelektrophorese.

Die Auswertung erfasst einerseits ob das Bakterium vorhanden oder nicht vorhanden ist, also eine Identifizierung, sowie eine Quantifizierung in drei Abstufungen, je nach Stärke der Banden. In den Bakterien *Lb. acidophilus* und *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* kann anhand dieser Bilder noch kein eindeutiges Ergebnis ausgewertet werden, daher wird ein weiterer Versuch mit der denaturierenden Gradientengelelektrophorese mit dem Gradienten 40-55 % durchgeführt. Durch die Wahl eines engeren Gradienten, wandernd die Banden dieser Bakterien weiter auseinander und können besser zugeordnet werden. Die Markerbande Bf 5 wandert zwar durch diese Auswahl aus dem Bild, ist für das Ergebnis nicht relevant, da sich die gesuchten Banden zwischen den ersten beiden Markerbanden befinden.

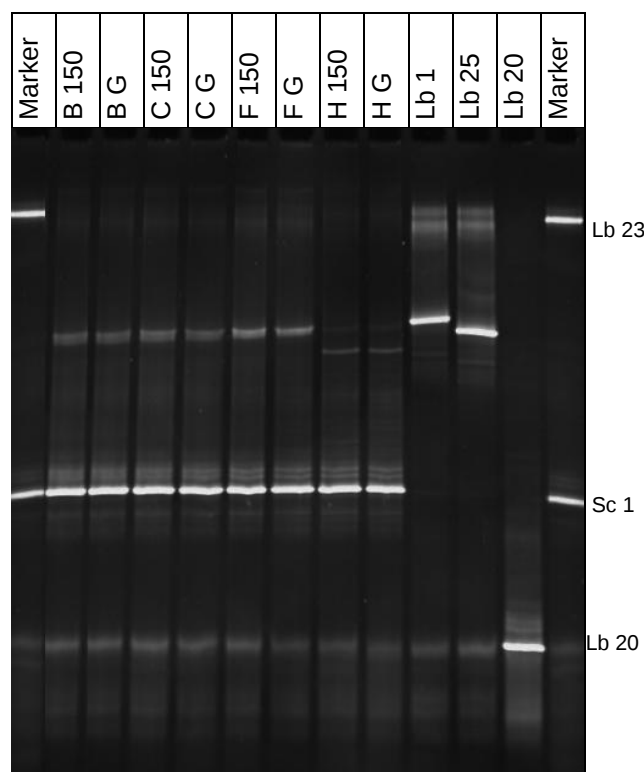


Abbildung 86: DGGE, Gradient 40-55 %, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

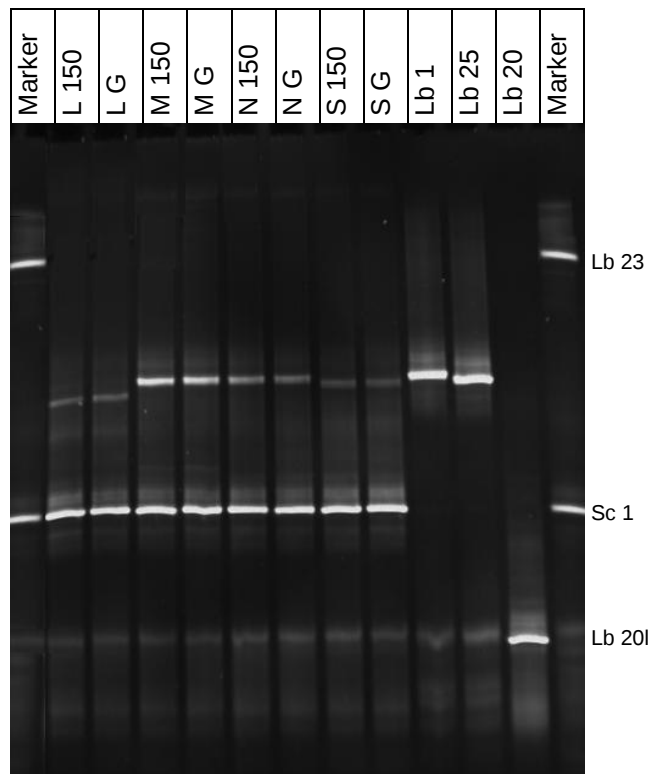


Abbildung 87: DGGE, Gradient 40-55 %, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

Die Abbildung 86 und Abbildung 87 zeigt auch die eine weitere Überprüfung des *Lb. paracasei ssp. paracasei*, die jedoch hier nicht eindeutig erkennbar ist, da die Bande im Bild so weit unten erscheint und somit direkt in das Grundrauschen übergeht. Außerdem sind die Banden zugunsten des *Sc. thermophilus* sehr schwach in ihrer Ausprägung.

In den Bahnen der Joghurts Milfina Heidelbeere und Milfina Lactiv sind Banden unterhalb des *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* sichtbar, die noch nicht zuordenbar sind, daher werden weitere Versuche mit verschiedenen in Frage kommenden Referenzbakterienstämmen durchgeführt. (Siehe dazu Abbildung 89, Abbildung 90 und Abbildung 91, die später genauer beschrieben werden.)

Zunächst folgt ein Versuch auf *Bifidobakterien* der Probe Spar, Natur pur, da sie die einzige ist, die laut AGE und DGGE keine Bifidobakterien enthält. Die Verpackung gibt dies zwar auch nicht an, jedoch wird mit dem weiteren Versuch (Abbildung 88) das Ergebnis bestätigt.

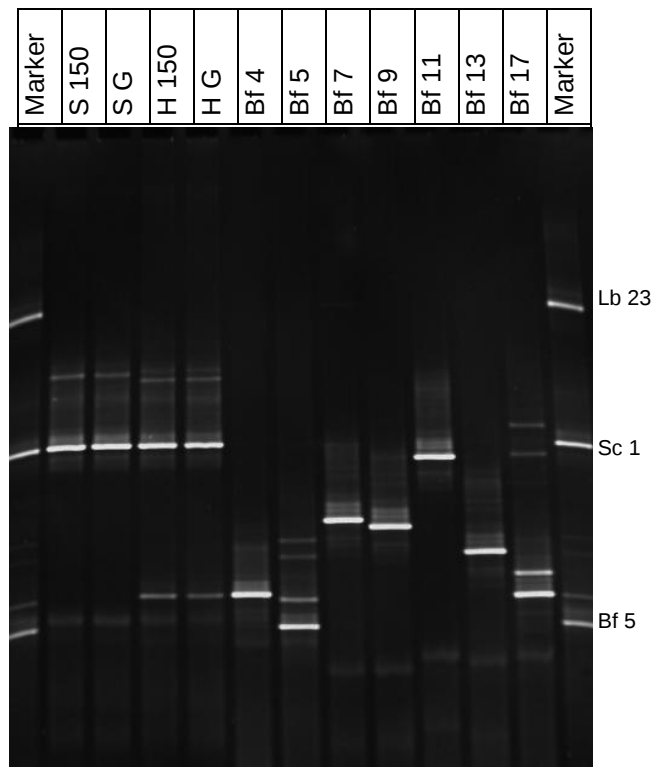


Abbildung 88: DGGE, Bifidobakterien, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

Die obige Abbildung 88 zeigt keine Banden auf Bifidobakterienhöhe in der Probe Spar und bestätigt somit das festgestellte Ergebnis.

Die Probe Milfina Heidelbeere zeigt nun noch einmal, wie schon in den Bildern der Agarosegelelektrophorese (Abbildung 61) und der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (Abbildung 81) festgestellt, eindeutig die Banden auf der Höhe Bf. animalis ssp. lactis.

Die unspezifischen Banden der Joghurts Milfina Heidelbeere und Milfina Lactiv wurden zunächst auf den Verdacht hin, dass sie *Leuconostoc*-Bakterien beinhalten, untersucht. Dazu wurden diese beiden Joghurts in beiden Aufarbeitungsmethoden auf ein DGGE-Gel neben den Bakterien *Le. lactis*, *Le. mesenteroides* ssp. *cremoris* und *Oenococcus oeni* aufgetragen. Wie in Abbildung 107 (im Anhang) zu sehen ist, war die Annahme falsch und das Ergebnis negativ.

Weiters wurden nach Betrachtung der HDA1GC/ HDA2- Lactobacillen Datenbank weitere Referenzstämme neben den Joghurts mit den unspezifischen Banden aufgetragen. (Abbildung 89)

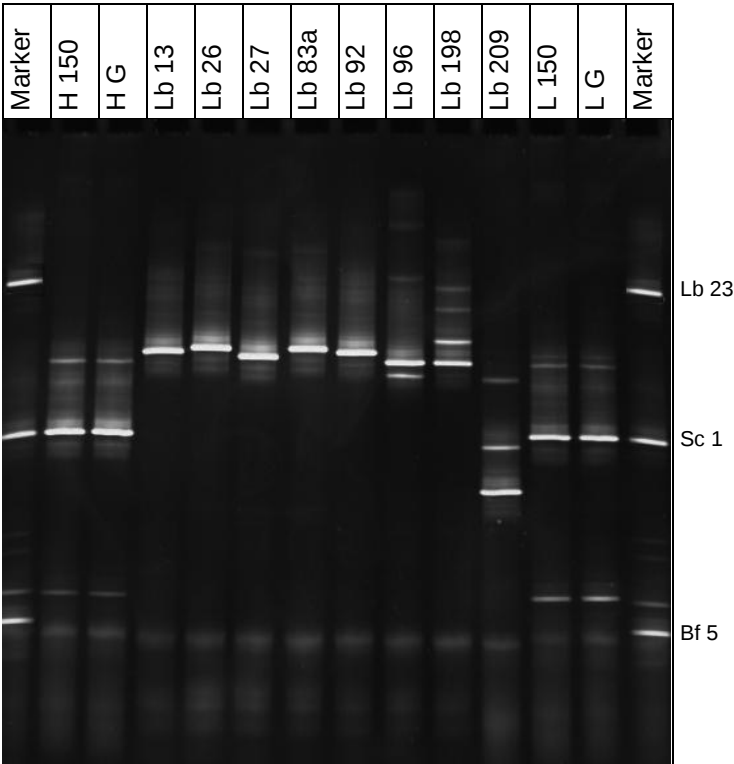


Abbildung 89: DGGE, Lactobacillen, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

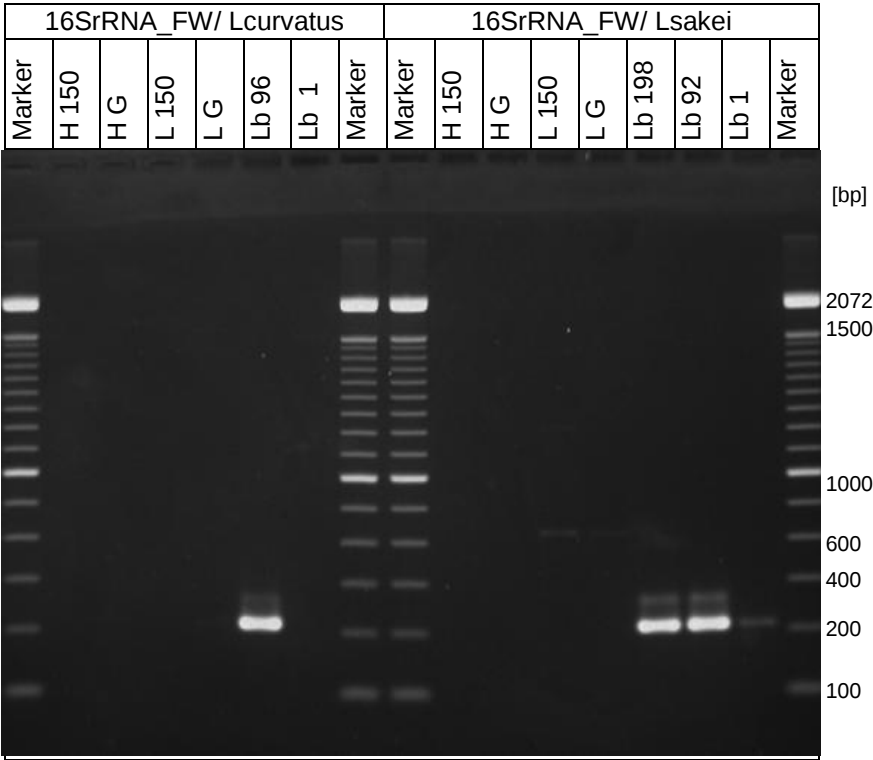


Abbildung 90: AGE, *Lb. sakei* ssp. *curvatus*, *Lb sakei* ssp. *sakei*, 50 °C

Die Abbildung 89 zeigt eine Auswahl an Lactobacillen, die sich ungefähr auf Höhe der unspezifischen Banden befinden. Aus diesem Versuch heraus fällt der nächste Verdacht auf die *Lactobacillen* *Lb. curvatus ssp. curvatus* und *Lb. sakei ssp. carnosus*, daher wurde eine speziesspezifische PCR mit den Primerpaaren 16SrRNA_FW/ Lcurvatus und 16SrRNA_FW/ Lsakei durchgeführt und auf ein Agarosegel aufgetragen. In Abbildung 90 sieht man, dass beide Verdächtige nicht bestätigt werden können.

In Abbildung 91 wurden weitere probiotische Bakterien aufgetragen und inmiten dieser die beiden Joghurts. Dieses Bild lässt auf den *Pediococcus pentosaeus* 159 schließen, der in den Joghurts Milfina Heidelbeere und Milfina lactiv enthalten ist. Dieser ist für Geschmack verantwortlich und wird eher in der Rohwurstherzeugung eingesetzt, daher viel der Verdacht erst zum Schluss auf ihn. Die Banden sind sehr schwach, daher wird er nur einen geringen Anteil der Starterkultur ausmachen.

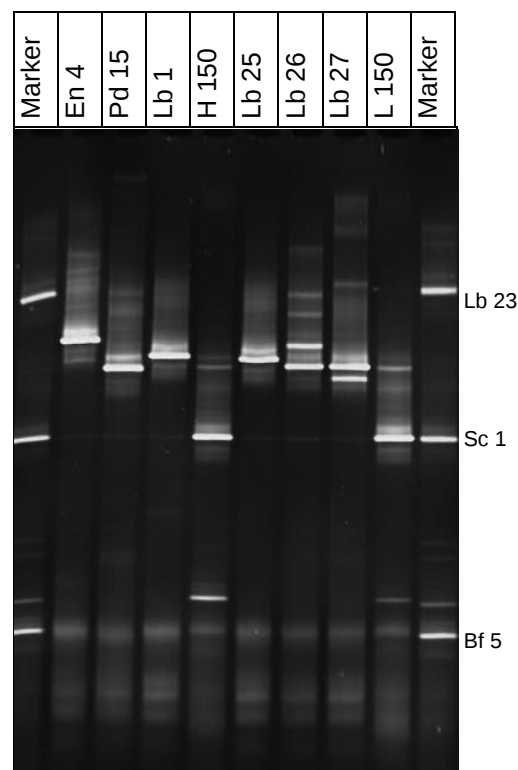


Abbildung 91: DGGE, *Pediococcus pentosaceus* 159, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

Greift man sich nun die *Lactobacillenspezies delbrueckii* heraus mit den Bakterien *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii ssp. lactis* und *Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii* sieht man im Versuch mit dem Spezies-spezifischen Primerpaar Del20A/ Del23B starke Banden im Agarosegel bei den Proben Biac, Carrefour Sanus, Voll Fit Pur, Milfina Heidelbeere, Milfina Lactiv und Spar, Natur pur. Da auf den Subspeziesspezifischen Test mit dem Primerpaar Bulg37/1/ Bulg43/2 nur die Joghurts Carrefour Sanuns und Spar, Natur pur mit sehr starken Banden im AGE-Gel und die Proben Biac und Voll Fit mit relativ starken, Milfina Heidelbeere und Milfina Lactiv mit nur sehr schwachen Banden angezeigt werden und weiters der Test auf *Lb. delbrueckii ssp. lactis* bei allen negativ ausfällt, kommt man zum Ergebnis, dass die Joghurts Milfina Heidelbeer und Milfina Lactiv mit ziemlicher Sicherheit den *Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii* enthalten. Dieser Lb 27 befindet sich zudem auf der Höhe der unspezifischen Banden und dem Pd 15, daher kann in diesem Fall kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden.

Der Genus *Lactococcus* wurde auf Speziesspezifische und Subspeziesspezifische Ebene hin untersucht mit den Primerpaaren siehe Tabelle 35 und Tabelle 36. Die Bakterien *Lc. lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* und *Lc. lactis ssp. lactis* gemeinsam kommt man in den Proben Milfina Heidelbeere, Milfina Lactiv, Minus L und Nöm zu starken Banden. Auf den Test für *Lc. lactis ssp. cremoris* erhält man sehr starke Banden in der Minus L-Probe. In dieser ist auch der *Lc. lactis ssp. lactis* stark vertreten. Zusammenfassend gesagt: die Proben Biac, Carrefour Sanus, Voll Fit Pur und Spar, Natur pur enthalten keine *Lactococcen*. Milfina Heidelbeere, Milfina Lactiv und Nöm Fasten beinhalten Lc 1 und Lc 2 und Minus L enthält Lc 2 und Lc 3. (Dass die Probe Minus L *Lactococcen* enthält zeigt auch die Abbildung 106, im Anhang.)

5 Schlussbetrachtung

Die Erstellung einer leiterförmigen Laktobacillen-Datenbank bringt den Vorteil unbekannte Banden auf DGGE-Gelen schneller zuordnen zu können. Das Universalprimerpaar HDA1GC/ HDA2 amplifiziert von 23 Referenzstämmen alle, davon identifiziert es aber nur 9 Referenzstämmen. Das Universalprimerpaar GC_LbtufF/ LbtufR amplifiziert zwar nur 19, jedoch ist es in seiner Identifizierung mit 10 Referenzstämmen höher als das HDA1GC/ HDA2-Primerpaar. Um ein Beispiel herauszunehmen, liefert die HDA1GC/ HDA2-Leiter keine Unterscheidung zwischen *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. gallinarum* und *Lb. helveticus*, jedoch die GC_LbtufF/ LbtufR-Leiter differenziert den *Lb. acidophilus* von allen anderen, *Lb. crispatus* und *Lb. amylovorus* heben sich deutlich vom *Lb. gallinarum* ab, jedoch der *Lb. helveticus* liegt auf eine Höhe mit dem *Lb. gallinarum*. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es durchaus sinnvoll ist mit beiden Primerpaaren in Kombination zu arbeiten, da dadurch 14 Referenzstämmen eindeutig identifiziert werden können.

Als Methodenoptimierung und –vergleich dienten die Verdünnungsreihen der Bakterien *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus* und *Sc. thermophilus*, die jeweils von 10^9 KBE/ ml bis 10^1 KBE/ ml in neun Verdünnungsstufen vorlagen. Es wurde jeweils mit PCR-AGE, PCR-DGGE und Real-Time PCR gearbeitet und die Methoden miteinander verglichen. Die Methoden liefern brauchbare Ergebnisse bis in sehr hohe Verdünnungen, so lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Agarosegelelektrophorese bis zur Verdünnungsstufe 10^5 bzw. 10^4 Banden zeigt, mit der Ausnahme des *Sc. thermophilus*, der sich in einer frisch verdünnten Reihe bis 10^3 KBE nachweisen ließ. Die denaturierende Gradientengelelektrophorese weist ebenso Banden bis zur Verdünnungsstufe 10^4 auf. Die Real-Time PCR ist die genaueste Methode, bei der die Amplifizierung in „Echtzeit“ mitverfolgt werden kann. Sie liefert einen Nachweis bis 10^3 je nach verwendetem Bakterium und Primerpaar. Um diese Methode noch weiter zu optimieren, sollten Temperaturversuche mit den speziesspezifischen Primerpaaren durchgeführt werden und die Verdünnungsreihe möglichst frisch hergestellt sein, um Kontaminationen zu vermeiden. Sterile Bedingungen sind in die-

sem Fall von besonderer Wichtigkeit, da mit nochmal um den Faktor 10 weiterverdünnten Proben gearbeitet wird.

Zum Ergebnis der 8 Joghurtproben ist zu erwähnen, dass die Starterkulturen von probiotischen Joghurts sehr ähnlich aufgebaut sind. In allen acht Proben ließ sich der *Sc. thermophilus* nachweisen. Bifidobakterien, besonders *Bf. animalis ssp. lactis* finden sich in sieben Proben, alleinig die Spar, Natur pur-Probe enthielt keine Bifidobakterien. Der *Lb. acidophilus* und *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* waren schwer zu trennen, da die Bandenhöhe fast ident bei diesen beiden ist. Es findet sich der *Lb. acidophilus* in den Proben Biac, Carrefour Sanus, Voll Fit Pur, Minus L und sehr wenig im Nöm Fasten-Joghurt. Der *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* ist im Biac, Carrefour, Voll Fit und Spar, Natur pur- Joghurt enthalten. Um sich hier eine Bestätigung zu holen, wäre es eine Möglichkeit mit dem GC_LbtufF/ LbtufR-Primerpaar weiterzuarbeiten, da dieses die beiden Bakterien sehr gut differenziert.

Auffällig waren die unspezifischen Banden in den Produkten Milfina Heidelbeere und Milfina Lactiv, die beide Produkte der Handelskette Hofer sind, die sich nicht eindeutig identifizieren ließen. Nach längerer Versuchsreihe konnte der Verdacht auf zwei Bakterien beschränkt werden, wobei der *Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii* eine hohe Wahrscheinlichkeit trägt enthalten zu sein, da diese Spezies sehr gerne für Joghurtherzeugnisse herangezogen wird. Andererseits war das Bandenmuster der unspezifischen Produkte mit dem *Pd. pentosaceus* 159 ident.

Weiters fanden sich Lactococcen in vier der acht Proben, im Milfina Heidelbeere, Milfina Lactiv, Minus L und Nöm Fasten-Joghurt. Es wurden in diesen Joghurtproben die Lactococcen *Lc. lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis*, *Lc. lactis ssp. cremoris* und *Lc. lactis ssp. lactis* verwendet.

Eine Quantifizierung wurde mittels Bewertung der Bandenstärke durchgeführt und in Tabelle 35 und Tabelle 36 zusammengefasst.

6 Zusammenfassung

Die Aufgabenstellung umfasst die Identifizierung und Quantifizierung von Milchsäurebakterien in probiotischen, fermentierten Milchprodukten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) und Real-Time PCR.

Es wird eine DGGE-Datenbank in Form einer Leiter mit den Universal-Primerpaaren HDA1GC/ HDA2 und GC_LbtufF/ LbtufR erfasst, um Lactobacillen in unbekannten Proben durch Bandenvergleich identifizieren zu können.

Mittels der Typstämme der drei Spezies *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus* und *Sc. thermophilus* werden die Agarosegelelektrophorese, denaturierende Gradientengelelektrophorese und Real-Time PCR unter Austestung von Verdünnungsreihen, in neun Verdünnungsstufen von 10^9 KBE/ ml bis 10^1 KBE/ ml, auf ihre Nachweisgrenzen hin geprüft. Die verwendeten Primerpaare ermöglichen eine Nachweisgrenze um ca. 10^4 KBE/ ml wobei unter Verwendung einer neu isoliert und verdünnten Reihe eine Nachweisgrenze von 10^3 KBE/ ml erreicht werden kann.

Als Hauptaufgabe werden 8 probiotische Milchprodukte, davon 3 Drinks und ein lactosefreies Joghurt auf ihre Milchsäurebakterienflora mittels Agarosegelelektrophorese und denaturierender Gradientengelelektrophorese untersucht. Dabei können die Bakterien *Sc. thermophilus*, *Bf. animalis* ssp. *lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* und *Lc. lactis* ssp. *lactis* identifiziert und durch Bestimmung ihrer Bandenstärke quantifiziert werden.

Durch den Einsatz einer Datenbank, die auch auf andere Bakteriengattungen erweiterbar ist, kann eine schnellere Identifizierung statt finden. Der Nachweis kann durch den Einsatz der Real-Time PCR verkürzt werden, würde jedoch auch teurer sein.

7 Literaturverzeichnis

- ACTOGENIX NV. ActoBiotics: A new class of biopharmaceuticals. <http://www.actogenix.com/eng/products/index.php> (22.11.2009).
- ADKINS S. und BURMEISTER M. Visualization of DNA in Agarose Gels as Migrating Colored Bands: Applications for Preparative Gels and Educational Demonstrations. *Analytical Biochemistry* 1996; 240: 17-23.
- AHRENSBACH K. "My Whey"- New Probiotic Drink Concept. *Daish Dairy & Food Industry* 2008; 18: 48-49.
- BIO-RAD LABORATORIES. Real- Time PCR Applications Guide 2006: 1-84.
- BIO-RAD LABORATORIES. The DCode™ Universal Mutation Detection System. Catalog Numbers 170-9080 through 170-9104 1996: 1-77.
- BIORON. Polymerasekettenreaktion. <http://www.bioron.net> (1.12. 2009).
- BISCHOFF S.C. Probiotika, Präbiotika und Synbiotika. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2009; 103-115.
- BONAPARTE C. und KNEIFEL W. Neue Trends bei gesundheitlich relevanten Lebensmitteln: 2. Präbiotika und Synbiotika. *Ernährung/Nutrition* 1999; 23: 152-158.
- BUSINESS INSIGHTS. Innovation in Soft Drinks. <http://www.globalbusinessinsights.com> (01.03.2010).
- CASALTA E. und MONTEL M.C. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 126(3): 271-273.
- CHEN H., SHEU S., LU H., HUANG S. und HWANG W. Detection and identification of *Lactobacillus* species in probiotic products in Taiwan by selective media, 16S rDNA-based universal and developed group-specific PCR-DGGE. *FEMS Microbiology Letters* 2008; 08-09-0883: 9-27.
- CLAESSON M. J., VAN SINDEREN D. und O'TOOLE P. W. *Lactobacillus* phylogenomics- towards a reclassification of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008; 58: 2945-2954.
- COLLINS M. D., RODRIGES U., ASH C., AGUIRRE M., FARROW J. A. E., MARTINEZ-MURCIA A., PHILLIPS B. A., WILLIAMS A. M. und WALL-BANKS S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of

16S rRNA. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters 1991; 77: 5-12.

DEL PIANO M., STROZZI P., BARBA M., ALLESINA S., DEIDDA F., LORENZINI P., MORELLI L., CARMAGNOLA S., PAGLIARULO M., BALZARINI M., BALLARÈ M., ORSELLO M., MONTINO F., SARTORI M., GARELLO E. und CAPURSO L. In vitro sensitivity of probiotics to human pancreatic juice. Journal of Clinical Gastroenterology 2008; 42: 170-173.

DELLAGLIO F., FELIS G.E. und TORRIANI S. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an Opinion. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2002; 52: 285-287.

DESAI A. R., SHAH N. P. und POWELL I. B. Discrimination of Dairy Industry Isolates of the *Lactobacillus casei* Group. Journal of Dairy Science 2006; 89: 3345-3351.

DICKS L. M. T., DU PLESSIS E. M., DELLAGLIO F. und LAUER E. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* AtCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. International Journal of Systematic Bacteriology 1996; 46: 337-340.

DUNSTMANN H. Markterfolg mit Functional Food. In: Der Schmale Grat auf dem Weg zum Top-Produkt. Deutscher Fachverlag Frankfurt am Main, 2006; 118-119.

ENVIRONMENTAL EXPERT. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. <http://www.environmentalexpert.com/files/24977/images> (28.03.2010).

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Erste Gutachten der EFSA zu Art. 13. <http://www.health-claims-verordnung.de/stoffe.html> (15.11.2009).

FELIS G. E. und DELLAGLIO F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. Current issues in intestinal microbiology 2007; 8: 44-61.

FLOREZ A.B. und MAYO B. PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the Spanish blue-veined Cabrales cheese. International Dairy Journal 2006; 16: 1205-1210.

FOLIGNE B., DESSEIN R., MARCEAU M., POIRET S., CHAMAILLARD M., POT B., SIMONET M. und DANIEL C. Prevention and Treatment of Colitis With *Lactococcus lactis* Secreting the Immunomodulatory Yersinia Lcrv Protein. Gastroenterology 2007; 133: 862-874.

- FREY I., ARRIGONI E. und AMADÒ R. Kritische Betrachtung von Pro- und Prebiotika anhand von Humanstudien. Ernährung/Nutrition 2001; 25: 485-501.
- GASSEN H.G., SACHSE G.E. und SCHULTE A. PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York, 1994; 1-11.
- GEY M.H. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2008; 173-178.
- GUO Z., WANG J., YAN L., CHEN W., LIU X. und ZHANG H. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. School of Food Science and Technology 2009; 42: 1640-1646.
- HAMMES W.P. und VOGEL R.F. The genus *Lactobacillus*. The Genera of Lactic Acid Bacteria 1995; 2: 19-54.
- HEILIG H.G.H.J., ZOETENDAL E.G., VAUGHAN E.E., MARTEAU P., AKKERMANS A.D.L und DEVOS W.M. Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and Other Lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA. Applied and Environmental Microbiology 2002; 68: 114-123.
- HEMME D. und FOUCAUD-SCHEUNEMANN C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. International Dairy Journal 2003; 14: 467-494.
- HOLZAPFEL W. H., HABERER P., GEISEN R., BJÖRKROTH J. und SCHILLINGER U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Journal of Clinical Nutrition 2001; 73: 365-373.
- JAHNSOHN M. Gentechnische Methoden. Jahnsohn M. , München, 2007; 177-187.
- KLEEREBEZEM M. und VAUGHAN E.E. Probiotic and Gut Lactobacilli and Bifidobacteria: Molecular Approaches to Study Diversity and Activity. Annu Rev Microbiol 2009; 63: 269-290.
- KLEIN G., PACK A., BONAPARTE C. und REUTER G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 1998; 41: 103-125.
- KNEIFEL W. und BONAPARTE C. Milchsäurebakterien- eine Thematik zwischen Tradition und Zukunft. Lebensmittel- & Biotechnologie 1996a; 2: 60-61.

- KNEIFEL W. und BONAPARTE C. Starterkulturen für Milchprodukte- vom Säurewecker zum Lebensretter? Milchwirtschaftliche Berichte 1996b: 93-99.
- KNEIFEL W. B.C. Neue Trends bei gesundheitlich relevanten Lebensmitteln: 1. Probiotica. Ernährung/Nutrition 1998; 22: 357-363.
- KÖNIG H. Verbraucherschutz und Verbrauchereinstellung heute. Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel: Functional Food - Forschung, Entwicklung und Verbraucherakzeptanz 2005; 1: 35-52.
- KÜCK U. Praktikum der Molekulargenetik. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2005; 226-228.
- KUNZ C. Functional Food - Entwicklung und Hypothesen. Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel: Functional Food - Forschung, Entwicklung und Verbraucherakzeptanz 2005; 1: 5-6.
- LI Y., SAXENA D., BARNES V.M., GE Y. und XU T. Polymerase chain reaction-based denaturing gradient gel electrophoresis in the evaluation of oral microbiota. Oral Microbiology Immunology 2006; 21: 333-339.
- LI Z., XU J., TANG C., WU J., MUHAMMAD A. und WANG H. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. Chemosphere 2006; 62: 1374-1380.
- LIMSOWTIN G. K. Y., BROOME M. C. und POWELL I. B. Lactic acid bacteria, taxonomy. Elsevier Science Ltd. Australia 2002: 1470- 1484.
- LÖFFLER G. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer Verlag, Deutschland, 2003; 366-375.
- LOTTSPEICH F. und ENGELS J.W. Bioanalytik. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2006; 743-749.
- MATIASKE B. Die Entwicklung funktioneller Lebensmittel in Japan, Deutschland und den USA. Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel: Functional Food - Forschung, Entwicklung und Verbraucherakzeptanz 2005; 1: 9-16.
- MAYER H. K., BONAPARTE C., DOMIG K. J. und KNEIFEL W. Charakterisierung von probiotischen Milchsäurebakterien mittels molekularbiologischen Verfahren. Österreichische Lebensmittelchemiker Tage 1998: 157-168.
- MCCARTNEY A.L. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. British Journal of Nutrition 2002; 88: 29-37.

- MENRAD K. Die Zukunft von Functional Food aus der Perspektive der Wissenschaft. Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel: Functional Food - Forschung, Entwicklung und Verbraucherakzeptanz 2005; 1: 53-80.
- MINELLI E.B., BENINI A., MARZOTTO M., SBARBATI A., RUZZENENTE O., FERRARIO R., HENDRIKS H. und DELLAGLIO F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. International Dairy Journal 2004; 14: 723-736.
- MÜLLER D. Substantiierung von Health Claims: Die rechtliche Problematik von Functional Foods. Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel: Functional Food - Forschung, Entwicklung und Verbraucherakzeptanz 2005; 1: 7-8.
- MÜLLER M. Wann sind Lebensmittel wirklich gesund? Ein Ausblick auf die neue Health-Claims-Verordnung. Network - Karriere 2007:1-19.
- NIETO-ARRIBAS P., SESENA S., POVEDA J.M., PALOP L. und CABEZAS L. Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. Food Microbiology 2010; 27: 85-93.
- RAPLEY R. und WALKER J.M. Molecular Biomethods Handbook. Humana Press 1998: 1-12.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. und ERLICH H.A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science 1988; 239: 488-492.
- SATOKARI R.M., VAUGHAN E.E., AKKERMANS A.D.L., SAARELA M. und W.M. D. Bifidobacterial Diversity in Human Feces Detected by Genus-Specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 2001; 67: 504-513.
- SCHLEIFER K. H., EHRMANN M., BEIMFOHR C., BROCKMANN E., AMANN W. L. und AMANN R. Application of Molecular Methods for the Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria. International Dairy Journal 1995; 5: 1081-1094.
- SCHLEIFER K. H. und LUDWIG W. Phylogeny of the Genus *Lactobacillus* and Related Genera. Systematic and Applied Microbiology 1995; 18: 461-467.
- SCHRIMPF G. Gentechnische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 2002; 163-167.
- SPIEKERMANN U. Functional Food: Zur Vorgeschichte einer "modernen" Produktgruppe. Ernährungs-Umschau 2002; 49: 182-188.

- STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 1997: 1-29.
- TEMMERMAN R., HUYS G. und SWINGS J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology* 2004; 15: 348-359.
- THE NOBEL FOUNDATION. The Nobel Prize in Chemistry 1993. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993 (28.11.2009).
- UNI MARBURG. Moderne Methoden: Die Polymerase Kettenreaktion. <http://online-media.uni-marburg.de> (23.11.2009).
- VANHOUTTE L.T., GEERT DR.H. und CRANENBROUCK DR.I.S. Exploring microbial exosystems with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Belgian Co-Ordinated Collections Of Microorganisms* 2005; 17: 1-4.
- WALTER J., TANNOCK G.W., TILSALA-TIMISJARVI A., RODTONG S., LOACH D.M., MUNRO K. und ALATOSSAVA T. Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Applied and Environmental Microbiology* 2000: 297-303.
- WEBER H. *Mikrobiologie der Lebensmittel*. B. Behr's Verlag GmbH & Co, Hamburg, 1996; 107-192.

8 Anhang

8.1 Abstract

The topic is identifying and quantifying lactic acid bacteria in probiotic, fermented dairy products by using polymerase chain reaction, denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR.

A DGGE-database is constructed with lactobacilli by using the universal primer-pairs HDA1GC/ HDA2 and GC_LbtufF/ LbtufR. This ladder is building a good fundament finding unknown bacteria in various products.

Three dilutions in the range from 10^9 CFU/ ml to 10^1 CFU/ ml of the bacterial species *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus* and *Sc. thermophilus* were done to determine the limit of detection in the methods agarose gel electrophoresis, denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. The detection limit of agarose gel electrophoresis and DGGE is approximately 10^4 CFU/ ml and in real-time PCR 10^3 CFU/ ml.

The main part of this diploma thesis deals with identification of 8 various probiotic yoghurts, three of them are drinks and one of them is lactosefree, on their microbiotic flora by using the methods agarose gel electrophoresis and denaturing gradient gel electrophoresis. The bacterial species *Sc. thermophilus*, *Bf. animalis* ssp. *lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* and *Lc. lactis* ssp. *lactis* are identified and quantified by comparing the intensity of bands.

If the ladder would be expanded above a broader range of bacterial generary a faster identification can be achieved. By using real-time PCR in this content, the experimental performance would be higher but more expensive.

ad Verdünnungsreihen *Streptococcus thermophilus*:

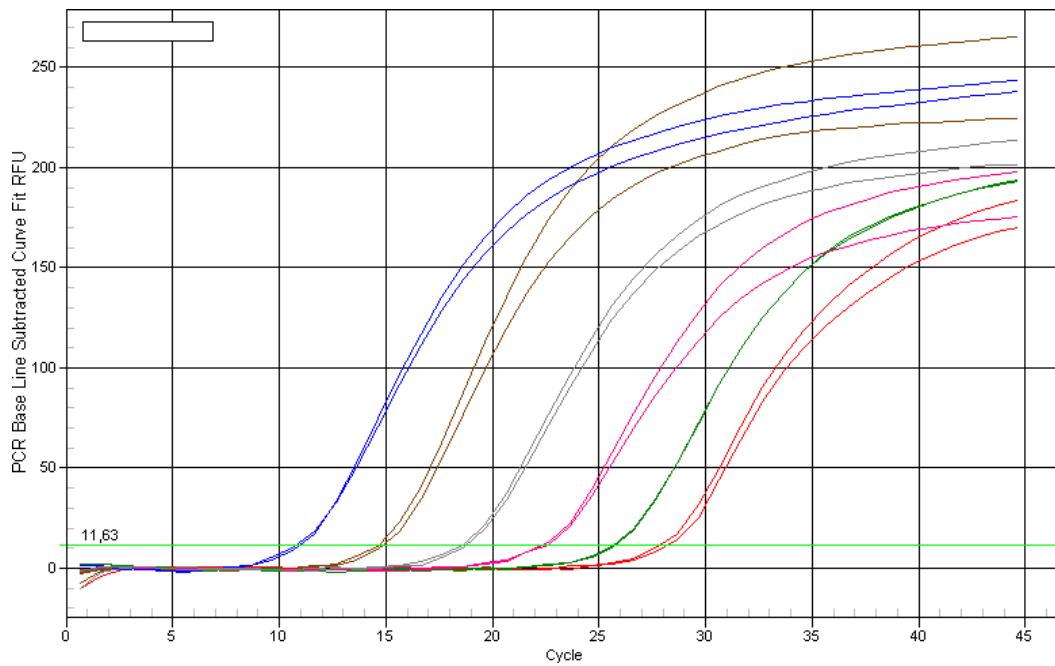


Abbildung 92: Sc 1, Amplifikationskurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

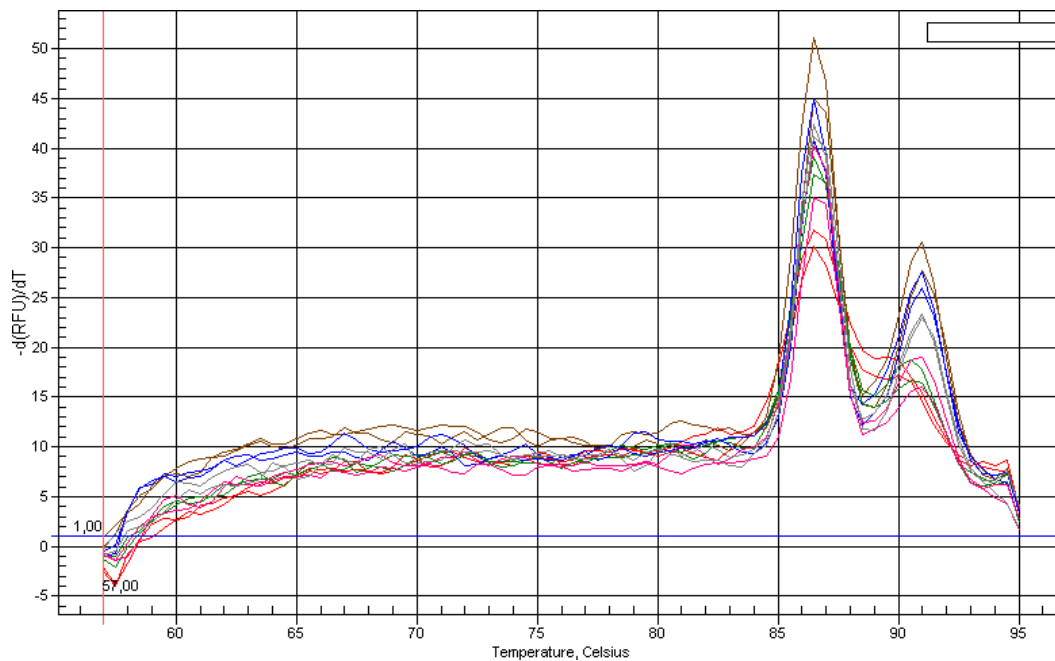


Abbildung 93: Sc 1, Schmelzkurve, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

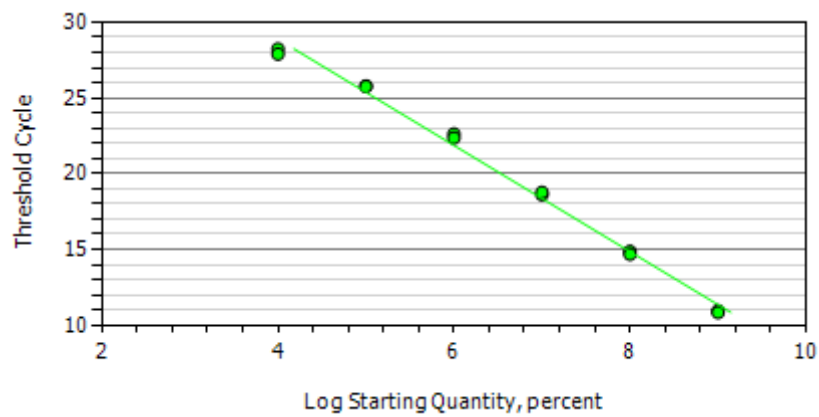


Abbildung 94: Sc 1, Standardgerade, $R^2 = 0,993$, $E = 93,9 \%$,
Threshold Cycle: siehe Tabelle 32

ad Lactobacillen-Datenbank mit dem GC_LbtufF/ LbtufR- Primerpaar:

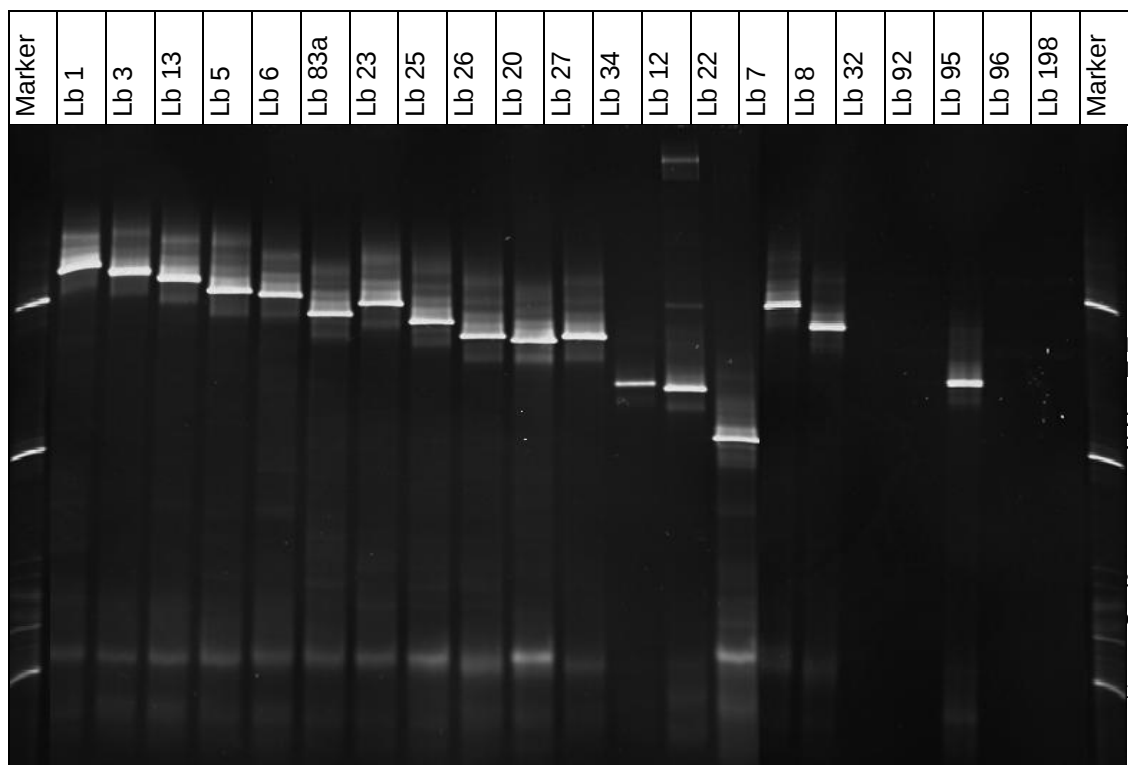


Abbildung 95: DGGE, GC_LbtufF/ LbtufR 56 °C, Gradient: 35-65 %

Erster Versuch der richtigen Reihenfolge für die GC_LbtufF/ LbtufR -Leiter

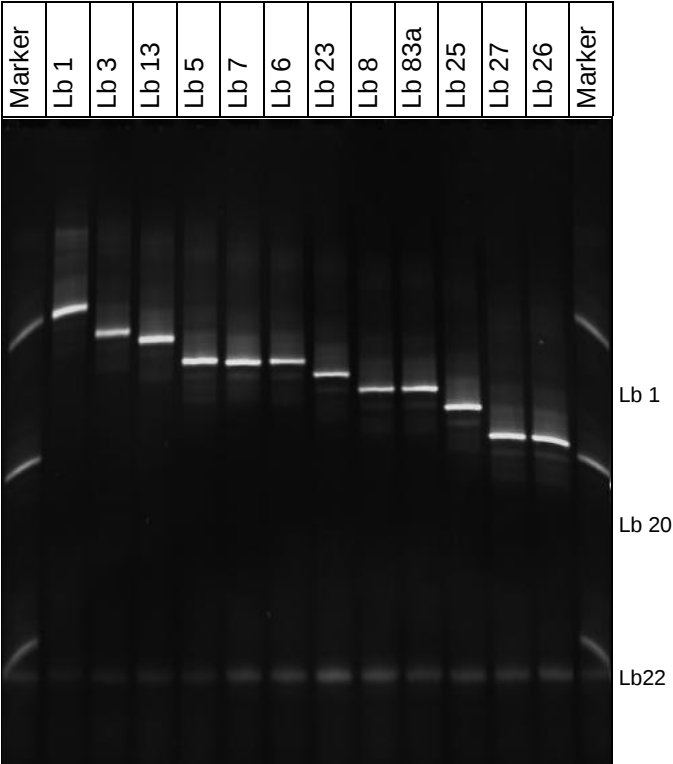


Abbildung 96: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **38-50 %**

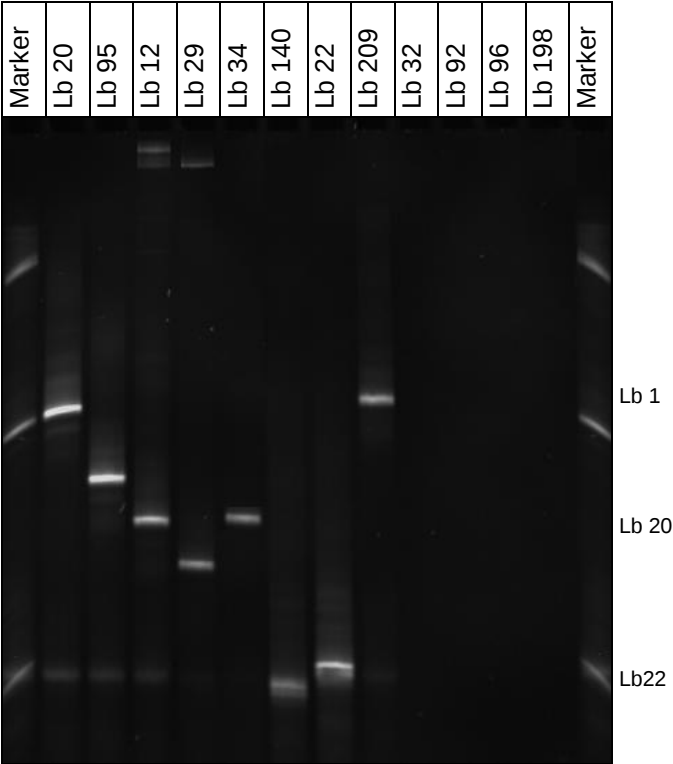


Abbildung 97: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **38-50 %**

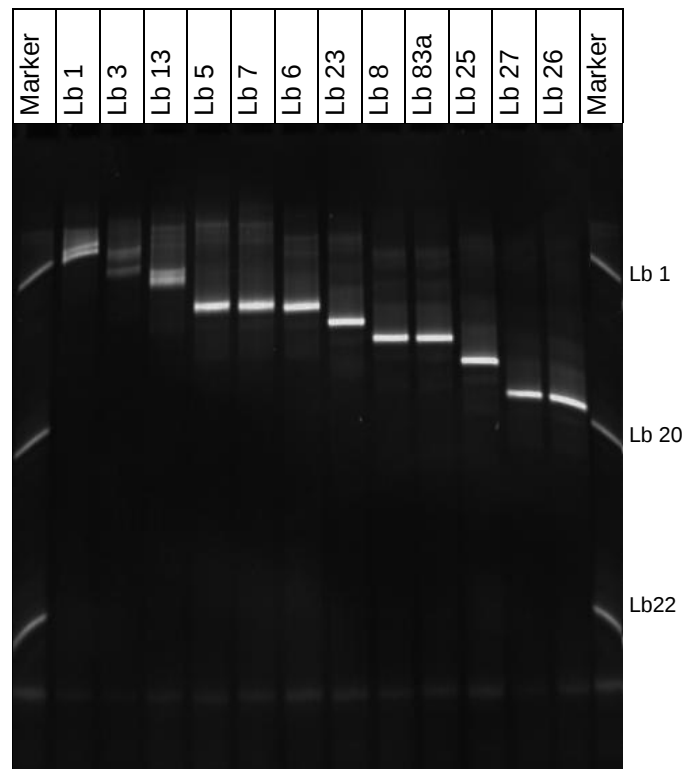


Abbildung 98: DGGE, Leiter, GC_LbtuffF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **40-50 %**

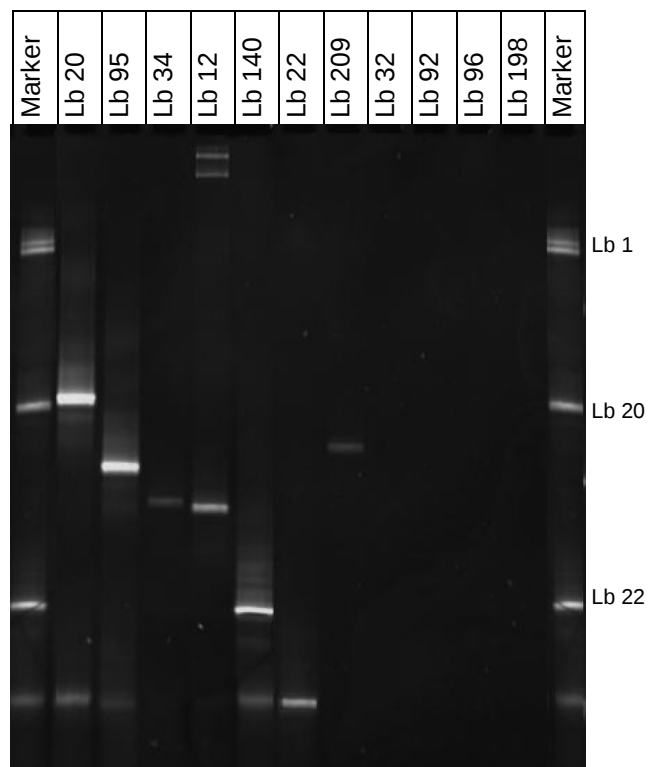


Abbildung 99: DGGE, Leiter, GC_LbtuffF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **40-50 %**

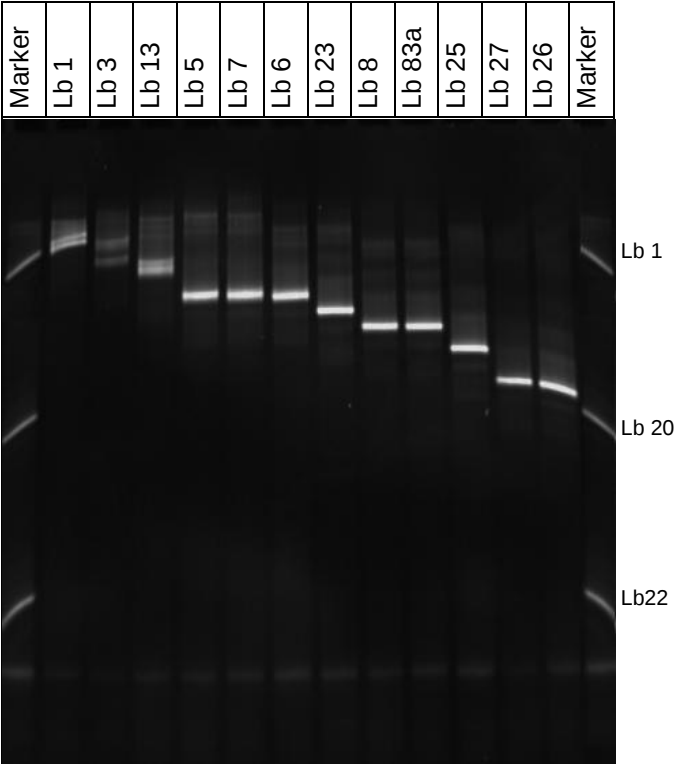


Abbildung 100: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **40-55 %**

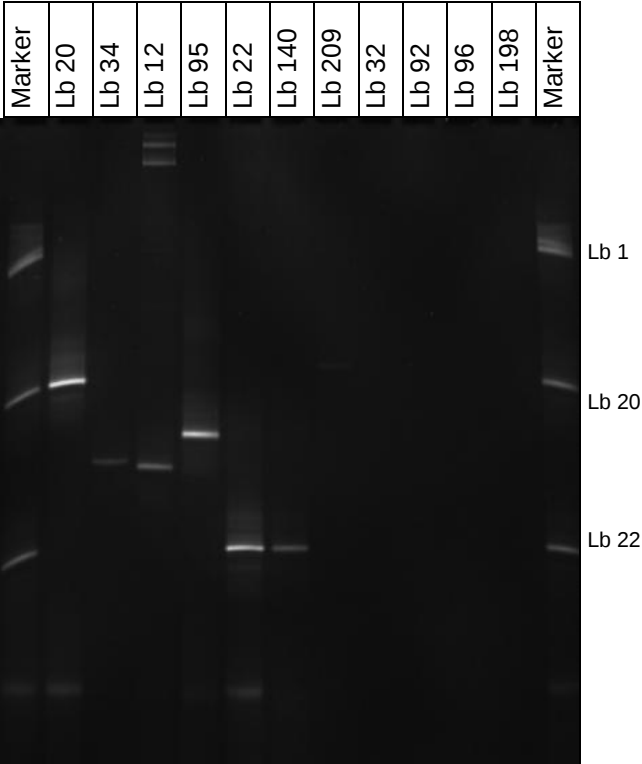


Abbildung 101: DGGE, Leiter, GC_LbtufF/ LbtufR, 56 °C, Gradient **40-55 %**

ad 8 probiotische Joghurts:

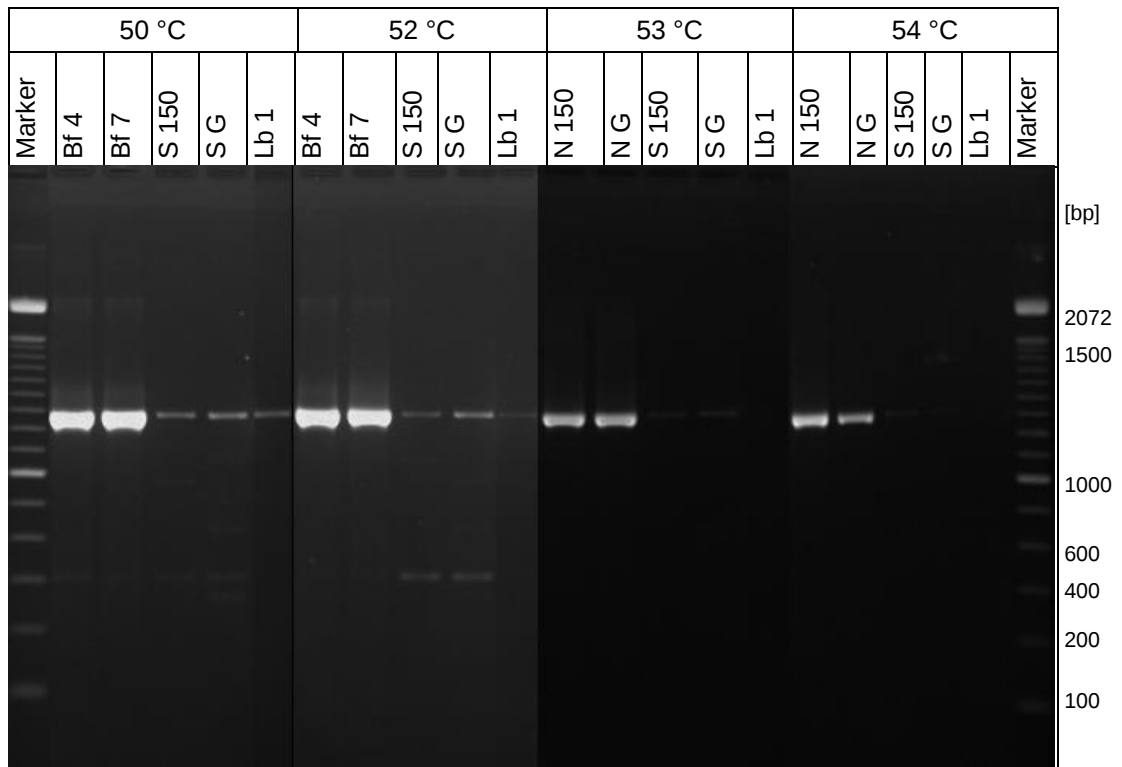


Abbildung 102: AGE, Temperaturversuch mit PbiF1/ PbiF2

bei 50 °C erscheint die Negativkontrolle positiv, daher wird mit höherer Temperatur gearbeitet.

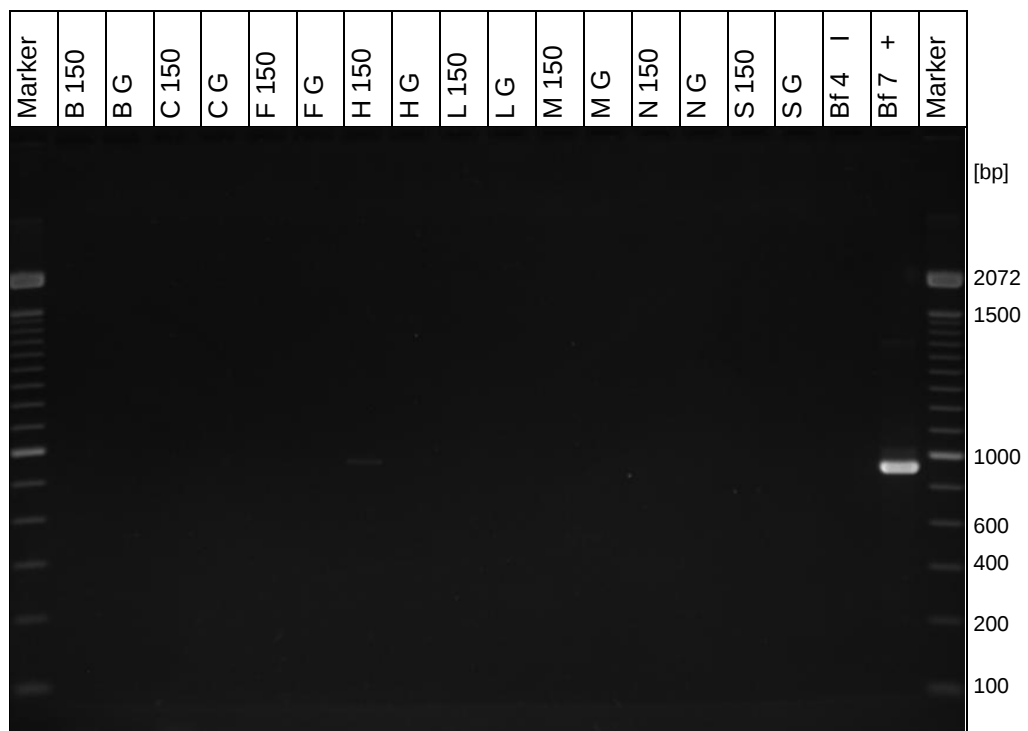


Abbildung 103: AGE, LONU7/ LONU8, 67 °C, *Bf. longum*

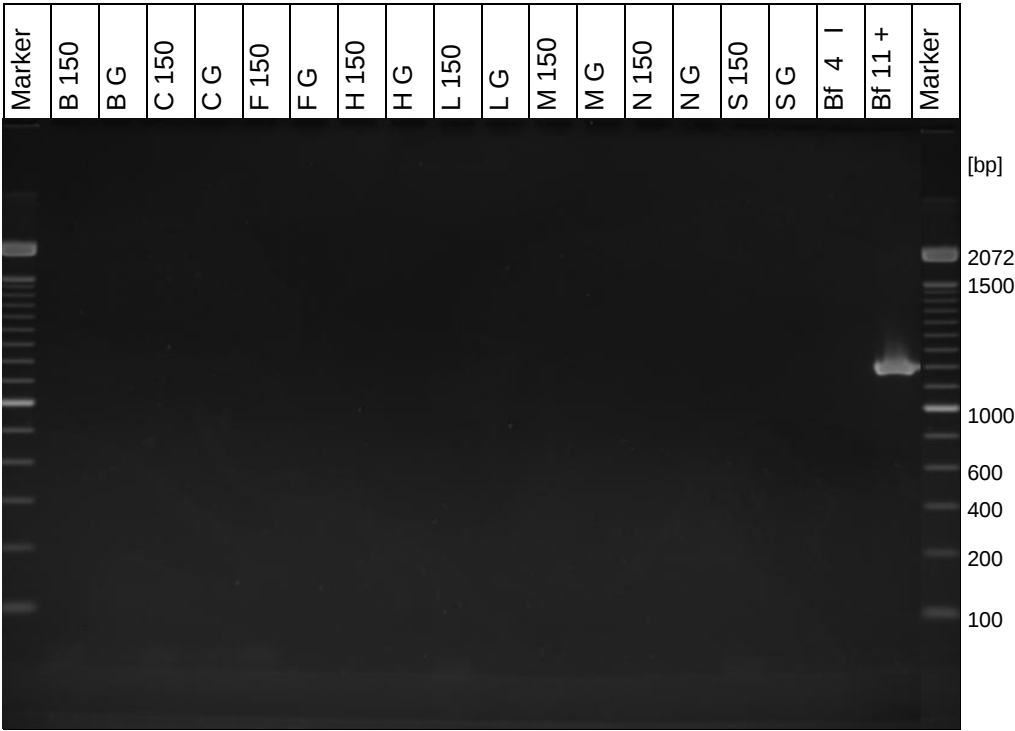


Abbildung 104: AGE, BreU3/ BeL4, 67 °C, *Bf. breve*

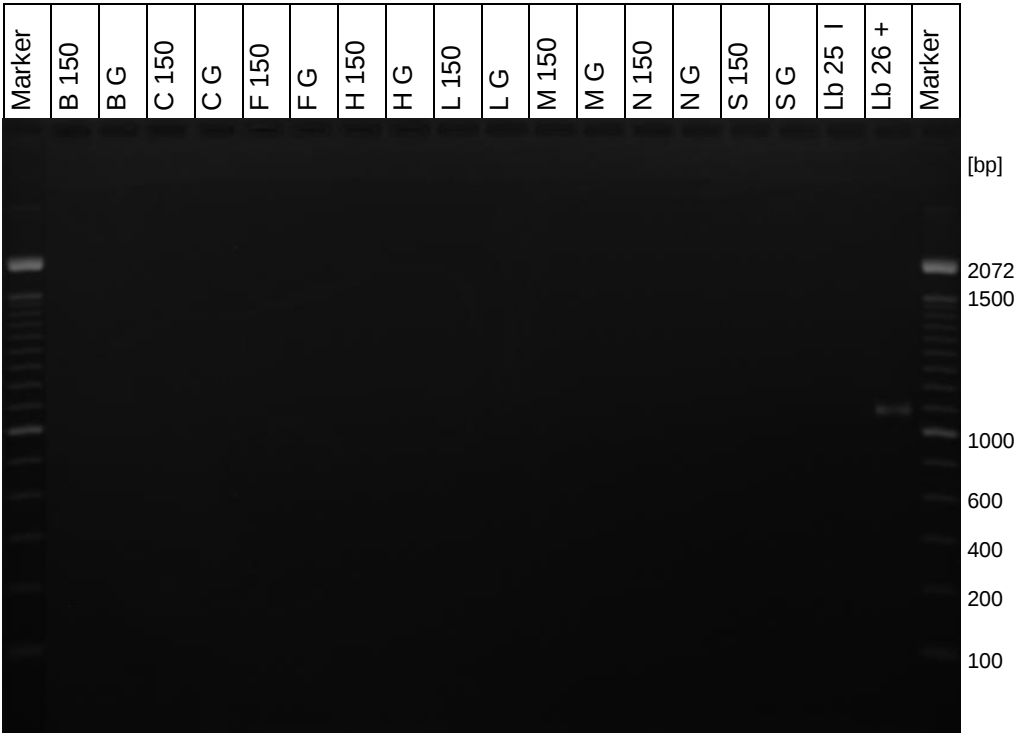


Abbildung 105: AGE, Lact33/ Lact37A, 50 °C, *Lb. delbrueckii ssp. lactis*

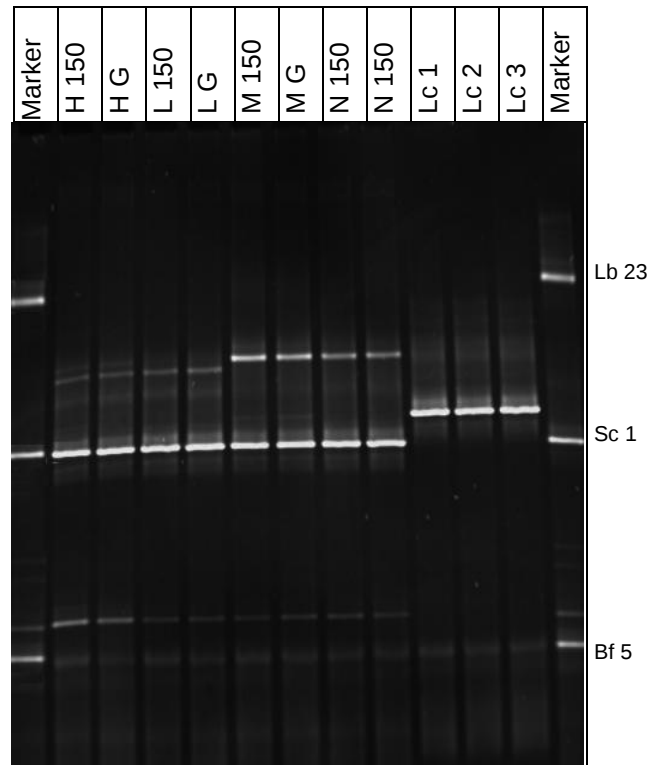


Abbildung 106: DGGE, Lactococcen, 35-65 %, HDA1GC/ HDA2, 54 °C

Das Joghurt Minus L zeigt sehr schwache Banden auf Höhe der Lactococcen.

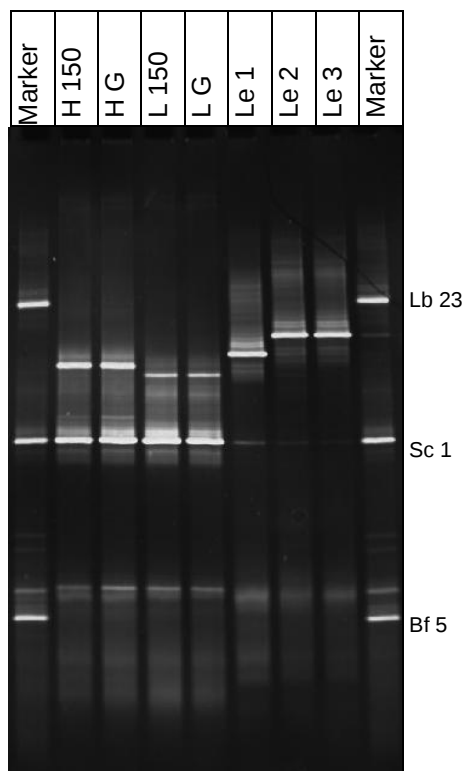


Abbildung 107: DGGE, *Leuconostoc*, HDA1GC/ HDA2, 54 °C